

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

DESARROLLO DE UN INOCULANTE DEGRADADOR DE GRASAS Y SUS DERIVADOS

Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología

Angeline Saadoun – 168563

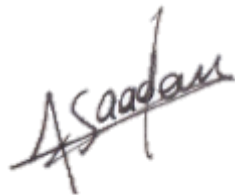
Tutor: Angela Cabezas

2014

Declaración de Autoría

Yo, Angeline Saadoun, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Proyecto de Grado de la Licenciatura en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'A Saadoun', with a stylized flourish at the end.

Angeline Saadoun
12 marzo 2014

Agradecimientos

A todas las personas e institutos que participaron e hicieron posible este proyecto:

Angela Cabezas, Carlos Sanguinetti, Mariana Ferrari, Javier Menes, Jorge Wenzel, Giovani Galletta, Ali Saadoun y Cristina Cabrera...

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT, a la Universidad ORT, al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)...

Y por último, a Hélène y a Agustina...

...muchas gracias por su apoyo.

Abstract

Se enfoca principalmente en la mejora de los tratamientos anaerobios de efluentes de la industria láctea. Se trata de una primera aproximación al desarrollo de un inóculo de bacterias capaces de contribuir a la degradación de grasas o sus derivados en un reactor de digestión anaerobia.

El procedimiento consistió en un seguimiento de dos enriquecimientos distintos. Para ello, se inoculó en un medio anaerobio mineral mínimo, una muestra de un lodo proveniente de un digestor de grasa. A cada medio se le adicionó un sustrato derivado de la degradación de grasa: glicerol o ácido oleico. Las inoculaciones fueron incubadas a 37°C y 55°C durante aproximadamente 1 mes. En cada enriquecimiento se midió la producción de gas así como el consumo del sustrato, y se estudió la comunidad microbiana con la técnica de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP), en los tiempos iniciales y finales de la incubación.

Como resultado del seguimiento, se obtuvo producción de gas así como una disminución de los sustratos a lo largo de la incubación. Además, el estudio de la comunidad microbiana evidenció una variación en la misma entre los tiempos iniciales y finales de la incubación. Esto podría indicar que la comunidad microbiana se adaptó a la degradación de los sustratos durante la incubación.

Este proyecto permitió una primera aproximación al desarrollo de un inóculo especializado en mejorar la degradación de grasas y sus derivados en un reactor anaerobio. Permitió además proyectar la posibilidad de una continuación del mismo, incorporando análisis más exhaustivos de la comunidad microbiana así como de las reacciones metabólicas que toman lugar en los enriquecimientos.

Palabras clave

Comunidades microbiológicas, digestor de grasas, degradación anaerobia, degradación de lípidos, glicerol, ácido oleico, ácidos grasos, industria lechera, inoculantes, Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism.

,

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Los efluentes industriales	8
1.2. Tratamientos preliminares de los efluentes industriales	8
1.3. La Industria láctea en Uruguay	10
1.4. Tipos de digestores anaerobios	12
1.5. Degradación anaerobia	13
1.6. Microbiología de la degradación anaerobia	14
1.7. Etapas y microbiología de la degradación anaerobia de lípidos	15
1.8. Técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas	18
1.9. La tecnología de la 454- pirosecuenciación	21
1.10. Antecedentes de aplicaciones para aumentar la degradación de lípidos	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo general	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. METODOLOGÍA	26
3.1. Sistema de tratamiento	28
3.2. Análisis de la comunidad microbiana de una muestra de lodo del reactor R3 mediante 454- pirosecuenciación de los genes de ARNr 16S	31
3.3. Muestreo y procesamiento de las muestras	31
3.4. Enriquecimientos anaerobios	31
3.5. Análisis de la comunidad microbiana	33
4. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Producción de gas por degradación anaerobia de glicerol	39
4.2. Determinación de la presencia de glicerol	43
4.3. Producción de gas por degradación anaerobia de ácido oleico	46
4.4. Determinación de la presencia de ácido oleico	47
4.5. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S	48
4.6. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S en las muestras de los enriquecimientos de glicerol	50
4.7. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S en las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico	54
4.8. Comparación de los resultados obtenidos en los dos enriquecimientos	58
4.9. Análisis de la 454- pirosecuenciación de la muestra de lodo del digestor de grasa	59
5. ANÁLISIS ECONÓMICO	62

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXO	68

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los efluentes industriales

Los efluentes industriales son líquidos extremadamente heterogéneos que resultan de un proceso de extracción o de transformación de materia prima, a los efectos de fabricar un producto industrial. La cantidad y composición de los efluentes varía en función de la industria de la cuál provienen (1). En general, tienen compuestos orgánicos o biológicos, que son principalmente residuos cloacales, microorganismos y algas. También pueden encontrarse compuestos químicos inorgánicos, como por ejemplo nitratos, nitritos, metales pesados y sales. Así como compuestos químicos orgánicos de los cuales se destacan los fenoles, hidrocarburos y detergentes. Por último, pueden contener presencia de sólidos suspendidos como basura y arcilla. La temperatura, coloración y olor le confieren sus características físicas (2).

La contaminación ambiental se describe como la incorporación de sustancias sólidas, líquidas, gaseosas o mezcla de ellas que alteren desfavorablemente, las condiciones naturales de un medio y/o puedan afectar la sanidad, la higiene o el bienestar público (3).

Al verter los efluentes industriales directamente al medio-ambiente, los ríos o aguas subterráneas alcanzados por los mismos sufren variaciones en su composición, temperatura, pH y coloración. Esto impacta en los medios naturales provocando un desequilibrio en la flora y fauna del ecosistema, pudiendo ocasionar repercusiones irreversibles en la salud de los animales y humanos (4).

Por ello, es requerido un tratamiento de los efluentes industriales antes de su liberación directa al medio-ambiente, previniendo así toda contaminación posterior. Sin embargo, los efluentes son particulares de cada industria y por consiguiente requieren de tratamientos específicos (2).

1.2. Tratamientos preliminares de los efluentes industriales

Es fundamental conocer en profundidad los efluentes industriales. Esto es su composición y concentración de contaminantes, con el fin de aplicar el tratamiento más apropiado a cada uno, logrando la mayor descontaminación al menor costo. Otro factor a tener en cuenta es la obtención de un producto con valor agregado luego del tratamiento lo cual podría disminuir los costos del mismo (1).

Los efluentes se caracterizan de acuerdo a parámetros físicos y químicos. Por físicos se entienden las características organolépticas, temperatura, turbidez, contenido en sólidos y conductividad. Los parámetros químicos se pueden organizar en materia orgánica y materia inorgánica.

Dentro de materia inorgánica se incluye la acidez, la presencia de sulfatos, cloruros, nitratos, nitritos, cianuros y metales tóxicos. La caracterización de la materia orgánica se divide en parámetros que informan sobre la materia orgánica en general, como la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), el Carbono Orgánico Total (COT) o sobre la presencia de sustancias específicas (aceites y grasas, detergentes, fenoles, etc). Por último, se utiliza también como parámetro la presencia de distintos microorganismos, como bacterias, hongos, algas y protozoos (5).

En general, el contenido de materia orgánica es el parámetro de mayor utilidad en el análisis de efluentes industriales. La demanda química de oxígeno (DQO) mide la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente a la materia orgánica. La demanda biológica de oxígeno (DBO₅) indica la presencia y biodegradabilidad de la materia orgánica. Es una forma de estimar la cantidad de oxígeno que se requiere para estabilizar el carbono orgánico y de saber con qué rapidez la materia va a ser metabolizada por las bacterias, que normalmente se encuentran presentes en las aguas residuales (6).

Los distintos tratamientos que se aplican a los efluentes industriales dependerán del nivel de contaminación medido a través de los parámetros explicados anteriormente y de las normas vigentes en cada país, y en la zona de ubicación de las plantas de tratamiento.

Existen tres categorías de tratamientos, que se suelen usar combinados. El tratamiento primario, se usa para la eliminación de los sólidos en suspensión y de materiales flotantes. El tratamiento secundario, se basa en tratamientos biológicos convencionales, y consiste en una serie de reacciones químicas producidas por microorganismos (aerobios o anaerobios) que actúan sobre la materia orgánica. Por último, el tratamiento terciario o avanzado consiste en eliminar aquellos compuestos - como por ejemplo el amonio, sulfúrico, entre otros - que son de difícil eliminación con los tratamientos anteriores, y es de gran importancia en casos de re-utilización del efluente, dado que se necesita alcanzar una mejor calidad del mismo (8). En la Figura 1 se presentan ejemplos de los procedimientos que aplican a cada tipo de tratamiento.

Tratamiento primario

- Cribado o desbrozo
- Sedimentación
- Flotación
- Separación de aceites
- Homogeneización
- Neutralización

Tratamientos secundarios

- Lodos activos
- Aireación prolongada
- Estabilización por contacto
- Lagunaje con aireación
- Estabilización por lagunaje
- Filtros biológicos (percoladores)
- Discos biológicos
- Tratamiento anaerobios: procesos de contacto, filtros (sumergidos)
- Otros

Tratamiento terciario o avanzado

- Microtamizado
- Filtración (lecho de arena, antracita, diatomeas...)
- Precipitación y coagulación
- Adsorción (carbón activado)
- Intercambio iónico
- Ósmosis inversa
- Electrodiálisis
- Cloración y ozonización
- Procesos de reducción de nutrientes
- Otros

Figura 1. Tipos de tratamientos de efluentes industriales. Adaptado de Ramalho R.S. (1996).

1.3. La Industria láctea en Uruguay

El sector lácteo uruguayo ha venido aumentando su producción y exportaciones desde 1975. Entre los años 2003 y 2011, el crecimiento fue aún más importante, alcanzando un 52 % a una tasa acumulativa anual de 6,2 %, siendo superada sólo por la de China. Valores menores fueron registrados a nivel de la producción mundial de lácteos, con un crecimiento de 14% en el mismo período, concentrado principalmente en la Unión Europea y Estados Unidos, y en una menor medida en India, Rusia, China y Brasil (9).

En el año 2013, se reportó una producción anual de 2,4 mil toneladas de productos lácteos en Uruguay (10). Posicionandolo como el mayor productor de leche per cápita de América Latina, con 412 litros por habitante. Tiene además un consumo de 228 litros por habitantes cada año, que también lo ubica en primer lugar en el continente (9). Cada año se obtienen alrededor de 4 millones de m³ de residuos de la producción de lácteos cada año (11).

El sector lácteo nacional, está compuesto por unas 35 industrias habilitadas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. El 93% de la producción es realizada por las 7 empresas más grandes. Entre estas se encuentran la empresa Conaprole que captó el 65 % de la leche nacional, Ecolat e Indulacsa captando 7% cada una. El 5 % restante es captado por empresas Micro, Pequeñas y Medianas (MIPYMES) que suman un total de 29 empresas. Entre estas se destaca la empresa Coleme que capta aproximadamente un 1 % de la leche nacional (12).

En las industrias lácteas se producen una diversidad de productos con procesos productivos diversos como ser la producción de leche pasteurizada, leche y suero de leche en polvo, queso, manteca, leche evaporada, helado, y yogurt. Estos productos tienen altos valores de DBO₅ y DQO, alrededor de 250 veces más que el contenido en las aguas residuales domésticas (7, 8,13,14,15). El agua utilizada en una planta de procesamiento de lácteos se asocia principalmente a las actividades de limpieza y lavado de pisos, botellas, vehículos, y la "limpieza a lugar" (del inglés *Clean in Place* o CIP) de los equipamientos de la fábrica. Por ello, se espera que los efluentes tengan una carga orgánica relativamente alta, siendo los mayores contribuidores la lactosa, grasas y proteínas (principalmente caseína), al igual que un alto nivel de nitrógeno y fósforo que se relacionan con las proteínas de la leche. La amplia variedad de compuestos contaminantes implica la necesidad de un tratamiento secundario (16). En general las industrias de lácteos cuentan con una planta de tratamiento que se localiza dentro del territorio de la misma (7).

En estas plantas de tratamiento, los sistemas anaerobios son uno de los tratamientos más usados (11). La digestión anaerobia es un proceso realizado por un consorcio de microorganismos (comunidad) en ausencia de aceptores de electrones exógenos. Hasta un 95% de la carga orgánica en los efluentes puede ser transformada a biogás (metano, hidrógeno y dióxido de carbono). Este es el tratamiento de preferencia, que comparado con el tratamiento aerobio, es percibido como más económico, principalmente por los bajos requerimientos energéticos. Además el gas metano generado durante la digestión anaerobia puede ser utilizado como fuente de energía. Entre otras ventajas frente a los tratamientos aeróbios se encuentran, la generación de menor cantidad de lodo, reduciendo los típicos problemas de la eliminación del mismo, los requerimientos nutricionales bajos (17), y por último la no generación de olores, dado que se trata de reactores cerrados (18).

Hay ciertas desventajas que se asocian a estos sistemas, entre ellas se encuentran los altos costos capitales, los controles estrictos de las condiciones de operación, la sensibilidad a las variaciones del flujo de alimentación de los reactores y a las concentraciones orgánicas, así como a compuestos tóxicos (19). Además las temperaturas operacionales deben ser mantenidas alrededor de 33-37°C para una cinética eficiente (19).

1.4. Tipos de digestores anaerobios

La digestión anaerobia tiene una larga historia en el campo del tratamiento de las aguas residuales. Los digestores se han ido adaptando para satisfacer los requerimientos de cada planta de tratamiento. La gran variedad de digestores anaerobios pueden ser clasificados en función del tipo de crecimiento bacteriano que comprenden. Se tiene por un lado los reactores con una biomasa suspendida y por otro lado los reactores con retención de la biomasa (20).

Los reactores con una biomasa suspendida pueden tener dos tipos de sistemas. Por un lado, un sistema de recirculación que genera una separación de los microorganismos en un decantador como es el caso de los reactores de contacto anaerobio (ACP). El sistema sin recirculación permite una distribución uniforme de concentraciones, tanto de sustrato como de microorganismos, y es el caso de los reactores de mezcla completa (CSTR) (20).

Los reactores con retención de bacterias evitan la formación de una mezcla. Los dos principales métodos de retención son la inmovilización sobre un soporte como es el caso de los filtros anaerobios y de los lechos fluidizados, y la agregación o floculación de biomasa y su retención por gravedad como es el caso de los reactores de lecho de lodos (UASB) (Figura 2) (20).

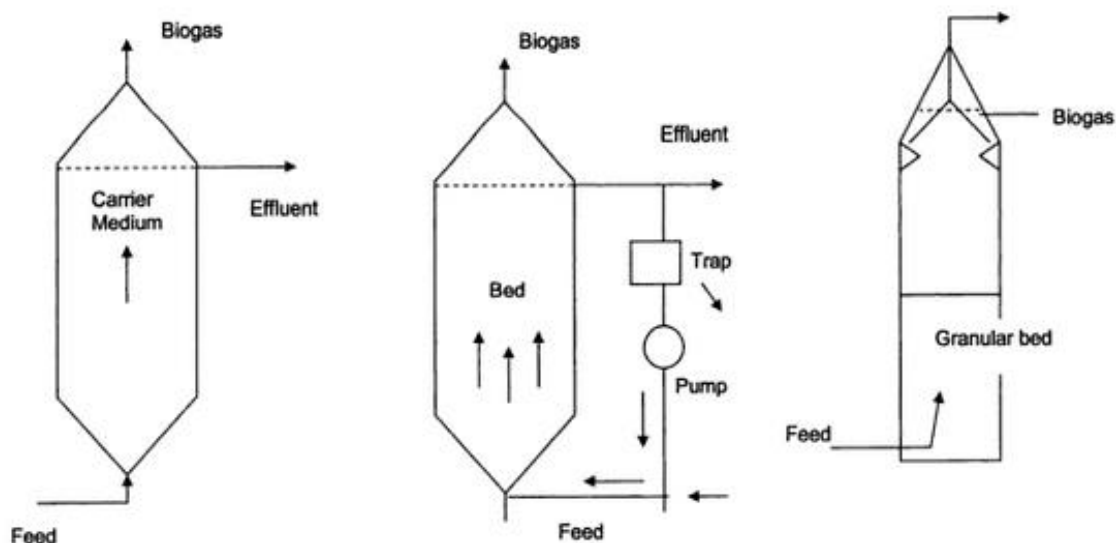


Figura 2. Algunos ejemplos de los principales reactores anaerobios con fijación de microorganismos para el tratamiento de efluentes. Se observa un digestor anaerobio con filtro (izq.), un reactor de lecho fluido (cent.) y un reactor UASB (der.) (15, 16, 17, 18).

1.5. Degradación anaerobia

La degradación anaerobia es un proceso microbiológico de descomposición de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, y concluye con la producción de biogás (principalmente metano y dióxido de carbono) y digestato (sustratos descompuestos). La energía producida por la degradación no se manifiesta como calor, sino que reside principalmente en el biogás producido. La degradación anaerobia y la producción final de biogás se dan por una serie de procesos relacionados. La materia inicial es continuamente degradada a unidades menores. Microorganismos específicos están involucrados en cada paso individual, y descomponen sucesivamente el producto del paso anterior. En la Figura 3, se muestran los cuatro pasos principales de la degradación anaerobia: la hidrólisis, la acidogénesis, la acetogénesis y la metanogénesis. Estos procesos son paralelos en el tiempo y en el espacio en un tanque digestor. La velocidad de descomposición dependerá de la reacción más lenta de la cadena (19).

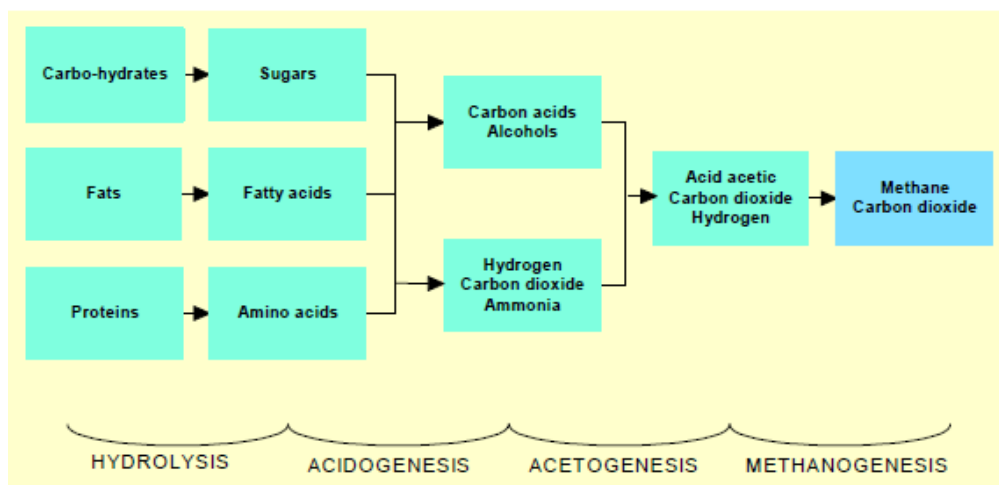


Figura 3. Etapas del proceso principal de degradación anaerobia. Fuente: Seadi T.A. et al, 2008 (19).

- Primera etapa: la hidrólisis

En la hidrólisis, la materia orgánica formada principalmente de polímeros, es descompuesta a unidades más chicas, como monómeros y oligómeros. Por ejemplo, polímeros como polisacáridos son convertidos a monosacáridos, lípidos a ácidos grasos y glicerol, y proteínas a aminoácidos (25). Estas conversiones son posibles por la presencia de enzimas excretadas por microorganismos hidrolíticos. Así, las enzimas, como lipasas, celulasas, celobiasas, xilanasas, amilasas y proteasas, son capaces de convertir los biopolímeros en unidades más simples y solubles (25).

- **Segunda etapa: la acidogénesis**

Durante la acidogénesis, los productos de la hidrólisis son convertidos por bacterias acidogénicas (fermentativas) en sustrato metanogénicos. Azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos son degradados a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (70%) así como a ácidos grasos volátiles (AGV) y alcohol (30%) (25).

- **Tercera etapa: la acetogénesis**

En la acetogénesis, los productos de la acidogénesis que no pueden ser convertidos directamente a metano por bacterias metanogénicas, son convertidos primero a sustrato metanogénicos. Es el caso de los AGV y alcohol, los cuáles son oxidados a sustrato metanogénicos como acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. La producción de hidrógeno aumenta la presión parcial de hidrógeno inhibiendo el metabolismo de las bacterias acetogénicas, por ello, las reacciones de acetogénesis y metanogénesis se dan en paralelo, permitiendo que los organismos metanogénicos-hidrogenofílicos conviertan el hidrógeno en metano, desinhibiendo a los organismos acetogénicos (25).

- **Última etapa: la metanogénesis**

Durante la metanogénesis, la producción de metano y dióxido de carbono es realizada por organismos metanogénicos. El 70% del metano formado es originario del acetato, mientras que el restante 30% es producido por la conversión de hidrógeno y dióxido de carbono. Este paso es crítico para el proceso entero de degradación anaerobia, ya que es el que tiene la reacción bioquímica más lenta. La misma es severamente influenciada por las condiciones de operación, tal la composición del influente, la velocidad de alimentación, temperatura y pH, entre otras. Una sobrecarga del digestor, cambios de temperatura o entradas de oxígeno pueden dar por terminada la producción de metano (25).

1.6. Microbiología de la degradación anaerobia

La degradación anaerobia requiere de reacciones consecutivas y sinérgicas entre cuatro grupos de microorganismos: bacterias hidrolíticas, bacterias fermentativas y β -oxidación, bacterias acetogénicas y organismos metanogénicos (25).

- **Las bacterias hidrolíticas**

Las bacterias hidrolíticas producen enzimas extracelulares que degradan la materia orgánica a monómeros solubles. Las bacterias reconocidas por ser hidrolíticas y participar en la fase de hidrólisis de la materia orgánica son las especies pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Acetovibrio* y *Coprothermobacter*. (26, 27, 28, 29)

- **Las bacterias fermentativas y β -oxidación**

Las bacterias fermentativas y β -oxidación convierten los monómeros en ácidos orgánicos, alcoholes y cetonas, CO_2 y H_2 . Entre ellas, se destaca el género *Clostridium*, y las bacterias del ácido láctico (30).

- **Las bacterias acetogénicas**

Las bacterias acetogénicas convierten los ácidos grasos y alcoholes en acetato, CO_2 y H_2 , para ser usados por los organismos metanogénicos. Su particularidad reside en que a presiones altas (si se acumula mucho H_2 y sube la presión parcial de H_2) se inhiben. Su estrecha relación con los organismos metanogénicos se manifiesta por la reducción de la presión parcial del H_2 por parte de las últimas, permitiendo así la actividad de las acetogénicas. En este grupo se encuentran las bacterias *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei* (31, 32).

- **Los organismos metanogénicos**

Los organismos metanogénicos son particularmente sensibles al oxígeno y no son capaces de utilizar productos complejos. Su metabolismo energético se dirige exclusivamente a la producción de metano. Su crecimiento se caracteriza por ser lento, de 3 días a 35°C y 50 días a 10°C . En esta categoría se dividen las bacterias metanógenas-hidrogenotróficas, como por ejemplo los géneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, y las bacterias metanógenas-acetotróficas o acetoclásticas como los géneros *Methanosarcina*, *Methanosaeta*. Además, estas bacterias compiten con las bacterias sulfatorreductoras, que incluyen géneros como *Desulfovibrio*, por los mismos sustratos (33).

1.7. Etapas y microbiología de la degradación anaerobia de lípidos

La hidrólisis anaerobia de lípidos (Figura 4) produce glicerol y ácidos grasos libres (LCFAs del inglés *Long Chain Fatty Acids*) por lipasas extracelulares que son secretadas por bacterias acidogénicas.

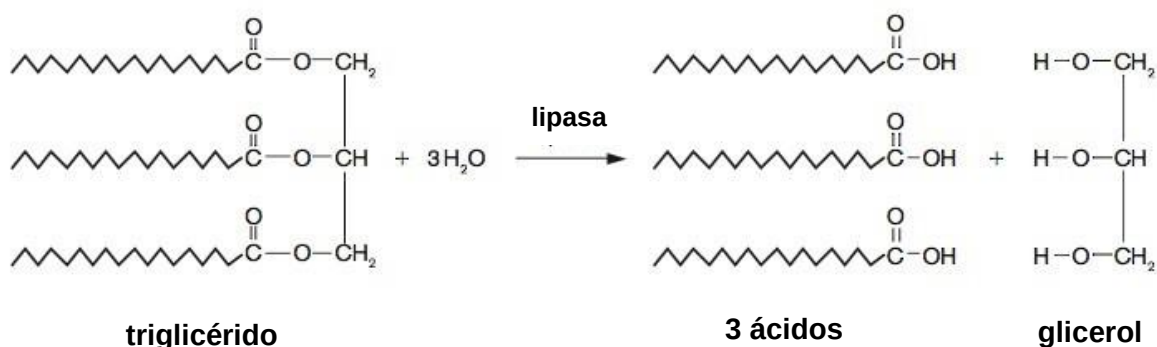


Figura 4. Reacción de hidrólisis de un lípido (triglicérido) a ácidos grasos y glicerol. Fuente: Martin Dion, 2010).

La consecuente conversión de los productos de la hidrólisis de lípidos se da dentro de las células bacterianas. El glicerol es convertido a acetato durante la acidogénesis mientras los ácidos grasos libres (LCFAs) son convertidos a acetato e hidrógeno a través de la ruta de β -oxidación, con la participación de bacterias acetogénicas en sintrofia con organismos metanogénicos-hidrogenotróficos y metanogénicos-acetoclásticos (31). Ésta conversión es lenta en comparación con la hidrólisis anaerobia de lípidos y además está limitada por la presión parcial de hidrógeno en el medio, y por ende condicionada por la cooperación de microorganismos consumidores de hidrógeno.

Se conocen alrededor de 10 especies y/o subespecies que son capaces de degradar anaeróbicamente los ácidos grasos libres con más de 4 y hasta 18 átomos de carbonos. Todas pertenecen a las familias *Syntrophomonadaceae* (32,34, 35) y *Syntrophaceae* (36). Particularmente, los ácidos grasos libres con más de 18 átomos de carbono son usados por las bacterias *Syntrophomonas sapovarians* (37), *Syntrophomonas wolfei* subsp. *Saponavida* (38) *Syntrophomonas curvata* (39), *Thermosyntropha lipolytica* (40) y *Syntrophus aciditrophicus* (36). Además, entre estos organismos, se diferencia la capacidad de consumir ácidos grasos libre mono y/o poliinsaturados (con más de 12 átomos de carbono), pero aún no se conoce por qué algunos tienen mayor facilidad por dicho consumo. Particularmente, se han encontrados microorganismos pertenecientes a los filos Firmicutes y Proteobacteria como posibles degradadores de oleico (32).

Según D.Z. Souza *et al.*, (41) la degradación metanogénica del ácido oleico se da siguiendo una combinación de las reacciones de degradación, de metanogénesis-hidrogenotrófica y de metanogénesis-acetoclástica (Tabla 1).

Tabla 1. Degradación anaerobia del ácido oleico. Reacciones que de la conversión sintrófica del ácido oleico durante la degradación anaerobia. Adaptado de D.Z. Souza *et al.* (2007).

Proceso	Reacción
Degradación del ácido oleico	$C_{18}H_{33}O_2^- + 16H_2O \rightarrow 9C_2H_3O_2^- + 15H_2 + 8H^+$
Metanogénesis-hidrogénotrófica	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$
Metanogénesis-acetoclástica	$C_2H_3O_2^- + H_2O \rightarrow HCO_3^- + CH_4$

Debido a la lenta degradación de los ácidos grasos libres, en contraste con una rápida degradación de los lípidos, se genera una acumulación de ácidos grasos libres, y de productos secundarios (41,42). Esta acumulación ha demostrado ocasionar inhibición de la degradación de las bacterias acetogénicas y metanogénicas-hidrogénotróficas (43). Sin llegar a tal punto, la acumulación mencionada puede provocar una menor producción de gas comparado con lo esperado.

La degradación anaerobia de glicerol fue establecida por Bielb *et al.* a través de una ruta reductiva y otra ruta oxidativa. En la ruta reductiva, el glicerol es deshidratado por una enzima (glicerol desidratasa), produciendo 3-hidroxi propionaldehído que es a su vez reducido a 1,3 propanediol, mediado por la enzima 1,3 propanediol deshidrogenasa. En la ruta oxidativa, el glicerol es deshidrogenado por la enzima glicerol deshidrogenasa, formando dihidroxiacetona, que tras unas fosforilación es mediado por la enzima dihidroxiacetona quinasa, para ser convertido a succinato. Éste último es convertido a propionato o a piruvato. De aquí en más, las reacciones que forman compuestos a partir del piruvato dependen de diversas condiciones que median la reacción, pudiéndose formar compuesto más simples como 2,3-butanediol, lactato, butirato, etanol, formiato, acetato, hidrogeno, y dióxido de carbono (44,45).

Por un lado, la limitación principal para la degradación del glicerol es la acumulación de intermediarios de la degradación o de metabolitos. La acumulación de intermediarios que se debe a una diferencia en la velocidad de consumo, puede ocasionar sobrecarga orgánica en el reactor y desestabilizar las condiciones óptimas de degradación (45). Por otro lado, la presencia de microorganismos capaces de formar los compuestos formiato, acetato, hidrógeno y dióxido de carbono (en la forma de bicarbonato) es fundamental para la consecuente formación de metano. Las bacterias acetogénicas no pueden llevar a cabo estas reacciones sin la previa remoción de H_2

del medio, esto es principalmente la responsabilidad de arqueas metanogénicas-hidrogenotróficas (46).

Los microorganismos involucrados en la degradación anaerobia de glicerol fueron reportados pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Anarobiospirillum*, *Actinobacillus* y *Proponiobacterium*. Sin embargo, en recientes estudios realizados por B.T. Maru *et al.* (47), se han confirmado la capacidad de degradación de glicerol, de bacterias pertenecientes al orden Thermotogales, principalmente los géneros *Thermotoga* y *Kosmotoga*.

La degradación anaerobia de glicerol fue descrita por Buswell y Muellepi (48). De ésta degradación, la reacción de metanogénesis fue adaptada por M.B.Viana *et al.* (43) y la reacción de acetogénesis por B.T. Maru *et al.* (47). Éstos últimos se enfocaron particularmente en el metabolismo de *Kosmotoga*. Ambas ecuaciones se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Degradación anaerobia del glicerol. Producción de gas hidrógeno y de gas metano por la degradación anaerobia del glicerol. Adaptado de M.B. Viana *et al.* (2012), y B.T. Maru *et al.* (2013).

Proceso	Reacción
Acetogénesis	$C_3H_8O_3^- \rightarrow C_2H_3O_2^- + HCO_3^- + 3H_2 + 2H^+$
Metanogénesis	$C_3H_8O_3^- \rightarrow 1.75CH_4 + 1.25CO_2 + 0.5H_2O$ (2)

1.8. Técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas

Las comunidades microbiana son el conjunto de especies microbianas que coexisten en un lugar y tiempo. De la gran diversidad de microorganismos solo se han aislado y descrito y/o caracterizado algunos miles. Esto se debe principalmente a que unos cuantos organismos – organismos no cultivables - de muestras ambientales no son capaces de crecer en medios nutritivos en las instalaciones de un laboratorio (49). Esta es la razón por la cual se han desarrollado diferentes estrategias, principalmente moleculares, para identificar y/o caracterizar a las comunidades microbianas sin necesidad de cultivo.

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

El método *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) es uno de los métodos más poderosos dentro del campo de la ecología microbiana para comparar rápidamente la diversidad de grupos bacterianos entre distintas muestras (50). El método se basa en la variación de la posición y longitud del primer sitio de restricción entre distintas secuencias.

El procedimiento comienza por una amplificación del gen que codifica para la unidad 16S del ribosoma (ARNr 16S), utilizando *primers* universales. Uno de los *primers* se marca con una molécula fluorescente en el extremo 5'. Para obtener los fragmentos terminales de restricción (T-RFs) se digieren las secuencias amplificadas con uno o varias enzimas de restricción. Los T-RFs son desnaturalizados y las hebras simples separadas por electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes. Solo se detectan los fragmentos marcados por fluorescencia y los tamaños son determinados por comparación con un estándar también marcado fluorescentemente. El resultado es una distribución de abundancias de fragmentos de diferentes tamaños, apreciable gracias a la medida de la intensidad de la fluorescencia (50).

El resultado se presenta con un cromatograma, con picos de distintas alturas. Cada pico corresponde a un tamaño de fragmento y su altura corresponde a la abundancia del fragmento en la muestra. Así, es posible determinar la abundancia relativa de cada T-RF, comparando la abundancia de cada pico relativo a la suma de la abundancia total en la muestra. Los pasos de este análisis se resumen en la Figura 5 (50,51).

Las características más importantes de éste método son su gran velocidad de análisis de muestras, lo que permite hacer réplicas de los experimentos y lograr análisis estadísticos (52). Este método, puede ser usado para identificar diferencias entre comunidades, comparar la riqueza relativa de filos y estructuras de comunidades y para identificar organismos específicos en una comunidad. Sin embargo, también aporta algunas limitaciones. A pesar de ser un método rápido de análisis comparativo de comunidades, tiene baja resolución, ya que existe la posibilidad de que varios filos se encuentren representados por un solo tamaño de fragmento y representen entonces un solo pico en la distribución. Esto puede llevar a subestimar la riqueza de especies (50).

Al estudiar comunidades de microorganismos menos variadas, como aquellas pertenecientes al dominio arqueas, es posible identificar la población microbiana presente en una comunidad por comparación de los T-RFs obtenidos con T-RFs teóricos presentes en diversas bases de datos. Sin embargo, si se analizan comunidades microbianas más diversas, es imposible relacionar los datos obtenidos con datos teóricos. Para lograrlo, se deberían incluir otros análisis con mayor resolución filogenética pero a mayor costo, como por ejemplo la secuenciación del gen ARNr 16S de cada muestra (51).

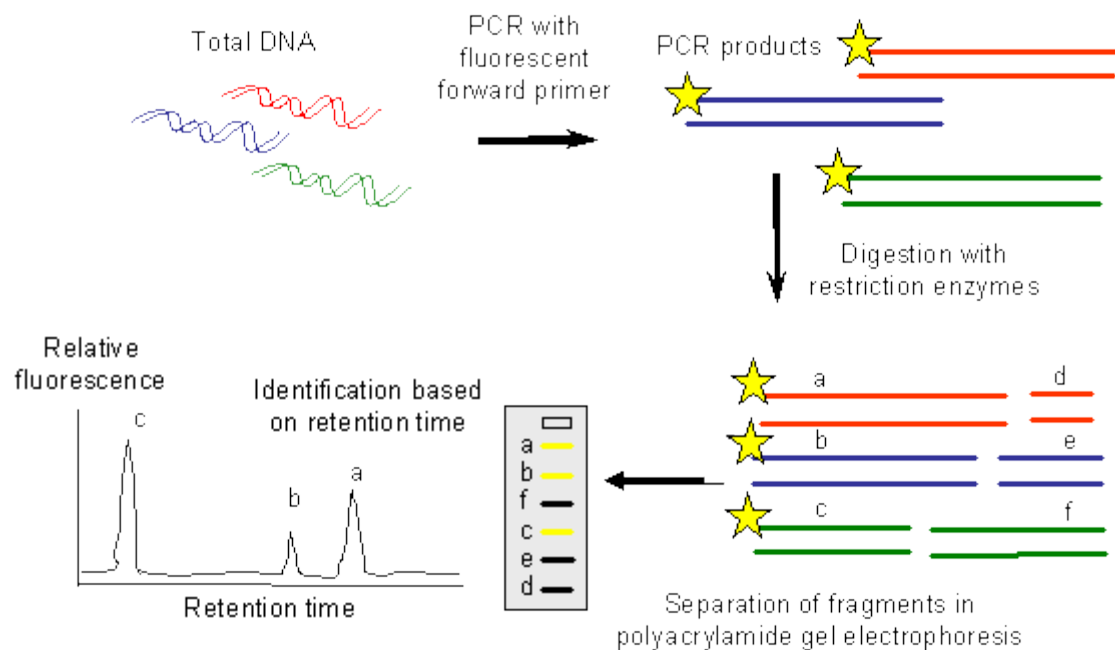


Figura 5. Análisis T-RFLP de una comunidad microbiana. Fuente: BioMine Wiki “Molecular approaches for microbial community analysis”, consultado el 1 de febrero 2014.

Análisis multivariados

La cantidad de datos genéticos crecen cada día, y por ello se recurre a métodos estadísticos que permiten entender los resultados de los análisis moleculares y presentarlos de un modo visualmente más accesible.

El análisis multivariado es un método estadístico que refiere en un sentido amplio a todos los métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de dos variables) de individuos. Los métodos multivariados se pueden clasificar en método de ordenación y en métodos de clasificación. Dentro de los métodos de ordenación el más comúnmente usado es el análisis por *cluster*, mientras que en los métodos de clasificación en general se recurre al análisis de componentes principales (53).

Análisis por *cluster* o agrupamiento

La clasificación es uno de los objetivos fundamentales de la microbiología ecológica. El análisis de *cluster* proporciona los medios para realizarla. El propósito principal del análisis de *cluster* es de representar las similitudes o disimilitudes entre objetos (muestras, sitios, etc) basadas en valores de

variables múltiples asociadas entre ellas, de modo que los objetos similares son posicionados cerca y los disimilares a mayor distancia. Este tipo de análisis son útiles para revelar patrones en una muestra amplia pero no sirven para explicar por qué se dan dichos patrones. Su objetivo es minimizar las variaciones entre una misma agrupación y maximizar las variaciones entre-agrupamientos para poder enfatizar cuales son las categorías que comparten las mismas características, creando grupos homogéneos y además reduciendo la dimensionalidad de las muestras (54,55).

En un análisis de una comunidad microbiológica, este método marca distancias basándose en las de patrones T-RFs obtenidos que permiten describir a la diversidad microbiana. Los microorganismos que comparten los mismos patrones se agrupan y se separan de aquellos con quienes tienen mayores diferencias. Así, el método refleja distintos patrones que pueden ser temporales o espaciales permitiendo un mayor entendimiento de los cambios en la comunidad microbiológica (50).

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA de la sigla en inglés *Principal Component Analysis*) es uno de los métodos de ordenación más usados para diferenciar comunidades microbianas. El procedimiento de PCA calcula variables artificiales llamadas componentes principales que son combinaciones lineales de las variables originales que caracterizan a la comunidad. El propósito es de representar los objetos y las variables con una nueva combinación de coordenadas. De tal modo, este método busca preservar y representar las posiciones relativas de los objetos y la magnitud de variaciones entre las variables en un espacio más reducido, pudiendo apreciarse un resultado visualmente simple (56).

1.9. La tecnología de la 454- pirosecuenciación

Las tecnologías de secuenciación de la Nueva Generación hicieron posible la secuenciación de alto rendimiento a precios accesibles (57). La 454-pirosecuenciación es una secuenciación de alto rendimiento que es capaz de generar más de 400.000 lecturas efectivas con una precisión del 99,5% (57,58). Esta tecnología se basa en la secuenciación a través de la síntesis de secuencias.

Cada fragmento simple es unido a una nanoesfera que se localiza en una placa (PicoTiterPlata™) conteniendo aproximadamente un millón de pocillos, y al menos una nanoesfera por cada pocillo

Primero el ADN a secuenciar es fragmentado a tamaños de 300-800 pb. Cada fragmento es unido a dos adaptadores (uno de cada extremo) lo que facilita su unión a una nanoesfera en solución (Figura 6). Se amplifica cada fragmento gracias a la creación de un microambiente alrededor de la nanoesfera. Un único fragmento es amplificado en toda la nanoesfera (Figura 7). Luego se adicionan las nanoesferas a una placa (PicoTiterPlata™) dónde aproximadamente hay una nanoesfera por pocillo- junto con las enzimas y reactivos requeridos para la secuenciación.



Figura 6. Primera etapa de la pirosecuenciación 454. Se muestra la formación de una librería de fragmentos que derivan del genoma que se quiere secuenciar, las dobles hebras del ADN son separadas a hebras simples y su unión a adaptadores y a las nanoesferas. Fuente: 454 LifeSciences “How is genome sequencing done?”.

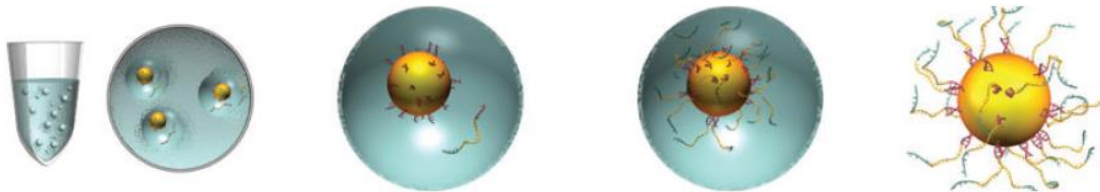


Figura 7. Paso de amplificación de los fragmentos en las nanoesferas por PCR en emulsión. Se ilustra de izq. a der. los pasos básicos de la etapa. Se crea el microambiente alrededor de cada nanoesfera, se une el fragmento a la nanoesfera, se amplifica gracias al microambiente y se rompe el microambiente. Fuente: 454 LifeSciences “How is genome sequencing done?”.

Luego, se aplica un flujo de nucleótidos a la placa y la enzima ADN polimerasa se encarga de sintetizar la cadena complementaria de cada fragmento en las nanoesferas. Los nucleótidos son enviados uno a la vez. Cuando un nucleótido se complementa con la primera base des-pareada del fragmento, se genera una molécula de pirofosfato (PPi) que reacciona con adenosina 5'-fosfosulfato (APS) para formar trifosfato de adenosina (ATP) a través de la enzima ATP sulfurilasa. La molécula de ATP a su vez reacciona con la luciferina para emitir luz, de una intensidad determinada (Figura 8) (59). Varios nucleótidos idénticos pueden ser incorporados en un mismo ciclo, en tal caso la intensidad de la luz corresponde al número de bases incorporadas. La intensidad de la luz es registrada y luego procesada para presentar la intensidad de la luz emitida por cada nucleótido en forma de picos en un cromatograma (60).

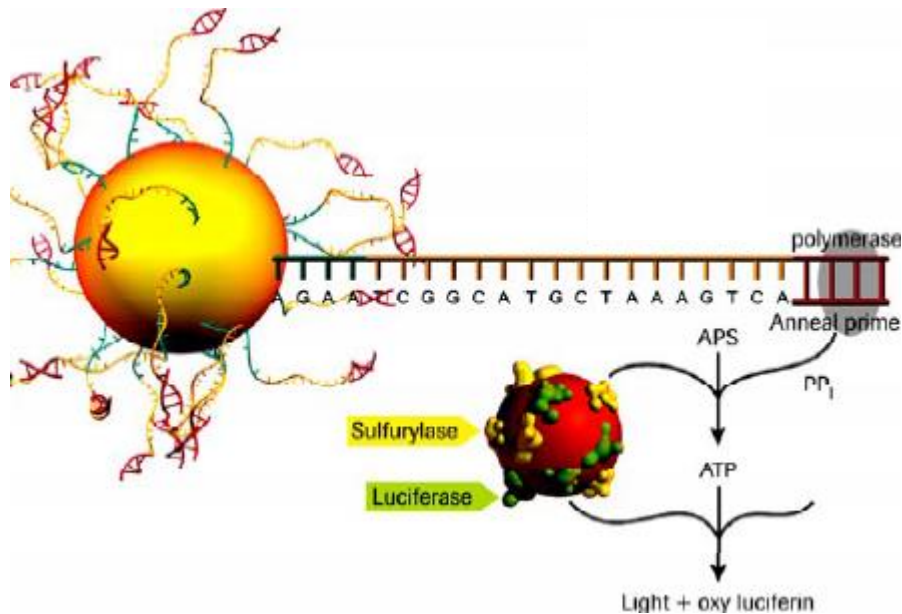


Figura 8. Último paso de la 454-pirosecuenciación. Se muestra la reacción que se da en cada uno de los fragmentos. La síntesis la realiza la enzima polimerasa a partir del *primer* y finaliza por la emisión de luz. Fuente: 454 LifeSciences “How is genome sequencing done?”.

El gen de ARNr 16S es una secuencia que se ha mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso permite distinguir claramente las diferencias entre los distintos microorganismos. Este gen permite de clasificar los organismos estudiados en distintos filos bacterianos e incluso géneros. Por ello, en el primer paso del ensayo se puede comenzar con una previa amplificación de una región del gen anteriormente mencionado, obteniéndose así fragmentos del tamaño adecuado para el ensayo.

Si bien la 454-pirosecuenciación es una técnica fácil de llevar a cabo, existen distintos análisis que buscan facilitarla sobre todo cuando el análisis de gran cantidad de muestras. Por ejemplo, el análisis de Multiplex permite marcar con un código de barra a las secuencias pertenecientes a una misma muestra, para poder ser distinguidas y analizadas en conjunto. La mezcla de las muestras permite de este modo aumentar el número de muestras analizadas en una única corrida sin necesariamente aumentar el costo o el tiempo.

1.10. Antecedentes de aplicaciones para aumentar la degradación de lípidos

Este trabajo surgió en respuesta a la complejidad que presenta el proceso de degradación de lípidos. Como fue mencionado anteriormente, las inhibiciones ocasionadas por la acumulación de intermediarios, de ácidos grasos libres, la alta carga orgánica que ocasiona una digestión lenta y la

acumulación de lodo granular pueden provocar una baja eficiencia de los reactores. En vista de solucionar estos inconvenientes, se utilizan tres estrategias distintas:

- **Pre-tratamientos químicos y físicos:**

Por un lado se acude a pre-tratamientos químicos y físicos, controlando la velocidad del flujo de alimentación, el tiempo de retención hidráulico (HRT) y la retención del lodo, así como otro tipo de parámetros fisicoquímicos. Además, el diseño de los reactores anaerobios se adapta constantemente, enfocando el diseño, el sistema operacional y la ingeniería catalítica para la mejor y más rápida digestión de lípidos (61).

- **Adición de enzimas:**

Por otro lado, se puede recurrir a la adición de enzimas. La adición de enzimas dio resultados positivos en diversos estudios. Principalmente se adicionan lipasas, para aumentar la hidrólisis enzimática de lípidos, ya que es uno de los pasos limitantes y podría derivar en una inhibición de la actividad microbiana. Se han usado enzima aisladas de páncreas porcinos obteniendo un incremento en la producción de metano y disminuyendo la DQO, sobre todo al adicionar las enzimas durante la biodegradabilidad (62). Sin embargo, también se reportaron problemas de inhibición de las enzimas a altas concentración de ácidos grasos libres. Este tipo de procesos son costosos y de larga duración, pero pueden ser más accesible variando la concentración enzimática requerida (61).

- **Adición de un consorcio de microorganismos:**

Por último, la adición de un consorcio de microorganismos puede permitir la producción de enzimas hidrolíticas requeridas para la degradación de los lípidos así como el resto de las enzimas necesarias, durante un tiempo prolongado. Permite además ejercer cierto control sobre la comunidad anaerobia cuyo control genera siempre grandes (63). Si bien, esta alternativa requiere de una larga fase de adaptación por parte de la comunidad microbiana, una vez adaptada puede llegar a rendir durante años. Es en este punto que la biotecnología puede hacer aportes muy valiosos, y es por esta razón el principal enfoque de este trabajo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Enriquecimiento de una comunidad degradadora de glicerol u oleico con miras al desarrollo de un inoculante que aumente la eficiencia de la degradación de grasas

2.2. Objetivos específicos

- Enriquecimiento de un lodo de un reactor anaerobio en bacterias degradadoras de ácido oleico.
- Enriquecimiento de un lodo de un reactor anaerobio en bacterias degradadoras de glicerol.
- Detección de los filos presentes en el lodo de un reactor anaerobio por 454-pirosecuenciación.
- Determinación de los cambios en las comunidades microbianas de los enriquecimientos por la técnica de T-RFLP.

3. METODOLOGÍA

Materiales

Los reactivos obtenidos de o por el laboratorio de Biotecnología incluyen: los kit ZR Soil Microbe DNA Miniprep™ y DNA Clean & Concentrator™ -5 (ambos de Zymo Research Irvine, California, US). La enzima ADN Taq. Polimerasa, junto con buffer de ADN Taq. Buffer + (NH₄)₂ SO₄ – MgCl₂ 10 X (que contiene 750 mM Tris-HCL (pH 8,8 a 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) Tween 20), MgCl₂ 25 mM y 2,5 mM dNTP (los nombrado anteriormente de Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). La enzima FastDigest® *Hae*III y el buffer FastDigest® 10 X (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). El marcador de peso molecular Hyperladder™ 100 bp (Biolone, Londres, GB). Los primers EUB27F y EUB1492, el último marcado en el extremo 5' con la molécula 6-FAM. El intercalante GoodView™ Nucleic Acid Stain (Ecoli s.r.o, Bratislava, SK). El agua cuando especificada ultrapura fue usada agua Ultrapure™ Distilled water (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). El metanol p.a., hexano p.a., y ácido acético p.a. (los anteriores de Dorwil S.A., Buenos Aires, AR), el MgSO₄.7H₂O p.a. (Biopack, Buenos Aires, AR). El cloruro de potasio p.a., cloroformo p.a. y el éter dietílico p.a. (ambos de EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, DE). Las placas de TLC ALUGRAM® SIL G. (Macherey-Nagel, Düren, DE). El aceite (Oliovita, San Juan, AR), el sulfato de cobre en forma hidratada (CuSO₄·5H₂O) 25% cu y el ácido fosfórico 85% grado alimenticio (ambos de Droguería Industrial Uruguay, Emilio Benzo S.A., Montevideo UR). El glicerol adicionado como sustrato p.a. (AppliChem Inc., Darmstadt, DE). El acetato de amonio ≥98% y el periodato de sodio ≥99,8% (ambos de Life Science, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, US), alcohol etílico 95% (Droguería Industrial Uruguay, Emilio Benzo S.A., Montevideo UR).

El solvente acetilacetona 98% (Fluka AG, Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, US) una donación de Mg. Giovanni Galletta.

Los solventes usados en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) incluyen: parte de los nutrientes requeridos para preparar el medio mineral básico, como el cloruro de potasio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, fosfato de potasio monobásico, trazas minerales, resazurin, extracto de levadura, 0,5M Na₂S preparada con Cys 2,5 g/L y Na₂S 2,5 g/L), Biotina, ácido fólico, piridoxina.HCl (B₆), Tiamina.HCl (B₁), riboflavina (B₂), ácido nicotínico, DL-Pantotenato de calcio, cianocobalamina (B₁₂), paraaminobenzoico ácido tioctico (lipoico), NaOH, gas nitrógeno, glicerol. Los materiales incluyeron viales de vidrio, tapones de caucho, precinto de aluminio, Jeringas Descartables BD PLASTIPAK de 1 ml (Gramón Bagó, Montevideo, Uruguay).

El ácido oleico 90% técnico adicionado como sustrato (Sigma Aldrich®, St Louis, Missouri, US) fue obtenido de la Facultad de Química, Cátedra de Microbiología.

Métodos

3.1. Sistema de tratamiento

Se estudió el tanque digestor del sistema de tratamiento de efluentes de la industria láctea Coleme ubicada en el departamento Cerro Largo en Uruguay. El Sistema de tratamiento consta de un tanque de almacenamiento de 50 m³ que recibe el influente y lo dirige hacia un tanque de alimentación. En este punto, el influente se separa hacia dos reactores anaerobios de flujo ascendente con manto de lodos (siglas UASB del inglés *Up-Flow Anaerobic Sludge Bed*) de 40 m³ a los cuales se les aplicó una modificación. Además de contar con un tanque digestor de 5 m³ para los desechos de grasa, se les adicionó, un separador de grasa interno para cada reactor, y un decantador de placas inclinadas de 1 m³ (con una separación de 5 cm y una inclinación de 60°), ubicado después de la descarga de los reactores ya que retiene el lodo que salió de los mismos para re-dirigirlos al tanque de alimentación. El efluente que sale del decantador de placas inclinadas es descargado en las cloacas municipales. (Figura 9, Figura 10).

El tanque digestor cuenta con una entrada y salida del flujo, un calentador que utiliza la energía proporcionada por el gas producido en los reactores UASB, para mantener la temperatura óptima para una mayor digestión (aprox. 37°C) con agitación, así como una salida del gas producido por la digestión de las grasas (principalmente metano e hidrógeno). (Figura 11). Dentro del digestor se acumula una manta de lodo formada por microorganismos.

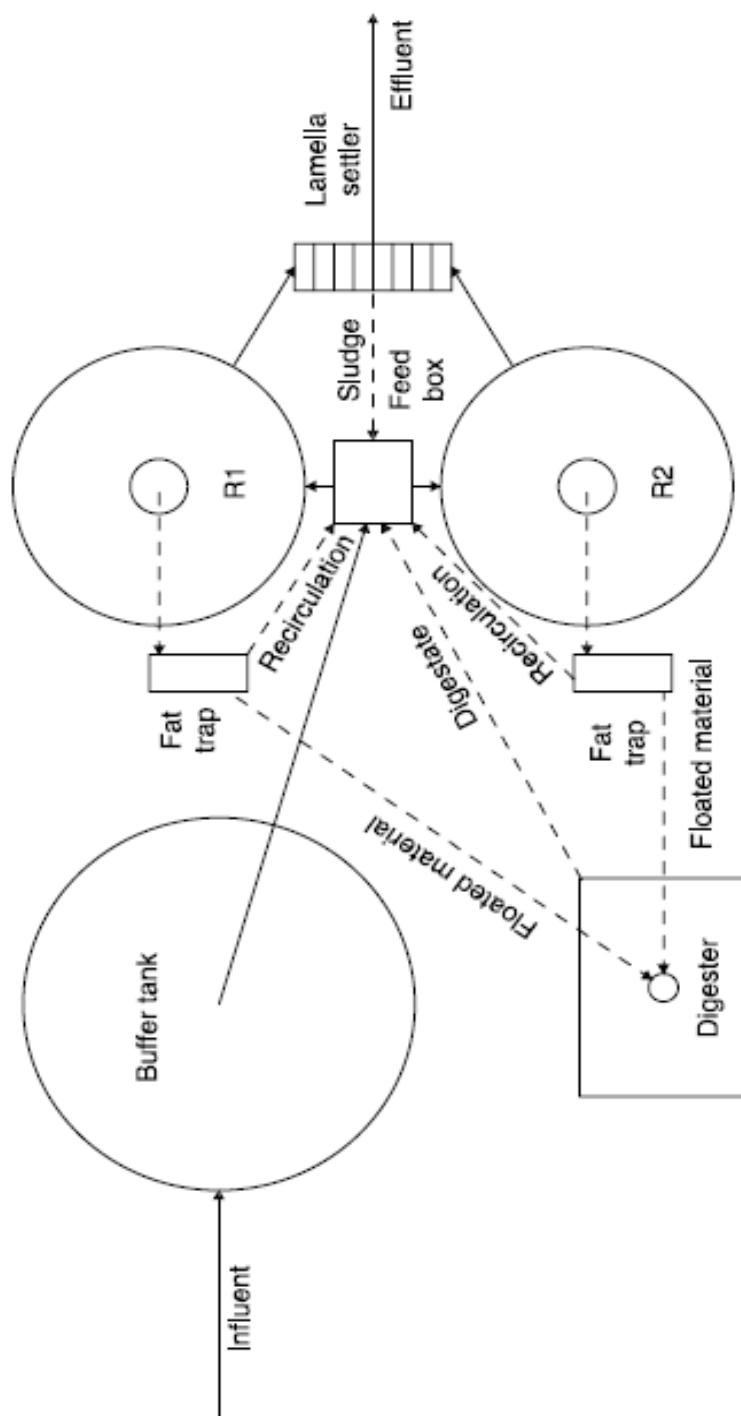


Figura 9. Plano de la planta de tratamiento en la empresa láctea Coleme, ubicada en el departamento de Cerro Largo, Uruguay. La planta está formada de un tanque de almacenamiento, un tanque de alimentación, dos reactores anaerobios UASB (R1 y R2), un tanque digestor, un separador de grasa interno para cada reactor y un decantador de placas inclinadas. Obtenida de Passeggi *et al.* (2012).

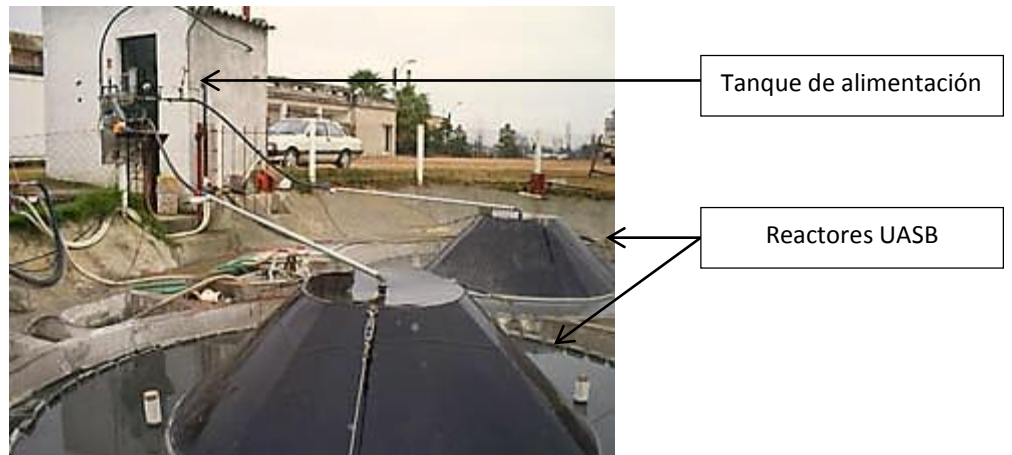


Figura 10. Fotografía de la planta de tratamiento en la empresa láctea Coleme. Se observan los dos reactores UASB, y el tanque de alimentación. Obtenida de “Entrevista: La experiencia de COLEME con su Planta de tratamiento de Efluentes.” Cooperativas Agrarias Federadas (julio 2007).



Figura 11. Fotografía del digestor de grasa de la planta de tratamiento en la empresa láctea Coleme. Obtenida de “biotecnología de procesos para el ambiente”. Departamento de Ingeniería de Reactores, Facultad de Ingeniería.

3.2. Análisis de la comunidad microbiana de una muestra de lodo del reactor R3 mediante 454- pirosecuenciación de los genes de ARNr 16S

La región V4 hipervariable del gen ARNr 16S fue amplificada usando los *primers* universales F563 y R802, y se secuenció utilizando el secuenciador Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences, Branford, CT, US) en el Instituto Indear (Rosario, AR). Las secuencias obtenidas fueron procesadas usando el software Qiime por el equipo bioinformático de INDEAR.

3.3. Muestreo y procesamiento de las muestras

Una muestra de aproximadamente 500 mL del lodo del tanque digestor de la empresa Coleme (Figura 11), fue recolectada por operarios de la empresa y enviada al Laboratorio de Biotecnología. La misma se conservó a 4°C hasta su uso. Previo a la inoculación en medio de cultivo, se centrifugó el lodo a 5.000 rpm durante 15 minutos. Se diluyó al medio con agua destilada y se agitó brevemente. Adicionalmente, para alcanzar una consistencia más líquida se procesó con mortero durante unos minutos.

3.4. Enriquecimientos anaerobios

Se prepararon enriquecimientos a partir del lodo del tanque digestor de la industria láctea Coleme, en medio anaerobio utilizando tres sustratos diferentes: glicerol, ácido oleico y grasa de leche. Los mismos se incubaron a dos temperaturas y se hizo un seguimiento midiendo el gas producido, la desaparición de oleico por TLC y de glicerol por espectrometría UV-Visible. La composición de la comunidad microbiana se determinó por T-RFLP de genes del ARNr 16S.

3.4.1. Preparación de medio de cultivo anaerobio

El medio de cultivo para los enriquecimientos anaerobios fue preparado en el Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE) bajo el asesoramiento del Lic. Jorge Wenzel. Se preparó un medio mineral básico con 0,33 g/L KCl, 0,25 g/L NH₄Cl, 0,45 g/L KH₂PO₄, 1,0 mL trazas minerales (Widdel et al 1983), 7,0 mL resazurina 0,02%, 1g/L extracto de levadura. El pH se ajustó a 6,8 con NaOH 1M. El medio se repartió en viales de vidrio con un volumen tal que el medio ocupe un cuarto del volumen total del frasco, se gaseó con gas nitrógeno, se sellaron con tapones

de caucho y precinto de aluminio, y se autoclavaron. Luego de autoclavar se adicionaron 2 mL de una solución de Ca y Mg con 7,5 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mL de solución de vitaminas compuesta por 2,0 mg/L de Biotina, 2,0 mg/L de ácido fólico, 10,0 mg/L de piridoxina.HCl (B_6), 5,0 mg/L de Tiamina.HCl (B_1), 5,0 mg/L de riboflavina (B_2), 5,0 mg/L de ácido nicotínico, 5,0 mg/L de DL-Pantotenato de calcio, 0,1 mg/L de cianocobalamina (B_{12}), 5,0 mg/L de paraaminobenzoico y 5,0 mg/L de ácido tioctico (lipoico), 4,0 mL de 0,5 M $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 1,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.4.2. Sustratos

Se prepararon dos sustratos distintos: glicerol y ácido oleico.

El glicerol fue diluido en agua ultrapura para agregar 500 μL con jeringa, obteniendo una concentración final de 2,5 g/L en cada vial. Esta concentración fue reportada por B.T. Maru et al., (47) como eficiente para una producción de gas por degradación anaerobia del glicerol por *Thermotoga maritima*.

El ácido oleico fue pesado en una balanza analítica, diluido en SDS 5% y agregado a los viales con jeringa hasta alcanzar una concentración de 1,0 mM en cada vial. Esta concentración fue reportada por D.Z. Souza et al., (41) como la óptima para una producción de gas por degradación anaerobia del ácido oleico en condiciones similares.

3.4.3. Procedimiento experimental

Se incubaron viales de 120 mL con 20 mL de medio de cultivo y 2 % de lodo procesado como se explicó anteriormente. Se hicieron triplicados en medio de cultivo con 2,5 g/L de glicerol y 1 mM de ácido oleico, tomando los viales sin fuente de carbono como blancos del sistema. La incubación se realizó a 37°C y a 55°C en estufa, durante 38 días para los viales con glicerol y 33 días para los viales con ácido oleico. En el día 18 se adicionó 2,5 g/L de glicerol a los triplicados de glicerol, y en el día 31 se adicionó 3,5 g/L de glicerol a los mismos viales. Durante la incubación se tomaron muestras de 500 μL del inóculo cada semana en condiciones asépticas y se guardaron a -20°C. Se midió el gas producido en cada vial con un dispositivo diseñado con una probeta invertida (Figura 12). La probeta se conectó al vial mediante un tubo de diámetro 0,11 mm y largo 70 cm a una jeringa (sin el émbolo) que se inyectó a cada vial para permitir el flujo del gas. Para determinar el volumen de gas producido en los viales triplicados, se restó el volumen de producción de gas medido en el vial blanco.



Figura 12. Dispositivo de medición del gas producido. El dispositivo está compuesto por un vaso de bohemia de 1000 mL con la mitad de agua conteniendo una probeta graduada invertida de 100 mL llena de agua. Del interior de la probeta invertida sale un tubo que la conecta con la jeringa (sin el émbolo) inyectada en el vial, permitiendo el pasaje del gas hacia la probeta.

3.5. Análisis de la comunidad microbiana

3.5.1. Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN de las muestras de los viales con glicerol (días 0 y 38) y con ácido oleico (día 0 y 33) de la primera etapa del experimento a 37°C, usando el kit ZR Soil Microbe DNA Miniprep™ y el protocolo del fabricante al cuál se le hicieron algunas adaptaciones (Zymo Research Irvine, CA, US) que se indican a continuación.

Previo a la extracción se centrifugaron las muestras tomadas a 4.000 g durante 15 minutos para separar las células (pellet) del medio de cultivo (sobrenadante). El sobrenadante se guardó a -20°C para la determinación de sustratos. Las adaptaciones incluyeron, pesar el pellet de cada muestra diluido en 50 µL de agua Ultrapura™ Distilled Water en el paso inicial, homogeneizar durante 6

minutos en el paso de lisis, transferir 500 µL del sobrenadante lisado en el paso de filtración, transferir 850 µL del filtrado con buffer Soil DNA Binding en los dos pasos de unión a la columna Zymo-SpinTMIIC, y por último se eluyó el ADN con 20 µL de buffer de elución de ADN. El ADN extraído fue guardado a -20°C hasta su uso.

3.5.2. *Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)*

Se realizó el método molecular de huella digital T-RFLP a las muestras del ADN extraído. El mismo consta de una PCR con el primer forward marcado con fluoresceína y una etapa de restricción con la enzima *HaeIII*. A continuación se detallan las etapas del mismo:

- PCR:

Se amplificó el gen de ARNr 16S mediante PCR en un volumen total de 50 µL, conteniendo 1 µL de ADN, 5 U de ADN Taq Polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US), 20 pmol de los primers (64) EUB27F [5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'] y EUB1492 [5'-56-FAM-TACCTTGTTACGACTT-3'], 1 X de ADN Taq. Buffer + (NH₄)₂ SO₄ – MgCl₂, 3 mM MgCl₂, y 200 µM cada dNTP. La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador Little Genius BOER (Hangzhou, CN) usando el siguiente programa: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 3 minutos; con un paso final de extensión de 72°C durante 7 minutos. Los tamaños y la presencia de los productos de PCR fueron visualizados en una electroforesis de gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X y 1,5 µL de GoodViewTM Nucleic Acid Stain (Ecoli s.r.o, Bratislava, SK). Se sembró un marcador de peso molecular HyperladderTM 100 bp (Bioline, Londres, GB), y 5 µL de cada muestra junto con 2,5 µL de buffer de corrida.

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit DNA Clean & ConcentratorTM -5 (ZymoResearch, Irvine, US) siguiendo el protocolo del fabricante, y con algunas modificaciones. Las modificaciones incluyeron eluir el ADN en 30 µL de buffer de elución e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

- Cuantificación del ADN

Se cuantificó el ADN de los productos de la PCR, con un Biospec-mini (Schimadzu Corporation, Kyoto, Japan) a 260 nm. Para las medidas, se realizaron diluciones de 1/10 y de 1/20 de los productos de PCR, y la línea de barrido fue establecida con agua Ultrapura™ Distilled Water.

- Digestión con enzima de restricción:

La enzima FastDigest® *Hae*III (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) fue elegida para digerir el ADN ultra-puro siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. La mezcla de digestión, compuesta de 8 µL de producto de PCR purificado (alrededor de 300 y 2500 ng de ADN), 2 µL de buffer FastDigest® 10 X, y 1 µL de enzima de restricción fue incubada a 37°C durante 10 minutos. El ADN digerido fue directamente precipitado con 60 µL de etanol 95% (v/v) durante 30 minutos a 4°C y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 30 minutos. Los pellets de ADN fueron lavados con 100 µL de etanol 70% (v/v), centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos, y luego secados en una estufa a 65°C hasta sequedad total. La cantidad de ADN analizada resultó en una saturación, y por ello se debería repetir el ensayo, analizando aproximadamente 50 ng.

- Separación y detección de fragmentos:

Las digestiones obtenidas para cada muestra fueron analizadas en un secuenciador capilar por el Instituto Pasteur de Montevideo. Para ello los fragmentos precipitados fueron resuspendidos en 8 µL de formamida y 0,3 µL de estándar interno (GeneScan-1200 Liz Standard, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). Los fragmentos se separaron por electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). La corrida se realizó con capilares de 36 cm, el polímero POP-7™ y la matriz DS-33 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US).

El tiempo de inyección fue de 16 segundos, la pre-corrida de 180 segundos y la corrida de 20 minutos, a 15 kV y a una temperatura de 60°C.

3.5.3. Determinación de la presencia de glicerol

Se determinó la presencia de glicerol en las muestras extraídas a los tiempos iniciales y finales de los viales suplementados con glicerol. Para ello, se prepararon estándares de glicerol de concentraciones 2,5 g/L, 1,5 g/L, 0,5 g/L y 0 g/L a un volumen final de 200 µL en una solución solvente conteniendo H₂O destilada/etanol 95 % (1:1). Los estándares se prepararon a partir de una solución de glicerol de referencia 2,5 g/L, como se muestran en la Tabla 3. Las muestras se mezclaron en relación 1:4 con la solución solvente, para alcanzar un volumen final de 200 µL. En tubos de ensayo, tanto a los estándares como a las muestras se les adicionó 120 µL de periodato de sodio 10 mM y se agitó por 30 segundos en un homogeneizador. Luego, se adicionaron 120 µL de una solución de acetilacetona 0,2 M y se trasladaron a un baño maría a 70°C durante 1 minuto, agitando manualmente. Los tubos fueron enseguida enfriados en hielo. Se midió la absorbancia de cada estándar y muestra en un Multiskan™ FC Microplate Photometer a 405 nm (Thermo Scientific, Waltham, US), y se les restó la absorbancia obtenida en la muestra con 0 g/L de glicerol (estándar 1).

Para determinar la concentración glicerol en las muestras, se construyó una curva estándar de Absorbancia vs Concentración (g/L) y a partir de la función de la recta de ajuste se calcularon las concentraciones en cada muestra.

Tabla 3. Preparación de los estándares de glicerol y su concentración final. Se prepararon 4 estándares de glicerol a partir de una solución de glicerol de referencia (2,5 g/L) y la solución solvente (H₂O destilada/etanol 95% (1:1)).

Nombre	Solución de glicerol de referencia (µL)	Solución solvente (mL)	Concentración final (g/L)
Estándar 1	0	200	0,0
Estándar 2	40	160	0,5
Estándar 3	120	80	1,5
Estándar 4	200	0	2,5

3.5.4. Determinación de la presencia de ácido oleico

Se determinó la presencia de ácido oleico en las muestras extraídas a los tiempos iniciales y finales de los viales suplementados con ácido oleico.

Primeramente se extrajeron los lípidos de las muestras siguiendo el método de extracción de Bligh y Dyer (65) con las siguientes adaptaciones:

Se adicionó a cada muestra una mezcla de cloroformo/metanol (1:2) y se homogeneizó durante 4 minutos. Cuando se observó la formación de dos fases, se adicionó más solvente. Se adicionó el mismo volumen que la muestra de KCl 0,88%, se agitó levemente y se dejó descansar hasta observar la formación de dos fases: una fase superior con nutrientes y demás componentes, y una fase inferior con lípidos. Se tomó un volumen igual de cada muestra, se dejó evaporar al aire libre todo el solvente de la fase inferior al aire libre y se pesaron en balanza analítica. La masa de los lípidos totales extraídos se obtuvo por la diferencia entre la masa de los Eppendorf luego de la extracción y la masa de los Eppendorf vacíos.

Segundo, se realizó una separación de las clases lipídicas por cromatografía en capa fina. Los lípidos fueron resuspendidos en cloroformo a una concentración final de 10 mg/mL. Se usó una mezcla para solventes neutros (apolares) formada por hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:2 v/v). La cromatografía se llevó a cabo en una placa de TLC ALUGRAM® SIL G., la cual fue previamente lavada con cloroformo: metanol (2:1) y activada a 100°C durante 30 minutos. Se sembraron aproximadamente 5 µl de cada muestra (10 mg/mL), de aceite de oliva (10 mg/mL) y de ácido oleico 70% técnico (10 mg/mL y 5 mg/mL). Se adicionó la fase móvil trabajando en una campana y se dejó equilibrar los vapores durante 5 minutos aproximadamente, luego se colocó la placa con las muestra ya sembradas en contacto con el solvente, sin que el mismo moje directamente la línea de base. Una vez que el solvente alcanzó más de la mitad de la placa (aproximadamente), se retiró y se dejó secar por unos minutos. Se procedió a revelarla rociándola con una solución de 8% m/v de CuSO₄ en 10% v/v de H₃PO₄. Se dejó escurrir, y se dejó un mínimo de 3 minutos en una estufa a 140°C. Una vez carbonizados los lípidos, se procedió a interpretar la presencia de las distintas clases lipídicas por correlación de los R_f (del inglés, *Ratio of Front*) con los estándares sembrados (aceite de oliva y ácido oleico).

3.5.5. Análisis de resultados de T-RFLP

El software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), fue usado para analizar los perfiles TRF. Los picos con tamaños de 50-1200 pares de bases fueron analizados con una altura mayor a 0,5% de cada muestra. La fluorescencia total de una muestra fue definida como la suma de todas las alturas de los picos de la misma y se interpretó como una medida de la cantidad de ADN que fue sembrada. Los perfiles fueron corregidos manualmente y luego normalizados de acuerdo a lo propuesto por Dunbar et al. (2001)(52) Los perfiles obtenidos fueron analizados en el software PAST 2.17. para determinar el significado de las similitudes o diferencias entre muestras. Las muestras GL 1f y OL 3i no reportaron picos en el cromatograma debido a un problema en la corrida del secuenciador. Se repetirán en una próxima instancia.

4. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

4.1. Producción de gas por degradación anaerobia de glicerol

- Producción real de gas en el ensayo:

Como seguimiento de la degradación de los sustratos en los enriquecimientos se midió el volumen de gas producido. En las incubaciones realizadas en viales de 100 mL, (primer etapa), el volumen total de gas producido luego del primer agregado de glicerol (2,5g/L) fue de $22,0 \pm 2,1$ mL a 37°C , y de $11,0 \pm 0,6$ mL a 55°C al cabo de 17 días (Figura 13). Tras el segundo agregado de glicerol (2,5g/L), se obtuvo un volumen total de gas producido de $19,0 \pm 3,5$ mL a 37°C y de $2,0 \pm 1,7$ mL a 55°C a los 13 días. Y por último, luego del tercer agregado de glicerol, dónde se aumentó la concentración a 3,5 g/L, se obtuvo un volumen total de gas producido de 0 mL a 37°C y de $4,0 \pm 2,2$ mL a 55°C a los 7 días. Estos valores no incluyen el volumen de gas producido por consumo del carbono endógeno en el lodo mismo (blanco sin agregado de sustrato), por lo cual pueden atribuirse al consumo de una fuente de carbono exógena, como ser el glicerol, o intermediarios de la degradación del mismo.

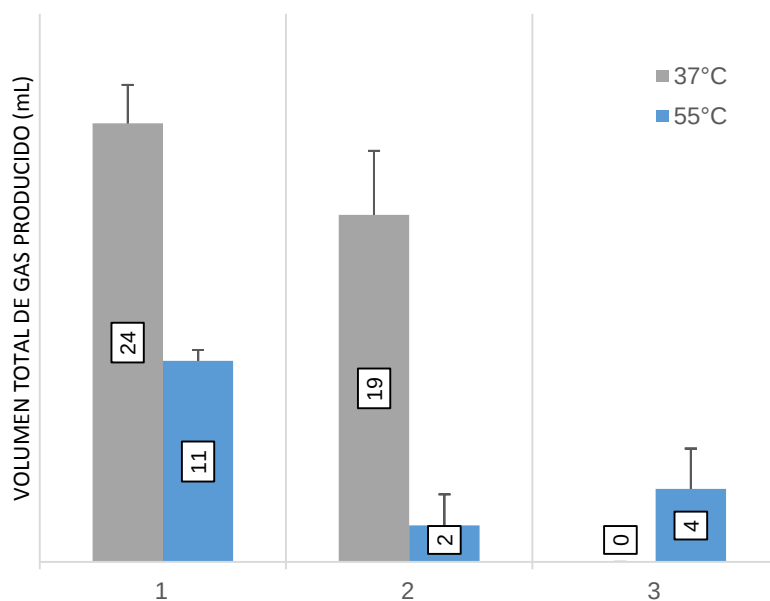


Figura 13. Medida del gas total producido con cada agregado de glicerol. Se midió el volumen total de gas producido (mL) con cada agregado de glicerol a 37°C y a 55°C para los enriquecimientos de la primera etapa. En los dos primeros agregados (1 y 2), se agregó 2,5 g/L de glicerol, mientras que en el tercer y último agregado (3), se agregó 3,5 g/L de glicerol.

Los datos obtenidos para los dos primeros agregados de glicerol, denotan una gran diferencia entre las dos incubaciones. El volumen total de gas producido a 55°C equivale a la mitad o menos del

volumen total de gas producido a 37°C. Dado que el único parámetro operacional que se varió en estos casos fue la temperatura de incubación, se podría inferir que esta diferencia en el volumen total de gas producido se debe principalmente a la diferencia de temperaturas de incubación. Los datos sugieren que a 37°C se degrada más rápido el glicerol obteniéndose mayor cantidad de biogás. Esta temperatura parecería ser más adecuada para la producción de biogás a partir de glicerol.

La diferencia de volumen de producción de gas entre las dos temperaturas se observa también en las medidas en el tiempo (Figura 14). El volumen de gas producido hasta el día 10 es aproximadamente similar para todos los viales (tanto a 37°C como a 55°C), pero en el intervalo entre el día 10 y el día 31, la diferencia incrementa. El volumen de producción de gas en los viales a 55°C es muy bajo y nulo para algunos casos, mientras que a 37°C alcanza su máximo en el día 24 ($17 \pm 2,6$ mL). A la medida siguiente (día 31) la situación es diferente, el volumen de gas producido en los viales a 37°C disminuyó, y se asemeja con el volumen de gas producido a 55°C.

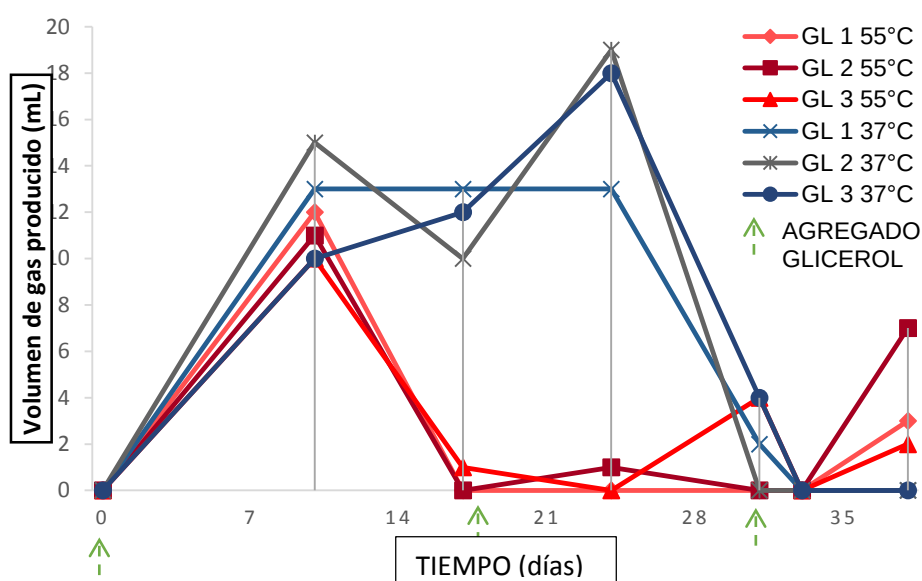


Figura 14. Medida del volumen de gas producido en función del tiempo. Volumen de gas medido (mL) a los días 0, 10, 17, 24, 31, 33 y 38 de la primera etapa del experimento a 37°C y 55°C, para los triplicados con glicerol como sustrato. Los valores no cuentan el volumen de gas producido por consumo del carbono endógeno.

Luego del día 31, en el cuál se aumentó la concentración de glicerol a 3,5 g/L, la situación se revierte. Se registró un volumen total de gas producido a 55°C mayor que a 37°C. Esta discrepancia con el resto de los resultados, se puede atribuir a la variación en la concentración del sustrato, y podría indicar una dificultad en la degradación de una concentración de glicerol mayor a 2,5 g/L a 37°C, que parecería facilitarse a 55°C. También, podría deberse a la presencia de algún intermediario o de un cambio de pH. Éste resultado coincide con lo observado por B.T. Maru *et al.* (2013) (47), dónde se encontró una relación entre la disminución de producción de gas y el aumento en la

concentración de glicerol inicial (2,5 g/L) como único sustrato. Sería interesante realizar un ensayo con mayores concentraciones para evidenciar si efectivamente a mayor temperatura la degradación es más efectiva.

El máximo volumen a 37°C (día 24) no solo es un máximo para dicha temperatura, además es el máximo volumen registrado en todo el ensayo. El máximo volumen a 55°C fue registrado en el día 10 y es de $11 \pm 0,6$ mL. Sin embargo, la inclinación de la pendiente al día 38 del volumen de gas a 55°C, indica que posiblemente el volumen fuera a aumentar en los días siguientes, quizás denotando una degradación anaerobia a 55°C con un ritmo más lento que a 37°C. Las bacterias presentes en el lodo están acostumbradas a degradar grasas y/o derivados a 37°C ya que es la temperatura a la cual opera el reactor R3. Al incubar a 55°C la comunidad microbiana se tiene que adaptar a la nueva condición, lo cual puede reflejarse en una fase de retardo (en inglés *lag phase*) más larga.

La producción de gas medido se asumió ser producto de la degradación del glicerol, dado que es la única fuente de carbono adicionada al medio de cultivo. Sin embargo, más adelante se determinará si el glicerol fue efectivamente consumido. En el alcance de este experimento, no se ha aún confirmado la identidad de los gases producidos. Para identificar el/los gas/es producidos se hará en una próxima instancia una cromatografía de gas.

- Producción teórica de gas en el ensayo:

La degradación anaerobia del glicerol puede producir dos gases distintos. Principalmente, se produce gas hidrógeno si la degradación llega hasta la acetogénesis, y gas metano si la degradación alcanza la metanogénesis (59).

El volumen de gas hidrógeno que teóricamente se produce por consumo de 2,5 g/L de glicerol fue determinado a partir de la ecuación de degradación anaerobia del glicerol en la acetogénesis descrita por B.T. Maru *et al.* (2013) (47). Según esta ecuación, la relación glicerol consumido/hidrógeno producido es 1:3. Por lo cual en la primera etapa del experimento, teóricamente se deberían producir $1,62 \times 10^{-3}$ moles de gas hidrógeno, dado que se adicionaron $5,41 \times 10^{-4}$ moles de glicerol.

Se aplicó la fórmula de gases perfectos $PV=nRT$ donde $P=1$ atm es la presión a la cual se midió el gas, V (L) el volumen de gas producido, $R=0,082$ L.atm/Kmol la constante de los gases y $T=294$ K

la temperatura a la cual se midió el gas, para determinar el volumen de gas que ocupan $n=1,62 \times 10^{-3}$ moles de gas hidrógeno.

1

$$V = \frac{(1,62 \times 10^{-3}) \times (0,082) \times (294)}{1} = 0,039 \text{ L} = 39 \text{ mL}$$

La ecuación (1) determina que teóricamente 2,5 g/L de glicerol deberían producir, por degradación anaerobia, 39 mL de gas hidrógeno. De igual modo, se obtiene un valor de 13 mL de producción de gas CO₂.

Si la degradación del glicerol alcanza la metanogénesis, la relación glicerol consumido/metano producido es 1:1,75. En la primera etapa del experimento, se deberían producir teóricamente $9,5 \times 10^{-4}$ moles de gas metano. Aplicando la fórmula de los gases perfectos, con la misma presión y temperaturas anteriores, se determina el volumen de gas que ocupan $n=9,5 \times 10^{-4}$ moles de gas metano.

2

$$V = \frac{(9,5 \times 10^{-4}) \times (0,082) \times (294)}{1} = 0,023 \text{ L} = 23 \text{ mL}$$

La ecuación (2) describe que, teóricamente la degradación de 2,5 g/L de glicerol produce un volumen de 23 mL de gas metano y 16 mL de gas CO₂.

Los valores de producción teórica de gas total (hidrógeno y dióxido de carbono, metano y dióxido de carbono) se resumen en la Tabla 5, junto con un promedio de los valores de producción real obtenidos.

Tabla 5- Comparación de los datos reales y teóricos de producción de gas en las condiciones del ensayo. Los valores de producción real triplicados fueron promediados para una mejor comparación.

Temperatura (°C)	Producción real (mL)	Producción teórica (mL)	
		acetogénesis	metanogénesis
37	20	52	39
55	7		

La producción de gas real fue menor a la esperada teóricamente. Las razones de esto pueden ser una degradación incompleta del glicerol, una acumulación de intermediarios de la degradación del glicerol que no hayan convertido a gas, o la baja sensibilidad del método de medida del volumen de gas producido.

4.2. Determinación de la presencia de glicerol

Con el propósito de confirmar si se degradó el glicerol en los enriquecimientos, se realizó un ensayo colorimétrico (66), en las muestras al tiempo inicial y al tiempo final a 37°C. La elección de la temperatura se basó en los resultados de gas obtenidos, y en el hecho de que siendo este estudio con propósitos industriales, es más propicio considerar una temperatura reproducible a nivel industrial.

El método colorimétrico se basa en la reacción del glicerol libre con periodato de sodio para formar formaldehído, que a su vez reacciona con acetilacetona formando 3,5 diacetil-1,4 dihidrolutidina. El producto final de la reacción es un compuesto de color amarillo que puede ser detectado por espectrofotometría a 405 nm. Como la formación de este compuesto es proporcional a la cantidad de glicerol que hay presente en la muestra (66), se puede determinar directamente la concentración de glicerol a partir de la concentración del compuesto amarillo. Para ello, primero se hizo una curva de calibración con estándares de glicerol (distintas concentraciones) para luego calcular la concentración en cada muestra a los tiempos inicial y final.

- Curva de calibración:

La curva de calibración y los datos de los estándares de glicerol son representados en la Figura 15 y Tabla 5, respectivamente. Se obtuvo una curva de calibración con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9898.

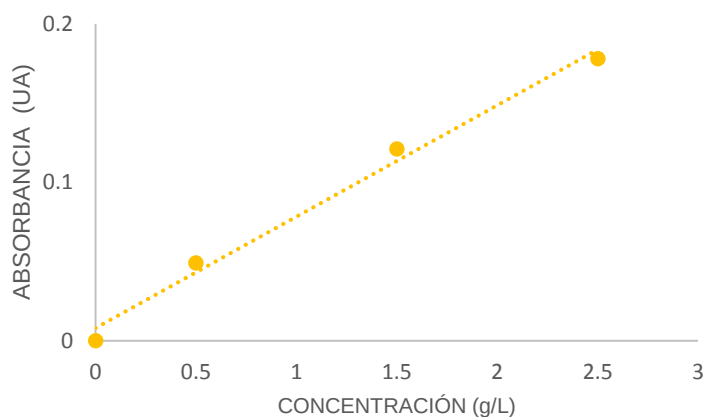


Figura 15. Curva de calibración de los estándares de glicerol.

Tabla 5. Datos de la calibración de los estándares de glicerol

$R^2=0,9898$

Función: $Y=0,0704x+0,0078$

Nombres	Concentración (g/L)	UA (405 nm)
Estándar 1	0,0	0,000
Estándar 2	0,5	0,049
Estándar 3	1,5	0,121
Estándar 4	2,5	0,178

- Contenido de glicerol en muestras de los enriquecimientos de glicerol a tiempo inicial y final:

Se calculó la concentración de glicerol (Tabla 6) en las muestras a tiempo inicial (con el primer agregado de glicerol de 2,5 g/L) y a tiempo final (7 días después del último agregado de glicerol de 3,5 g/L) usando la curva de calibración (Figura 15). Se determinó que la concentración de glicerol

presente en las muestras finales es marcadamente menor que en las muestras iniciales. Se obtuvo una disminución de $69 \pm 17\%$ en promedio. Este resultado sugiere que el glicerol fue degradado por las comunidades microbianas presentes en los enriquecimientos. Se podría considerar entonces que la producción de gas se debe a la degradación de glicerol.

Tabla 6. Concentración de glicerol en muestras de los enriquecimientos de glicerol a tiempo inicial y final del ensayo.

Nombre	Concentración	UA (405 nm)
GL 1i	1,8	0,131
GL 2i	1,9	0,141
GL 3i	1,6	0,121
GL 1f	0,5	0,044
GL 2f	0,9	0,074
GL 3f	0,2	0,025

En la Tabla 6, se destaca que las muestras iniciales tienen una concentración menor a la del agregado (2,5 g/L). Esto se puede explicar por errores en la manipulación, ya que al manipular volúmenes tan chicos es posible que se haya perdido muestra resultando en una dilución mayor. También puede explicarse por una baja precisión del ensayo. Es posible, que el mismo no sea del todo óptimo para concentraciones bajas de glicerol. Sería necesario repetir el ensayo para confirmar la autenticidad de los resultados obtenidos.

La concentración real de glicerol al tiempo inicial determinada anteriormente, permite de determinar una nueva producción de gas teórica, más acorde al ensayo. Con una concentración de glicerol de 1,8 g/L (valor promediado) se obtendría una producción de gas total de 37 mL para la acetogénesis (28 mL de hidrógeno y 9 mL de dióxido de carbono) y una producción de gas total de 28 mL para la metanogénesis (16 mL de metano y 12 mL de dióxido de carbono). Estos valores teóricos se acercan a los valores de producción real de gas en el ensayo.

4.3. Producción de gas por degradación anaerobia de ácido oleico

-Producción real de gas en el ensayo:

En los viales suplementados con 1mM de ácido oleico a 37°C y a 55°C no se observó producción de gas neto. Inicialmente se obtuvieron volúmenes de gas inferiores al volumen de gas producido por consumo de carbono endógeno, y al cabo de 14 días, se registraron solo valores nulos.

-Producción teórica de gas en el ensayo:

En el estudio realizado por D.Z. Souza *et al.* (2007) (41) se analizó la producción de gas por degradación anaeróbica a 37°C de 1 mM de ácido oleico. En los resultados obtenidos, se reportó que la producción de gas aumentó al cabo del día 30 alcanzando un valor de 0,64 mL. Teniendo esto en cuenta, en este ensayo pueden darse tres situaciones. Por un lado, es posible que el ácido oleico no haya sido degradado, o que su degradación se haya alcanzado la producción de gas. Por otro lado es posible que haya producción de gas en los enriquecimientos, pero de ser tan baja no puede ser apreciada con el método de medición elegido.

La ecuación de degradación del ácido oleico presentada por D.Z Souza *et al.* (2007) (41) describe una relación ácido oleico consumido/hidrogeno producido de 1:15 para la descomposición acetogénica, y una relación de ácido oleico consumido/metano producido de 1:12,5 si se alcanza la descomposición metanogénica. Es decir, teóricamente una concentración de 1 mM de oleico produciría 7,2 mL de hidrógeno, y 6,1 mL de metano. Estos valores teóricos implican que la degradación sea total (o casi), lo cual en general no es el caso para ácidos grasos de cadena larga, dadas las diversas condiciones que inhiben la degradación de los mismos (7). Además, son volúmenes muy bajos para el método de medida que se usó.

Para confirmar si hubo degradación anaerobia de ácido oleico por las bacterias presentes en el lodo inoculado, se realizó una cromatografía de capa fina (TLC) de las muestras de los tiempos inicial y final del ensayo a 37°C. Se toma en cuenta únicamente dicha temperatura ya que según varios estudios la degradación de oleico es óptima a 37°C (8) y como ya nombrado anteriormente se trata de una temperatura reproducible a nivel industrial.

4.4. Determinación de la presencia de ácido oleico

Se determinó por cromatografía en capa fina (TLC) la presencia de ácido oleico en las muestras de medio extraídas de los viales OL 1, 2 y 3 con ácido oleico como sustrato, a los tiempos inicial y final. Previo al sembrado en la placa, se extrajeron los lípidos de las muestras, con el método de Bligh y Dyer (65), y por gravimetría se determinó la masa de lípidos, para sembrar en la placa la misma concentración para cada muestra y lograr una buena comparación.

En la cromatografía de capa fina se observaron bandas en el aceite correspondientes a: monoglicéridos, diglicéridos (1,2 diglicéridos y 1,3 diglicéridos), ácidos grasos libres, y triglicéridos (14). En la muestra de oleico 70% técnico sembrada se observó una única banda al mismo R_f que los ácidos grasos libres del aceite. En las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico a tiempo inicial sembradas se observó la presencia de ésta misma banda mientras que en las muestras de a tiempo final no se observó (Figura 16). Se puede co-relacionar la banda observada con la banda observada en el ácido oleico 70% técnico sembrado, ya que tienen el mismo R_f . La presencia de dicha banda indica que en las muestras a tiempo inicial hay ácido oleico mientras que en las muestras finales no hay ácido oleico (apreciable con la sensibilidad de la técnica). Este resultado significa que el ácido oleico fue consumido durante la incubación por la comunidad microbológica presente en los enriquecimientos.

A pesar de no haber registrado producción de gas a 37°C, la técnica de cromatografía en capa fina permitió determinar que el ácido oleico fue consumido durante la incubación. Entonces, el no haber registrado producción de gas podría deberse a una degradación incompleta del ácido oleico o a la baja sensibilidad del método de medición de gas. Para concluir al respecto se debería confirmar si hay presencia de intermediarios, realizar incubaciones más largas o aumentar la sensibilidad del método de medición de gas.

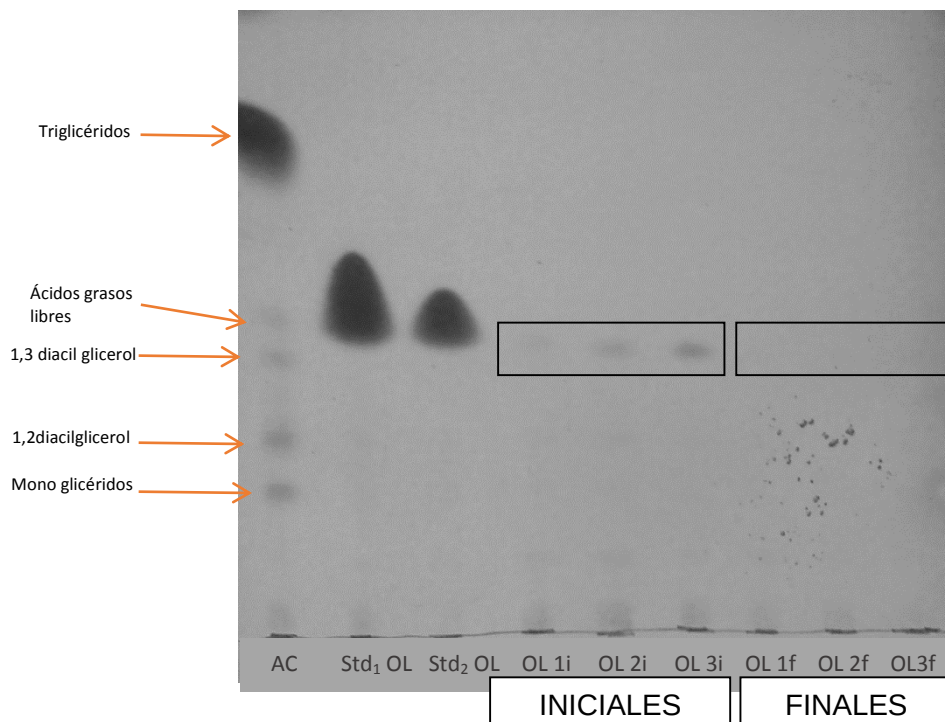


Figura 16. Determinación de la presencia de ácido oleico en muestras OL. Se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) para la determinación de la presencia de ácido oleico en las muestras OL 1, OL 2 y OL 3 a los tiempos inicial y final. De izq. a der. se sembró una concentración de 10 mg/mL de aceite de oliva, 19 mg/mL (Std₁) y 5 mg/mL (Std₂) de ácido oleico 70% técnico (el mismo ácido oleico agregado como sustrato al medio de cultivo), y 10 mg/mL de las muestras de OL 1, OL 2 y OL 3 al tiempo inicial, y OL 1, OL 2 y OL 3 al tiempo final. La separación de las clases lipídicas en el aceite se muestras a la izquierda con flechas.

4.5. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S

Las medidas del volumen de producción de gas y los ensayos de determinación de la presencia del sustrato en las muestras iniciales y finales, permitió determinar que la comunidad microbiana presente en los enriquecimientos, se encuentra activa y degradando los sustratos proporcionados en condiciones anaerobias a 37°C. Al adicionar un único sustrato en particular, como el glicerol o el ácido oleico, se está forzando a la comunidad a adaptarse a las nuevas condiciones. Por ello, la comunidad presente en la muestra a tiempo inicial debería haber variado a lo largo de incubación. Se buscó monitorear el cambio en la estructura y composición de la comunidad microbiana a lo largo de la incubación, mediante la técnica T-RFLP del gen ARNr 16S.

Se realizó extracción de ADN de las muestras de los tiempos inicial y final de los enriquecimientos de glicerol (1, 2 y 3) y de ácido oleico (1, 2 y 3,) a 37°C. El ADN extraído con el kit ZR SoilMicrobe DNA Miniprep™ fue sembrado en un gel de agarosa 1%, donde no se observó la presencia de ADN (no se muestra). Esto podría deberse a la baja concentración de ADN extraída a partir de las muestras de 500 µL. Por esta razón es que se realizaron nuevas incubaciones en una segunda

etapa del procedimiento, para repetir el estudio con un mayor volumen, tomando muestras de mayor volumen también.

A pesar de la baja concentración de ADN se logró amplificar el gen de ARNr 16S con *primers* específicos. Se obtuvieron fragmentos de 1500 pb aproximadamente (Figura 17), lo cual coincide con el tamaño del fragmento del gen ARNr 16S amplificado en bacterias (50).

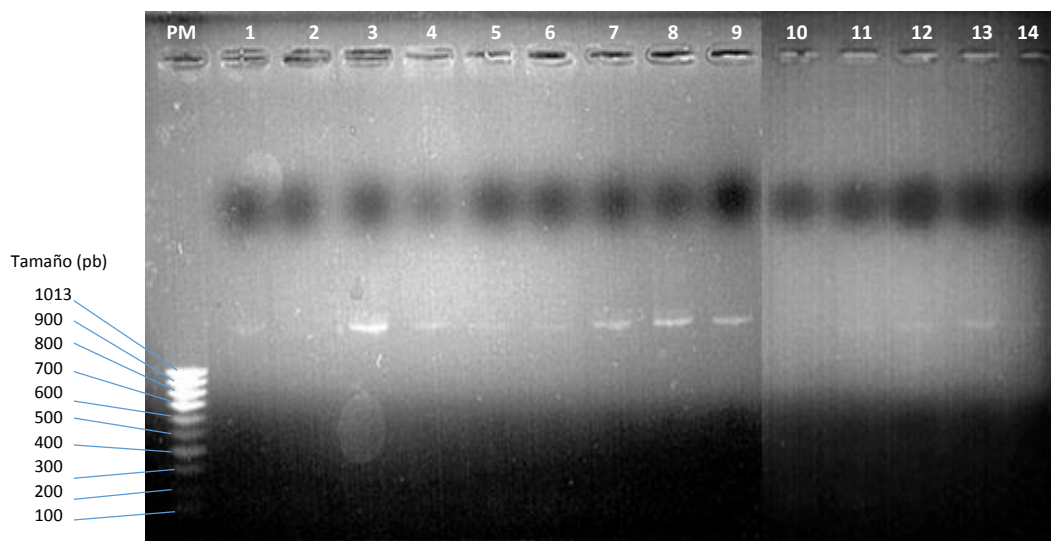


Figura 17. Gel de electroforesis de agarosa 1% para confirmar la presencia de los productos de PCR. De izq. a der. se sembró un marcador de peso molecular HyperLadder I 100 pb (carril 1), los triplicados de GL iniciales (carriles 2,3 y 4), los triplicados de GL finales (carriles 5,6 y 7), los triplicados de OL iniciales (carriles 8,9 y 10), un control negativo (carril 11), un control positivo (carril 12) y los triplicados de OL finales (carriles 13,14 y 15).

Se midió la concentración de ADN en las mismas muestras y se obtuvieron los valores presentados a continuación (Tabla 7):

Tabla 7. Concentración de ADN en muestras de los enriquecimientos de glicerol y de oleico en los tiempos inicial y final.

Muestra		Concentración ADN (ng/μl)
Inicial	GL 1i	55,52
	GL 2i	32,3
	GL 3i	74,6
	OL 1i	31,3
	OL 2i	29,6
	OL 3i	44,8
	GL 1f	81,5
	GL 2f	10,4
	GL 3f	28,7
	OL 1f	12,1

	OL 2f	51,6
	OL 3f	25,0

4.6. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S en las muestras de los enriquecimientos de glicerol

- Abundancias relativas de la composición microbiana en las muestras de los enriquecimientos de glicerol

A partir de los datos obtenidos por T-RFLP se realizaron gráficas de abundancia relativa, agrupamientos por índice de Bray Curtis y Análisis de componentes principales. A partir del análisis de la abundancia relativa de T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol a tiempo final, se detectaron 4 picos (296 pb, 285 pb, 283 pb y 260 pb en la Figura18) que no se encuentran presentes en las muestras iniciales. Entre estos, los picos con mayor abundancia relativa son el de 296 pb, y de 285 pb. Además, los picos correspondientes a los tamaños 227 pb, 213 pb, 75 pb y 63 pb, se encuentran presentes en las muestras finales, pero con una abundancia mucho mayor en el tiempo final. Los picos 227 pb y 213 pb, tienen una abundancia relativa de 13% en una de las muestras a tiempo final (en la muestra GL 3f para el pico 227 pb y en la muestra GL 2f para el pico 213 pb).

Estos resultados demuestran que la comunidad bacteriana sufrió un proceso de adaptación durante los 38 días de incubación con glicerol como fuente de carbono. Se observaron dos perfiles de T-RFs que aumentaron notoriamente su abundancia relativa al tiempo final, lo que podría significar que se trata de posiblemente dos grupos bacterianos que encontraron buenas condiciones para su crecimiento. Otros perfiles aparecieron únicamente al tiempo final, en este caso podría tratarse de grupos en muy baja concentración inicialmente que lograron multiplicarse como resultado de la incubación y cuyo metabolismo es óptimo para la degradación de glicerol.

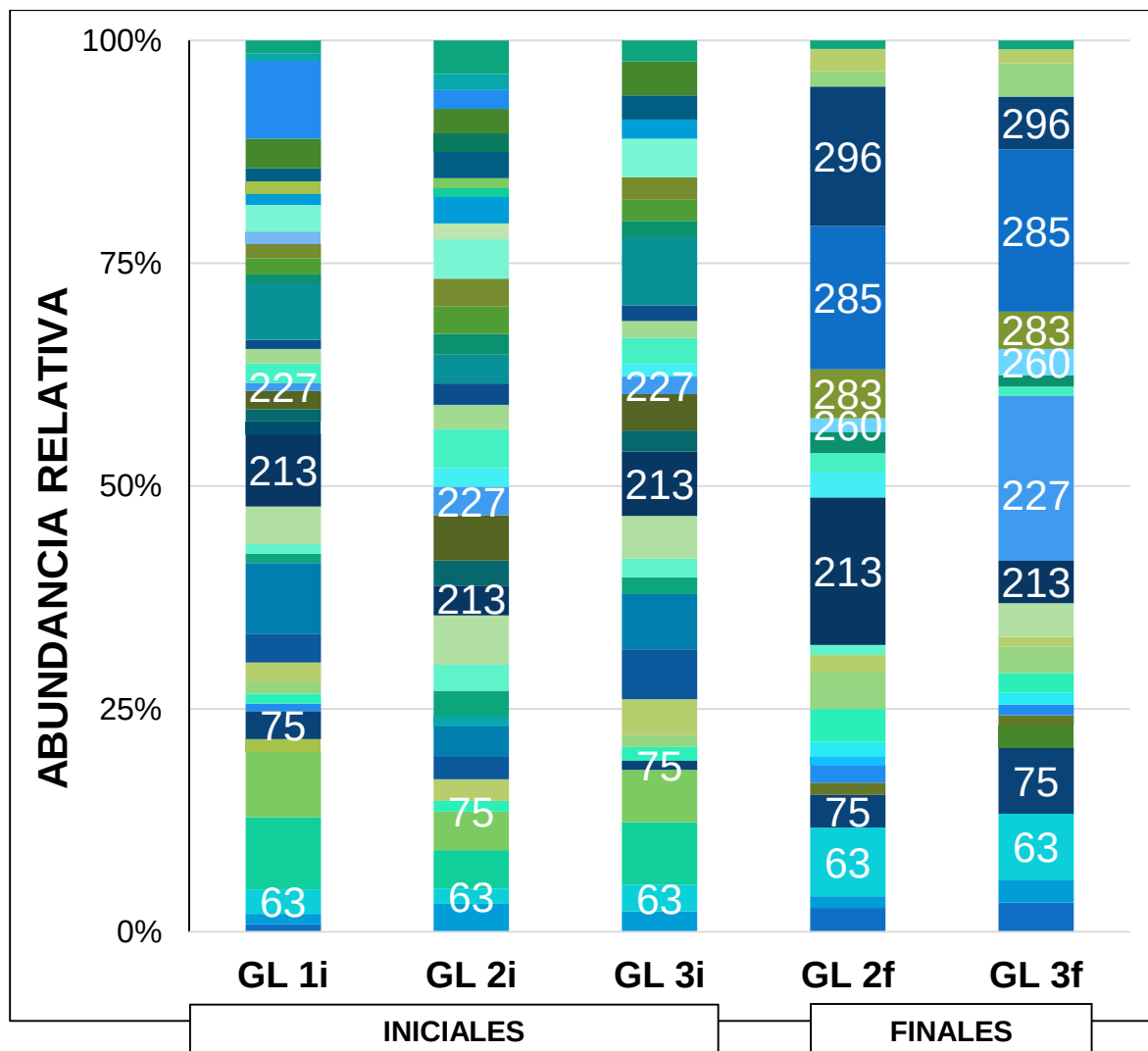


Figura 18. Abundancias relativas de los perfiles T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol. Se presentan las abundancias relativas de T-RFs en perfiles TRFs normalizados generados por la digestión con la enzima *HaeIII*, de las amplificaciones del gen ARNr 16S en las muestras GL 1,2 y 3 al tiempo inicial, y GL 2 y 3 al tiempo final. Cada color equivale a un pico (y tamaño) único, y se destacan los picos principales. Realizada en Microsoft Excel 2013.

- **Análisis de *cluster* y de componentes principales en las muestras de los enriquecimientos de glicerol**

El análisis por agrupamiento de los resultados de abundancia relativa de los perfiles T-RFs de las muestras de glicerol muestra un agrupamiento de las muestras iniciales con una similitud mayor a 0,6 aproximadamente y de las muestras finales con una similitud también mayor a 0,6 (Figura 19). El análisis de componentes principales de las muestras de glicerol sigue la misma tendencia: las muestras a tiempo inicial están muy agrupadas y en un mismo cuadrante del diagrama, mientras que las muestras a tiempo final se separan en dos cuadrantes (distintos del cuadrante de las muestras iniciales) (Figura 20). Además, se pueden apreciar los perfiles T-RFs que tienen un peso

mayor en tal diferencia, los mismos coinciden con casi todos los distinguidos anteriormente en el análisis de abundancia relativa (296 pb, 285 pb, 227 pb y 213 pb).

Estos dos análisis, aportan un respaldo estadístico a lo obtenido con el análisis de abundancia relativas. Se observa que las comunidades presentes en las muestras finales son distintos de aquellos en las muestras iniciales.

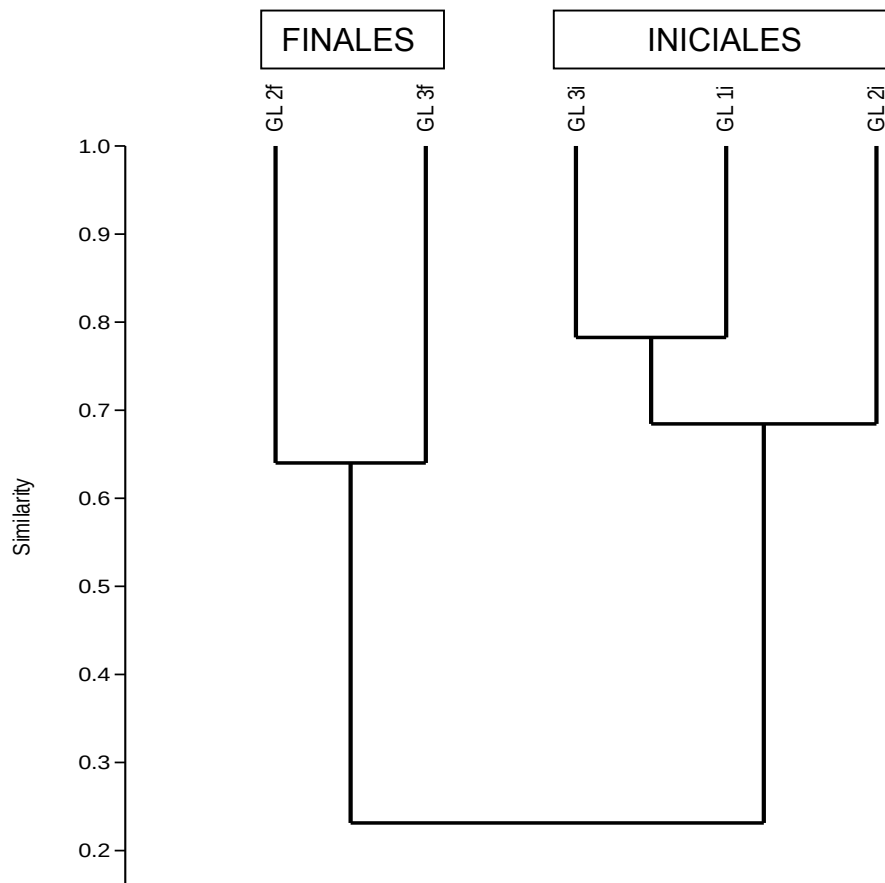


Figura 19. Análisis de *cluster* de los perfiles T-RFs obtenidos para las muestras de los enriquecimientos de glicerol. Se hizo un análisis de *cluster* con el algoritmo *Pair-Group* y la fórmula de similitud de Bray-Curtis (67) de los perfiles T-RFs obtenidos de las muestras GL a tiempos inicial y final. El eje vertical muestra el índice de similitud que varía de 0,2 a 1,0. Realizado en el software PAST versión 2.17c.

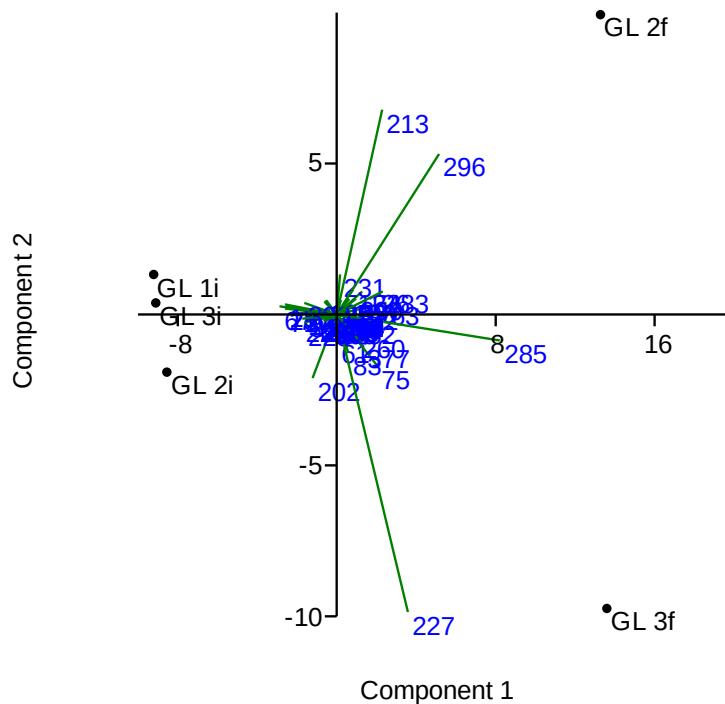


Figura 20. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de los enriquecimientos de glicerol. El análisis fue realizado con los perfiles T-RFs de las muestras de GL de los tiempos inicial y final. El componente 1 explica el 69% y el componente 2 el 23 % de la variación. Los puntos negros representan a las distintas muestras, y las líneas azules a los distintos picos. Realizado en el software PAST 2.17c.

- Análisis de las comunidades por índices de diversidad de las muestras de los enriquecimientos de glicerol

Se calcularon los índices de diversidad (Simpson, Shannon y Chao) de los perfiles T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol (Tabla 8). El índice de Simpson parte de la base de que un sistema es más diverso cuanto menos dominancia de especies hay, y por ende, la distribución es más equitativa. Mide la uniformidad de la comunidad en una escala del 0 al 1, siendo 1 la mayor uniformidad posible. El índice de Shannon contempla la cantidad de especies presentes en la totalidad de las muestras y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies. Sus valores varían entre 1 y 4,5. Un mayor valor del índice indica una mayor biodiversidad, e índices de 3 son considerados muy biodiversos. El índice de Chao estima la riqueza total de especies en la muestra. Este índice permite confirmar los resultados obtenidos en el análisis de abundancia relativa ya que los distintos colores en dicha gráfica representan un grupo bacteriano distinto en la comunidad, y la suma de todos los grupos equivale al índice de Chao (68).

El cálculo de índices de diversidad de los perfiles T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol (Tabla 8), permitió observar que las dos muestras finales (GL 2f y GL 3f) son menos

diversas que las muestras iniciales, con valores del índice de Simpson de 0,90 y 0,91 respectivamente, en comparación con índice más cercano a 1 para las muestras iniciales. Todas las muestras iniciales son biodiversas, ya que tienen un índice de Shannon mayor a 3, mientras que las muestras finales tienen un índice de Shannon menor a 3, y por ende no son consideradas como biodiversas. Y por último, los perfiles mostraron en las muestras iniciales una variedad de 33 picos en promedio contra 23 picos en promedio en las muestras finales.

Tabla 8. Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol a tiempos inicial y final. Obtenidos en el software PAST 2.17c.

	GL 1i	GL 2i	GL 3i	GL 2f	GL3f
Simpson_1_D	0,95	0,97	0,96	0,90	0,91
Shannon_H	3,2	3,5	3,3	2,7	2,7
Evenness_e^{H/S}	0,73	0,93	0,86	0,64	0,66
Chao_1	34	35	30	23	23

4.7. Análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP del gen ARNr 16S en las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico

- **Abundancias relativas de la composición microbiana en las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico**

A partir de las abundancias relativas obtenidas a partir del T-RFLP para las muestras de a tiempo final se observaron 3 picos con una destacada abundancia relativa no presentes en las muestras iniciales. Los mismos corresponden a los tamaños 285 pb, 283 pb y 71 pb. Además, hay picos cuya baja abundancia relativa en las muestras iniciales se vio aumentada en las muestras finales. Es el caso de los picos que corresponden a los tamaños 236 pb y 63 pb. El fragmento 236 pb tiene además la abundancia relativa mayor a todas (13% en la muestra OL 3f).

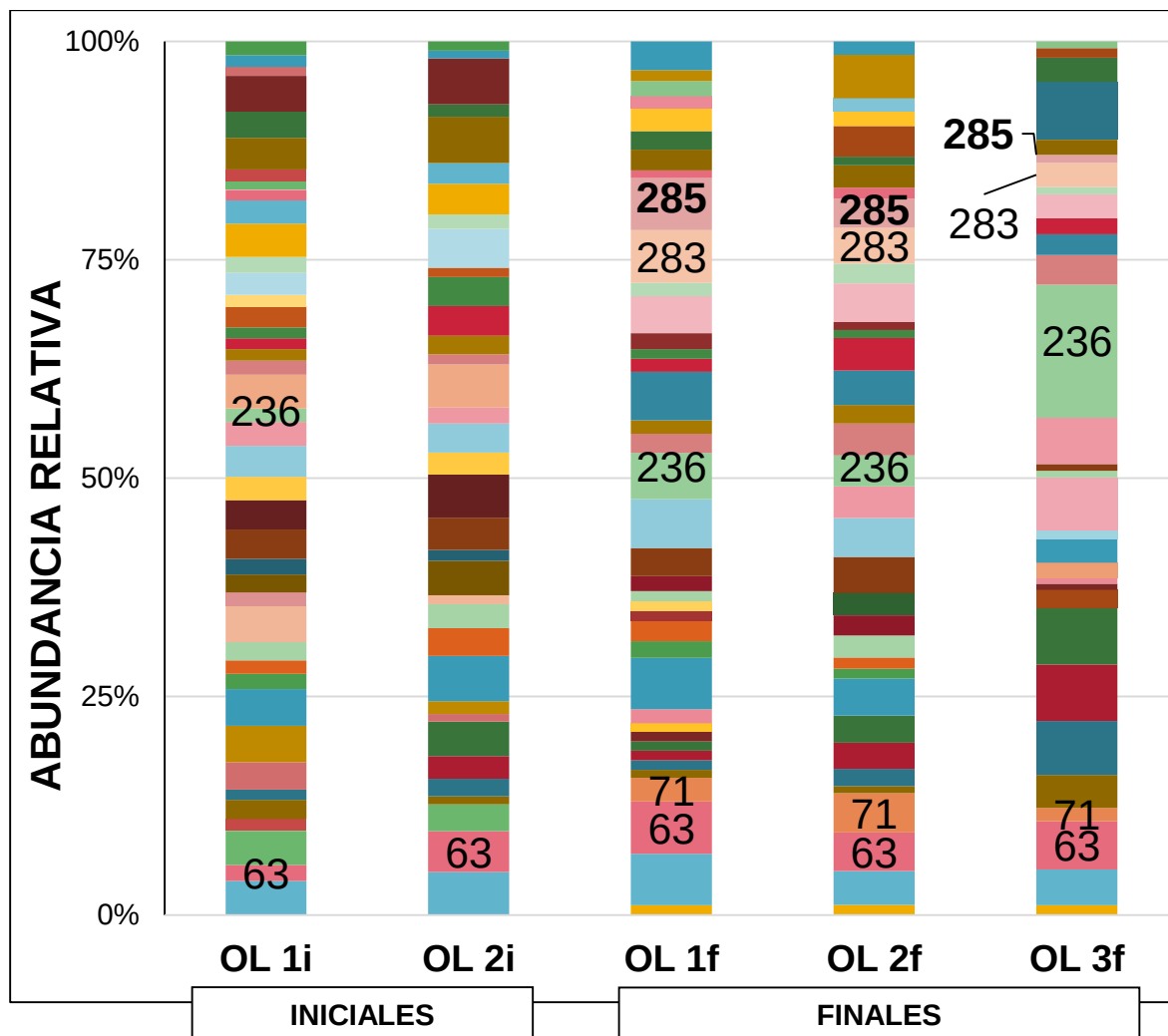


Figura 22. Abundancias relativas de los perfiles T-RFs de las muestras con ácido oleico. Se presentan las abundancias relativas de T-RFs en perfiles T-RFs normalizados generados por la digestión con la enzima, de las amplificaciones del gen ARNr 16S en las muestras OL 1,2 y 3 al tiempo inicial, OL 2 y 3 al tiempo final. Cada color equivale a un pico (y tamaño) único, y se destacan los picos principales. Realizada en Microsoft Excel 2013.

De estos resultados, se desprende que la comunidad bacteriana final se diferenció de la comunidad inicial como resultados de la incubación durante 33 días, en un medio suplementado con ácido oleico. Hay un grupo bacteriano presente en el tiempo inicial que mostró una mayor abundancia al tiempo final, lo que indica que su adaptación a la fuente de carbono le permitió crecer en mayor abundancia. Los tres perfiles de T-RFs que aparecieron únicamente al tiempo final son posiblemente grupos bacterianos degradadores de ácido oleico.

- **Análisis de *cluster* y de componentes principales en las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico**

El análisis de agrupamiento de los perfiles T-RFs en las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico, permite observar una marcada separación entre las muestras iniciales y las muestras finales

(Figura 23). Las muestras iniciales se agrupan con una similitud de 0,70, mientras que las muestras finales se agrupan con una similitud de 0,47, debido a la muestra OL 3f que se diferencia considerablemente de las otras dos. Es decir, las muestras finales son más diversas que las muestras iniciales. Esto se observa además en el análisis de componentes principales (Figura 24). En el diagrama, se observa que las muestras iniciales están casi superpuestas, y que las muestras finales se separan en dos distintos cuadrante, la muestra OL 3f por un lado y las otras dos por el otro. Adicionalmente, se distingue el pico responsable de tal separación en las muestras finales que es el mismo mencionado en el análisis de abundancia relativa (236 pb).

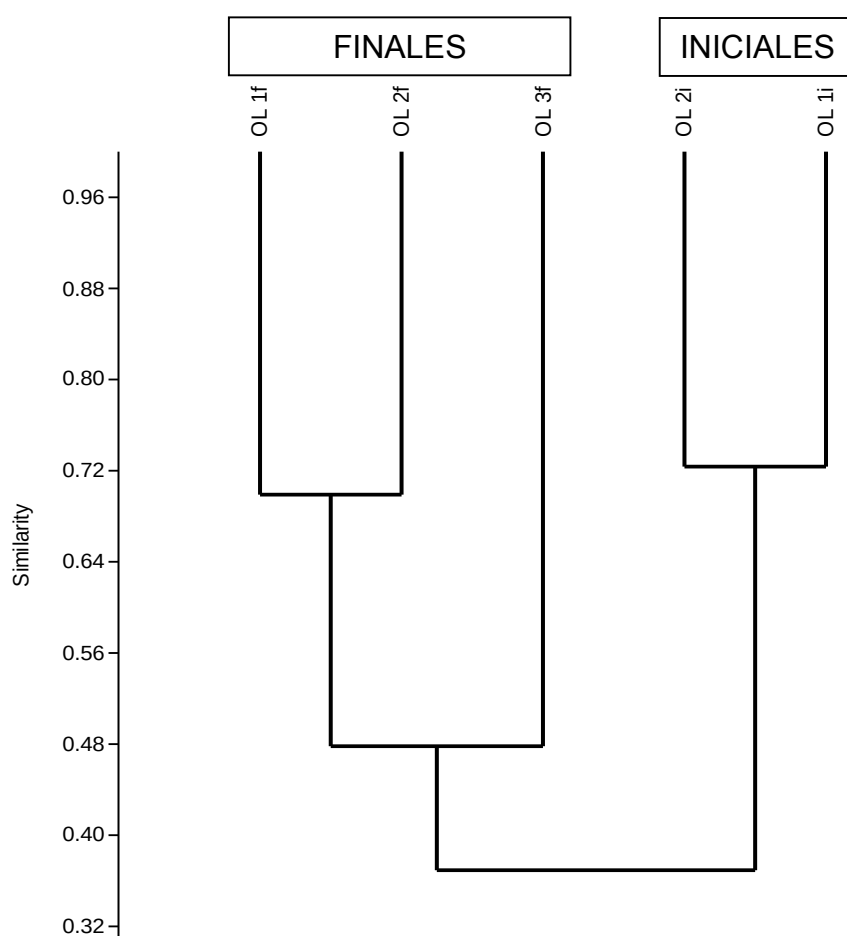


Figura 23. Análisis de *cluster* de los perfiles T-RFs obtenidos para las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico. Se hizo un análisis de *cluster* con el algoritmo *Pair-Group* y la fórmula de similitud de Bray-Curtis (67) de los perfiles T-RFs obtenidos de las muestras OL a tiempos inicial y final. El eje vertical muestra el índice de similitud que varía de 0,32 a 1,0. Realizado en el software PAST versión 2.17c.

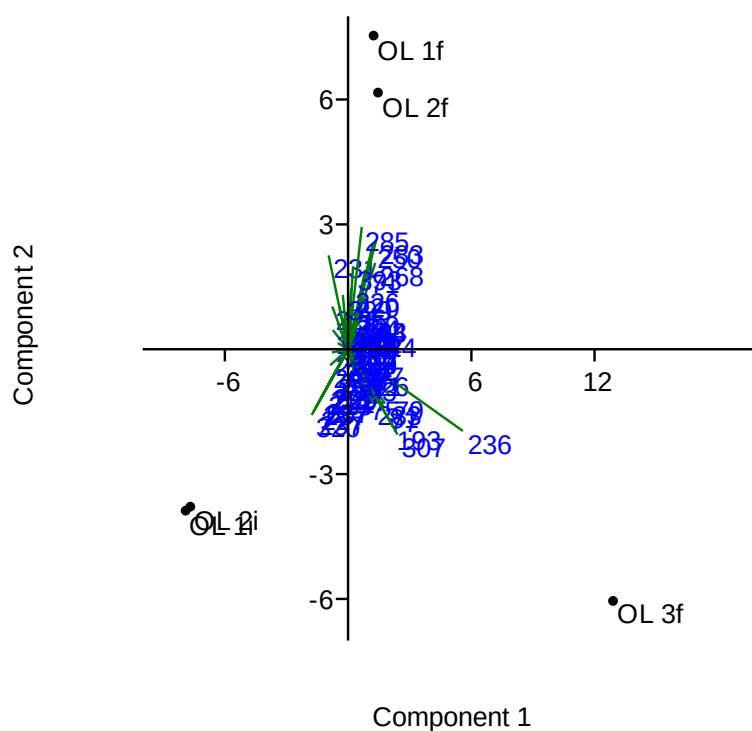


Figura 24. Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico. Se realizó el análisis de los perfiles T-RFs obtenidos de las muestras OL de los tiempos inicial y final. El componente 1 explica el 60 % y el componente 2 el 31% de la variación. Las muestras son representadas por los puntos negros, y las líneas azules equivalen a los distintos picos. Realizado en el software PAST 2.17c.

- Análisis de las comunidades por índices de diversidad de las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico

A partir de los datos obtenidos de perfiles T-RFs en las muestras de ácido oleico, se calcularon los índices de diversidad Simpson, Shannon, y Chao (Tabla 9).

Según los valores calculados, solo la muestra OL 3f se distingue de las demás por una menor diversidad. Las muestras OL 1f y OL 2f tienen índices de Simpson muy similares a las muestras iniciales. Según el índice de Shannon, son todas las muestras son biodiversas, pero la muestra OL 3f nuevamente se distingue por una biodiversidad algo inferior al del resto de las muestras.

El índice de Chao describe que las muestras iniciales alcanzan un promedio de 37 picos contra un promedio similar para las muestras finales, de 35 picos.

Tabla 9. Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles TRFs de las muestras de los enriquecimientos de ácido oleico a tiempos inicial y final. Obtenidos en el software PAST 2.17c.

	OL 1i	OL 2i	OL 1f	OL 2f	OL 3f
Simpson_1_D	0,97	0,96	0,96	0,97	0,94
Shannon_H	3,6	3,4	3,4	3,5	3,1
Evenness_e^{HS}	0,91	0,87	0,81	0,89	0,72
Chao_1	39	35	39	36	31

4.8. Comparación de los resultados obtenidos en los dos enriquecimientos

Comparando los perfiles T-RFs de las muestras de glicerol y de ácido oleico, se observa que dos T-RFs se encuentran presentes en los tiempos finales de los enriquecimientos de glicerol y de ácido oleico, lo que podría implicar que se trata de grupos bacterianos capaces de consumir ambos sustratos o un intermediario de la degradación de estos (por ejemplo acetato).

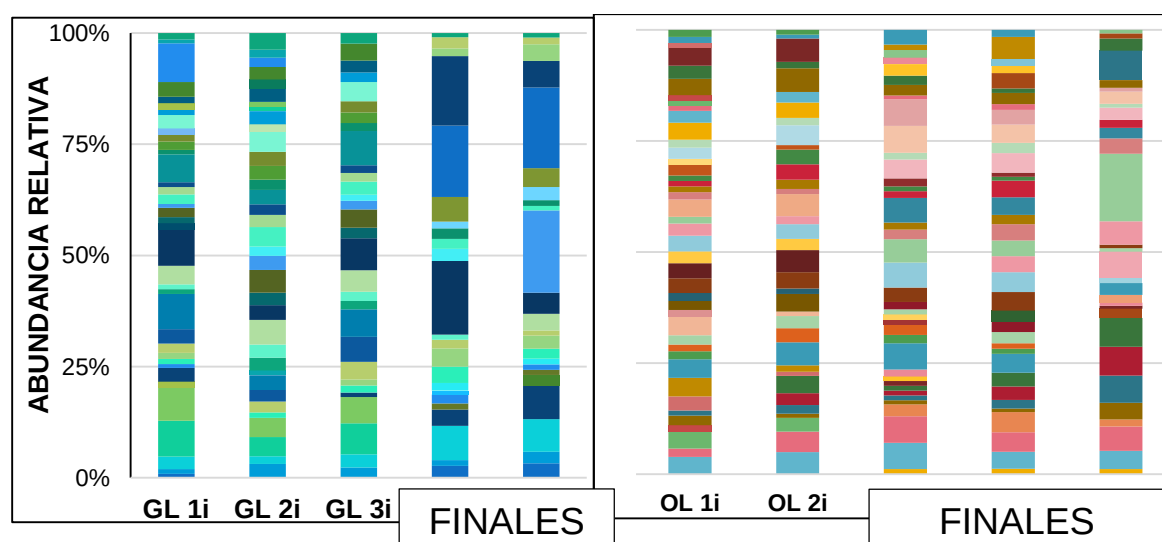


Figura 25. Abundancias relativas de los perfiles T-RFs de las muestras de los enriquecimientos de glicerol (izq.) y de ácido oleico (der.). Se hizo una agrupación de las Figuras 18 y 22 para una mejor comparación de los tiempos finales de los enriquecimientos de glicerol y de ácido oleico.

También se observa que la comunidad bacteriana en los enriquecimientos de glicerol se diferenció en una mayor medida que la comunidad bacteriana en los enriquecimientos de oleico. Esto se aprecia comparando los perfiles T-RFs de los tiempos finales para ambos enriquecimientos, así como en los índices de similitud obtenidos con los análisis de *cluster*. La similitud entre las muestras iniciales y finales del enriquecimiento de glicerol fue de 0,15 en comparación con una similitud de

0,32 para las muestras iniciales y finales en el enriquecimiento de ácido oleico. Así mismo, el análisis de componentes principales y los índices de diversidad respaldan lo anteriormente estipulado.

Esto parecería indicar que la comunidad microbiana presente en el lodo se adaptó mejor a la degradación de glicerol. Quizás se trate en su mayoría de organismos capaces de degradar dicho compuesto por lo cual la adaptación al sustrato fue rápida. También, se podría considerar que la degradación de ácido oleico, al ser más compleja, ocasionó la inhibición de algunas vías metabólicas, derivando en una menor adaptación de la comunidad en el enriquecimiento de ácido oleico.

4.9. Análisis de la 454- pirosecuenciación de la muestra de lodo del digestor de grasa

La muestra del lodo del digestor de grasa, que fue utilizada como inóculo inicial en los enriquecimientos, fue pirosecuenciada. El propósito de este análisis fue de identificar filogenéticamente a los miembros de la comunidad bacteriana presentes en el inóculo inicial del ensayo, así como aproximarse a una identificación de los T-RFs más abundantes en las muestras iniciales y finales de ambos enriquecimientos.

Se analizaron un total de 4.309 secuencias, y se detectaron 17 filos (Tabla 10). Los filos más abundantes correspondieron a Proteobacteria (18 %), Thermotogae (17 %) y Chloroflexi (8,9 %). Los géneros más abundantes (abundancia mayor a 0,5 %) en la muestra el inóculo se muestran en la Tabla 11. Se observa claramente que dos de ellos predominan frente al resto (*Kosmotoga* 10,0 % y *Smithella* 10,0 %).

Kosmotoga (del filo Thermotogae) es un género representado únicamente por dos especies identificadas, *Kosmotoga olearia* y *Kosmotoga arenicorallina*. La especie *Kosmotoga olearia* fue aislada de los efluentes de una plataforma de producción de petróleo (69) y la especie *Kosmotoga arenicorallina* de aguas hidrotermales (70). Ambas especies se caracterizan por ser termófilas o hipertermófilas, y metabolizar una gran variedad de carbohidratos en condiciones anaerobias (47). No se han detectado bacterias de este género en sistemas de tratamiento de efluentes de la industria láctea. Por lo tanto, sería interesante profundizar en el aislamiento y caracterización de la misma ya que podría tratarse de una nueva especie con alta capacidad degradadora de grasas. *Smithella* (del filo Proteobacteria) es una bacteria anaerobia estricta, mesofílica y capaz de degradar propionato formando acetato y menor cantidad de metano en comparación a otras bacterias que degradan propionato. La especie *Smithella propionica* ha sido la única aislada hasta la fecha, y fue crecida y aislada de un reactor anaerobio doméstico (71). Probablemente se encuentre degradando intermediarios de la degradación de grasas en el digestor del sistema de tratamiento. Por lo tanto, podría también estar presente en las incubaciones asociadas a la comunidad degradadora de ácido oleico o glicerol.

Tabla 10. Filos detectados en el lodo del digestor por 454-pirosecuenciación

	n°secuencias	%
Bacterias no clasificados	1611	37,4
Proteobacteria	774	18,0
Thermotogae	731	17,0
Chloroflexi	383	8,9
Firmicutes	250	5,8
Euryarchaeota	176	4,1
Bacteroidetes	132	3,1
Acidobacteria	107	2,5
Verrucomicrobia	76	1,8
Caldiserica	28	0,6
Synergistetes	23	0,5
Actinobacteria	5	0,1
Spirochaetes	5	0,1
OD1	2	0,0
Armatimonadetes	2	0,0
Lentisphaerae	2	0,0
Cyanobacteria/Chloroplast	1	0,0
Gemmatimonadetes	1	0,0

Tabla 11. Composición del reactor R3 obtenida por 454-pirosecuenciación. Se analizó la composición del reactor R3 por 454-pirosecuenciación, se presentan los géneros hasta un 0,5% de abundancia.

Género	Abundancia relativa (%)
<i>Kosmotoga</i>	10,0
<i>Smithella</i>	10,0
<i>Methanolinea</i>	3,5
<i>Leptolinea</i>	2,3
<i>Fervidobacterium</i>	1,2
<i>Sulfuricurvum</i>	0,7
<i>Caldisericum</i>	0,6
<i>Syntrophobacter</i>	0,6
<i>Arcobacter</i>	0,5

El análisis *in silico* de corte con la enzima *HaeIII* de las secuencias del gen ARNr 16S con mayor abundancia en el resultado de la pirosecuenciación (Tabla 12), permitió una posible asignación de 2 fragmentos T-RFs.

La especie *Kosmotoga olearia* genera un T-RF *in silico* de 211 pb. Este fragmento podría coincidir con un T-RFs presente en las muestras iniciales y finales de los enriquecimientos de glicerol y de ácido oleico, de 213 pb. Este fragmento se encuentra en una abundancia notoria en las muestras iniciales, y duplica su abundancia en una de las muestra finales del enriquecimiento de glicerol. También, la especie *Smithella propionica* genera un T-RF *in silico* de 71 pb. En las muestras iniciales del enriquecimiento con glicerol se detectó un fragmento de 71 pb con una abundancia considerable, que luego desapareció en las muestras finales. Contrariamente, en los enriquecimientos de ácido oleico, este mismo fragmento está presente únicamente en las muestras finales del enriquecimiento

con una abundancia notoria también. Esto implica que pudo tratarse de la presencia del género *Smithella*, en cuyo caso, su adaptación se vio favorecida por la degradación del ácido oleico.

No obstante, este análisis *in silico* no permite una confirmación de los grupos bacterianos presentes en los enriquecimientos. Si bien se secuenció una muestra del mismo lodo que fue el inóculo del ensayo, los tiempos entre el secuenciado y el comienzo del ensayo, no permiten la total correlación de los resultados obtenidos, ya que los grupos microbianos pueden haber evolucionado. Así mismo, los grupos microbianos presentes en el lodo secuenciado se alejan aún más de aquellos presentes luego de la incubación.

Tabla 12. Análisis *in silico* de los perfiles T-RFs de los géneros presentes en el lodo del reactor R3. Se determinó con la herramienta WebCutter 2.0, el largo de bases del primer fragmento resultantes del corte con la enzima de restricción *HaeIII*. Se indica la presencia del T-RF en los T-RFLP de los enriquecimientos de glicerol y de ácido oleico a tiempos inicial y final.

Especies	T-RF <i>in silico</i>
<i>Smithella propionica</i>	71
<i>Fervidobacterium islandicum</i>	89
<i>Methanospirillum hungatei</i>	167
<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	186
<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	189
<i>Fervidobacterium riparium</i>	191
<i>Syntrophobacter sulfatireducens</i>	209
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	209
<i>Kosmotoga olearia</i>	211
<i>Caldisericum exile</i>	308
<i>Arcobacter skirrowii</i>	907
<i>Sulfuricurvum kujiense</i>	953

Para lograr una correcta identificación de los picos más abundantes en los enriquecimientos se debería pirosecuenciar las mismas muestras que fueron analizadas por T-RFLP. De esta forma se lograría una mejor correlación entre los T-RFs obtenidos *in silico* y en el ensayo. Esto permitiría una correcta identificación de los grupos microbianos presentes en los enriquecimientos finales. Los filos obtenidos por secuenciación de las muestras con menor diversidad (tiempos finales) permitirían determinar aquellos filos que mejor se adaptaron al medio proporcionado en el ensayo, y esto daría un gran aporte para la consecuente creación de un inoculante que mejore la degradación de grasas y sus derivados.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Este capítulo no aplica como requerimiento para la obtención del título de Licenciada en Biotecnología.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este proyecto permitió obtener una primera aproximación al desarrollo de un inoculante capaz de mejorar la degradación de grasas en los efluentes de la industria lechera. Se centró el estudio en la degradación de dos componentes principales en dichos efluentes, el glicerol y el ácido oleico. Obteniendo así, un enriquecimiento de una muestra de un lodo proveniente de un reactor anaerobio degradador de grasa, en bacterias degradadoras de estos compuestos.

Durante el ensayo se logró un buen seguimiento de los enriquecimientos, con el uso de técnicas sencillas y rápidas, tanto para la detección de los sustratos como para la medida de producción de gas.

El estudio de las comunidades bacterianas por la técnica molecular de T-RFLP junto con los análisis multivariados, permitieron determinar cambios entre los tiempos iniciales y finales de ambas incubaciones. Las muestras de los tiempos finales demostraron tener una diversidad en la comunidad microbiana inferior. Esto parecería indicar que algunos grupos bacterianos se adaptaron mejor a los sustratos, glicerol o ácido oleico.

Los resultados obtenidos proponen un seguimiento incorporando mejoras. Por un lado, la incorporación de un tercer sustrato: la grasa de leche. Esto permitiría de abarcar los tres pasos claves de la degradación de lípidos. Luego, la confirmación de la identidad del o de los gases producidos por cromatografía de gas. Considerar además, variaciones a nivel de la concentración de sustrato, buscando acercarse a la concentración de grasa, glicerol o ácido oleico real en los efluentes de industrias lecheras. También, se debería variar la escala de los enriquecimientos así como los tiempos de incubación. Para mejorar el análisis molecular, se debería pirosecuenciar las muestras analizadas por T-RFLP (muestras iniciales y finales) de modo de poder correlacionar los T-RFs obtenidos con T-RFs teóricos de los filos que se encuentran presentes en las muestras mismas. Se podría además, considerar la incorporación de reactivos para la detección de arqueas (*primers* específicos para la PCR del gen ARNr 16S, *primers* para la 454-pirosecuenciación). En una última instancia, se realizaría un aislamiento de las bacterias responsables de la degradación de grasa, ácido oleico y glicerol.

Este proyecto permitió de sentar las bases para en un futuro, desarrollar un inoculante que mejore la degradación de grasas o sus derivados en efluentes de la industria láctea.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Malissard M. Pourquoi les effluents industriels sont-ils difficiles à traiter? In: Demuller F editor. Pourquoi les effluents industriels sont-ils difficiles á traiter? Le cahier des chroniques scientifiques; Francia Paris: Veolia Environnement; 2007.
2. Alturkmani A. Industrial wastewater. In. Industrial wastewater; Homs, Syria; 2013.
3. Restrepo NJF. Diccionario ambiental. Ecoe Ediciones. 2007.
4. Bretagne D. La pollution de l'eau d'origine industrielle - panorama 2007/2008. In. La pollution de l'eau d'origine industrielle - panorama 2007/2008; 2008
5. von Sperling M. Wastewater characteristics, treatment and disposal. IWA Publishing.
6. Ramalho RS. Tratamiento de aguas residuales. Reverté.
7. Wang LK, Hung YT, Lo HH, Yapijakis C. Handbook of industrial and hazardous wastes treatment. Taylor & Francis.
8. Kessler H-G. Food engineering and dairy technology. Food engineering and dairy technology. 1981.
9. Uruguay XXI. Promoción de importaciones y exportaciones. Sector lácteo. Oportunidades de inversión en Uruguay [Internet]. Uruguay (Montevideo): República Oriental del Uruguay; Julio 2012 [citado 15 Febrero 2014]. Disponible desde: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/informacion-comercial-y-economica/informes-sectoriales/>
10. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2013 Anuario Estadístico Agropecuario [Internet]. Uruguay (Montevideo): República Oriental del Uruguay; 2013 [citado 15 Febrero 2014]. Disponibles desde: [http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU;,"](http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,754,O,S,0,MNU;E;27;9;MNU;,)
11. Passeggi M, López I, Borzacconi L. Modified uasb reactor for dairy industry wastewater: Performance indicators and comparison with the traditional approach. Journal of Cleaner Production. 2012; 26(0): 90-94.
12. AIEE, Bagnato G, Pedemonte A. Informe semestral de situación y perspectivas de la lechería uruguaya [Internet]. Uruguay (Montevideo): INALE; Junio 2012 [citado 15 Febrero 2014]. Disponible desde: http://www.inale.org/innovaportal/file/1889/1/informe_de_coyuntura_primer_semestre_del_2012-_area_de_informacion_inale.pdf
13. Reducing the BOD level from a dairy processing plant. Proceedings of the XXIII International Dairy Congress; Octubre 8-12; Montreal; 1990. 835-851.
14. Bylund G. Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB.
15. Wendorff WL. Treatment of dairy wastes. In: Elmer H. Marth JS editor. Treatment of dairy wastes. Applied dairy microbiology: CRC Press; 2001.
16. Gough RH, McGrew P. Preliminary treatment of dairy plant waste water. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology 1993;28(1): 11-19.
17. Martin AM. Biological degradation of wastes. Elsevier Applied Science. 1991.
18. IDF. Anaerobic treatment of dairy effluents - the present stage of development. In. Anaerobic treatment of dairy effluents - the present stage of development; 1990.

19. Britz TJ, Merwe M, Riedel KHJ. Influence of phenol additions on the efficiency of an anaerobic hybrid digester treating landfill leachate. *Biotechnology Letters* 1992;14(4): 323-328.
20. Energía IplDyAdl. Biomasa: Digestores anaerobios. Madrid:IDEA; 2007.
21. Eckenfelder WW. Industrial water pollution control. McGraw-Hill;2000.
22. Smith PG. Dictionary of water and waste management. Elsevier Science.
23. Herzka A, Booth RG. Food industry wastes: Disposal and recovery. Applied Science Publishers.
24. Lettinga G, van Velsen AFM, Hobma SW, de Zeeuw W, Klapwijk A. Use of the upflow sludge blanket (usb) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 1980;22(4): 699-734.
25. Seadi TA, Rutz D, Prassl H, Köttner M, Finsterwalder T, Volk S, Janssen R. Biogas handbook. University of Southern Denmark Esbjerg. 2008.
26. Al Seadi T. Good practice in quality management of ad residues from biogas production: Task 24 og aea technology environment. In. Good practice in quality management of ad residues from biogas production: Task 24 og aea technology environment: IEA Bioenergy; 2001.
27. Sträuber H, Schröder M, Kleinsteuber S. Metabolic and microbial community dynamics during the hydrolytic and acidogenic fermentation in a leach-bed process. *Energy, Sustainability and Society* 2012;2(1): 1-10.
28. O'Sullivan CA, Burrell PC, Clarke WP, Blackall LL. Structure of a cellulose degrading bacterial community during anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering* 2005;92(7): 871-878.
29. Yang JC, Chynoweth DP, Williams DS, Li A. *Clostridium aldrichii* sp. Nov., a cellulolytic mesophile inhabiting a wood-fermenting anaerobic digester. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1990;40(3): 268-272.
30. Weng C-n, Jeris JS. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Research* 1976;10(1): 9-18
31. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997;61(2): 262-280.
32. McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW. *Syntrophomonas wolfei* gen. Nov. Sp. Nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 1981;41(4): 1029-1039.
33. Zeikus JG. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews* 1977;41(2): 514-541.
34. Zhang C, Liu X, Dong X. *Syntrophomonas erecta* sp. Nov., a novel anaerobe that syntrophically degrades short-chain fatty acids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005;55(2): 799-803.
35. Zhao H, Yang D, Woese CR, Bryant MP. Assignment of fatty acid- β -oxidizing syntrophic bacteria to syntrophomonadaceae fam. Nov. On the basis of 16s rRNA sequence analyses. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1993;43(2): 278-286.
36. Jackson BE, Bhupathiraju VK, Tanner RS, Woese CR, McInerney MJ. *Syntrophus aciditrophicus* sp. Nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology* 1999;171(2): 107-114.
37. Roy F, Samain E, Dubourguier H, Albagnac G. *Syntrophomonas sapovorans* sp. Nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Archives of Microbiology* 1986;145(2): 142-147.

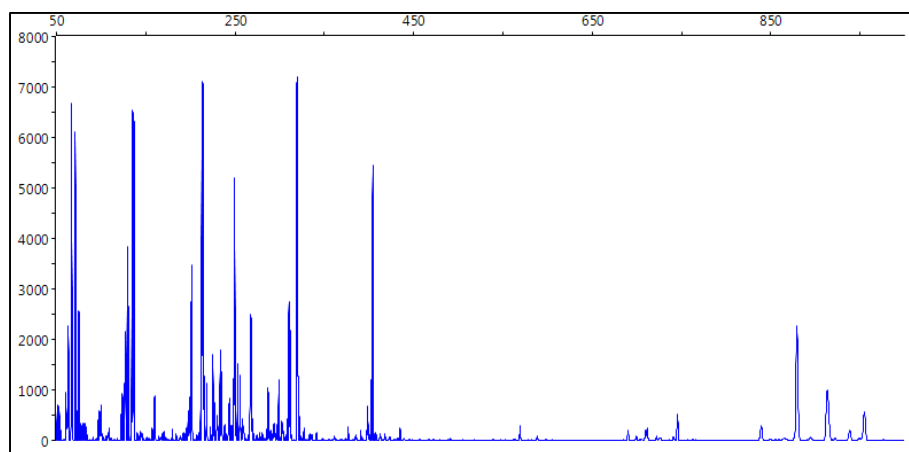
38. Lorowitz W.H, Zhao H., Bryant M.P. *Syntrophomonas wolfei* subsp. *Saponavida* subsp. Nov., a long-chain fatty-acid-degrading, anaerobic, syntrophic bacterium; *Syntrophomonas wolfei* subsp. *Wolfei* subsp. Nov.; and emended descriptions of the genus and species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1989;39(2): 122-126.
39. Zhang C, Liu X, Dong X. *Syntrophomonas curvata* sp. Nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004;54(3): 969-973.
40. Svetlitsnyi V, Rainey F, Wiegel J. *Thermosyntropha lipolytica* gen. Nov., sp. Nov., a lipolytic, anaerobic, alkali-tolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996;46(4): 1131-1137.
41. Sousa DZ, Pereira MA, Stams AJM, Alves MM, Smidt H. Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 2007;73(4): 1054-1064.
42. Angelidaki I, Ahring BK. Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992;37(6): 808-812.
43. Viana MB, Freitas AV, Leitão RC, Pinto GAS, Santaella ST. Anaerobic digestion of crude glycerol: A review. *Environmental Technology Reviews* 2012;1(1): 81-92.
44. Siles López JÁ, Martín Santos MdlÁ, Chica Pérez AF, Martín Martín A. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource Technology* 2009;100(23): 5609-5615.
45. Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* 2009;27(6): 895-913.
46. Lalman JA, Bagley DM. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research* 2000;34(17): 4220-4228.
47. Maru BT, Bielen AAM, Constantí M, Medina F, Kengen SWM. Glycerol fermentation to hydrogen by *Thermotoga maritima*: Proposed pathway and bioenergetic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy* 2013;38(14): 5563-5572.
48. Buswell AM, Mueller HF. Mechanism of methane fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry* 1952;44(3): 550-552.
49. Torsvik V, Daae FL, Sandaa R-A, Øvreås L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 1998;64(1): 53-62.
50. Blackwood CB, Marsh T, Kim S-H, Paul EA. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69(2): 926-932.
51. Abdo Z, Schütte UME, Bent SJ, Williams CJ, Forney LJ, Joyce P. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environmental Microbiology* 2006;8(5): 929-938.
- (52) Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 2001;67(1): 190-197.
53. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 2007;62(2): 142-160.
54. James FC, McCulloch CE. Multivariate analysis in ecology and systematics: Panacea or Pandora's box? *Annual Review of Ecology and Systematics* 1990;21(1): 129-166.
55. Legendre P, Legendre LFJ. *Numerical ecology*. Elsevier Science.

56. Jolliffe IT. Principal component analysis. Springer.
57. Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16s rDNA 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013;97(6): 2681-2690.
58. Droege M, Hill B. The genome sequencer flx™ system—longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology* 2008;136(1–2): 3-10.
59. Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing™: An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation* 2002;19(5): 479-485.
60. Margulies EH, Blanchette M, Program NCS, Haussler D, Green ED. Identification and characterization of multi-species conserved sequences. *Genome Research* 2003;13(12): 2507-2518.
61. Cirne DG, Paloumet X, Björnsson L, Alves MM, Mattiasson B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—effects of lipid concentration. *Renewable Energy* 2007;32(6): 965-975.
62. Cirne DG, Björnsson L, Alves M, Mattiasson B. Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2006;81(11): 1745-1752.
63. Mendes AA, Pereira EB, Furigo Jr. A, Castro HFd. Anaerobic biodegradability of dairy wastewater pretreated with porcine pancreas lipase. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010;53(12):9-1284.
64. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991;173(2): 697-703.
65. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 1959;37(8): 911-917.
66. Bondioli P, Della Bella L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2005;107(3): 153-157.
67. PJ S. Identification of the bray-curtis similarity index: Comment on yoshioka (2008). *Marine Ecology Progress Series* 2008;372(3):303-306.
68. Agrawal A, Gopal K. Application of diversity index in measurement of species diversity. In. *Application of diversity index in measurement of species diversity. Biomonitoring of water and waste water*; 2013/01/01: Springer India; 2013.
69. Swithers KS, DiPippo JL, Bruce DC, Detter C, Tapia R, Han S, Goodwin LA, Han J, Woyke T, Pitluck S et al. Genome sequence of *Kosmotoga olearia* strain tbf 19.5.1, a thermophilic bacterium with a wide growth temperature range, isolated from the Troll oil platform in the North Sea. *Journal of Bacteriology* 2011;193(19): 5566-5567.
70. Nunoura T, Hirai M, Imachi H, Miyazaki M, Makita H, Hirayama H, Furushima Y, Yamamoto H, Takai K. *Kosmotoga arenicorallina* sp. nov. A thermophilic and obligately anaerobic heterotroph isolated from a shallow hydrothermal system occurring within a coral reef, southern part of the Yaeyama archipelago, Japan, reclassification of *Thermococcoides shengliensis* as *Kosmotoga shengliensis* comb. nov., and emended description of the genus *Kosmotoga*. *Archives of Microbiology* 2010;192(10): 811-819.
71. Liu Y, Balkwill DL, Aldrich HC, Drake GR, Boone DR. Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolnii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999;49(2): 545-556.

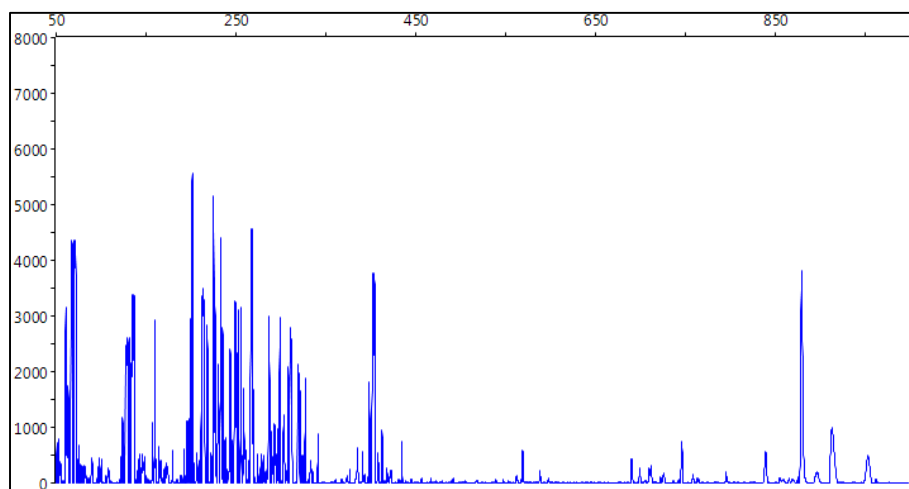
8. ANEXO

Cromatogramas de T-RFLP obtenidos en Peak Scanner™ Software Versión 1.9

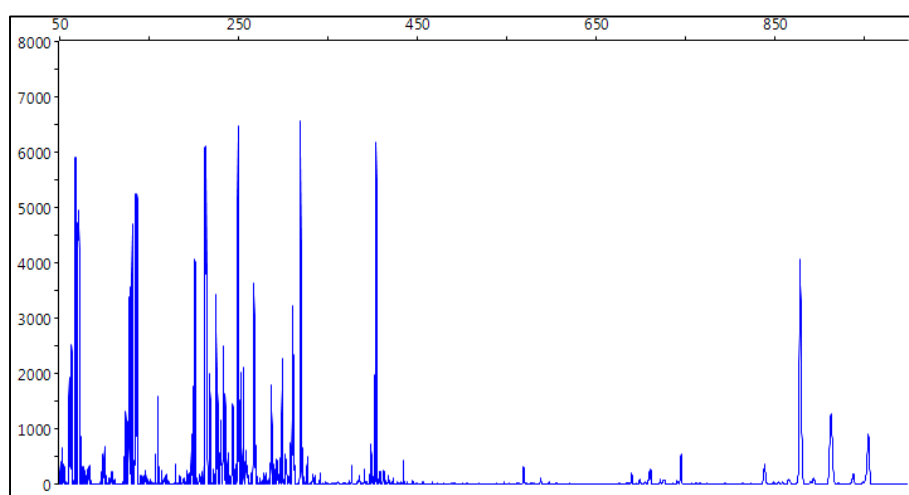
Muestra GL 1i



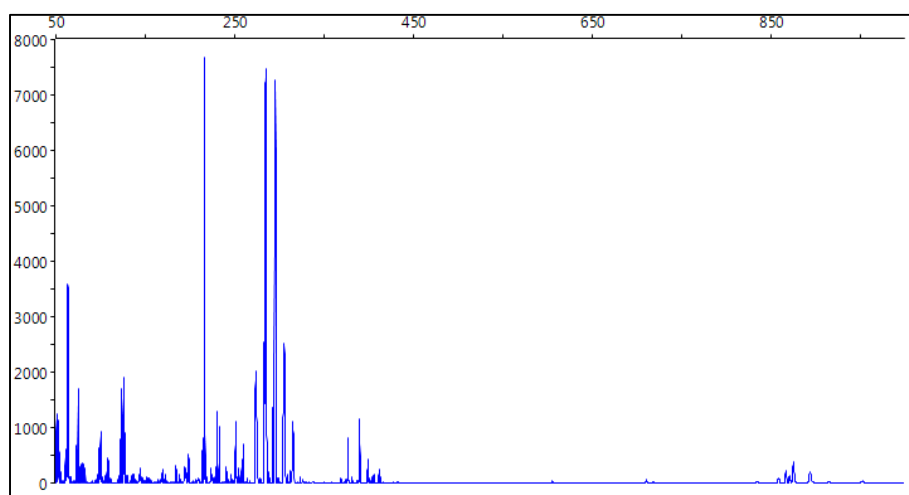
Muestra GL 2i



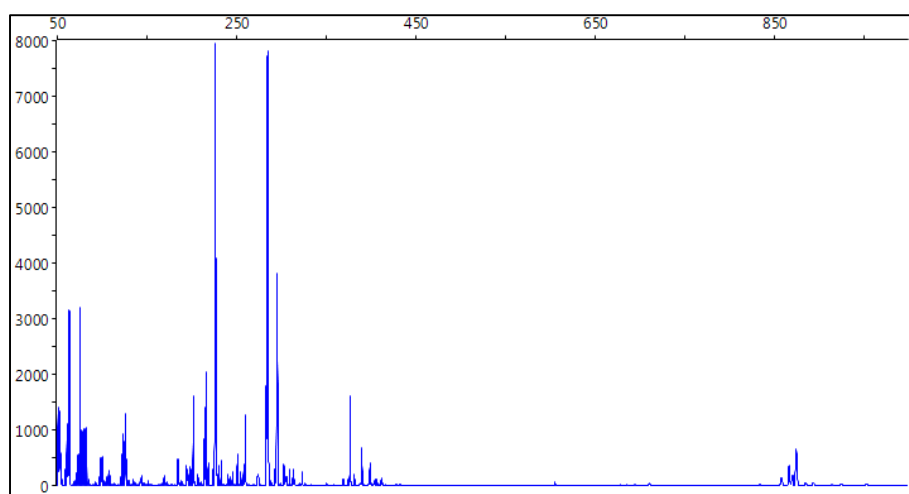
Muestra GL 3i



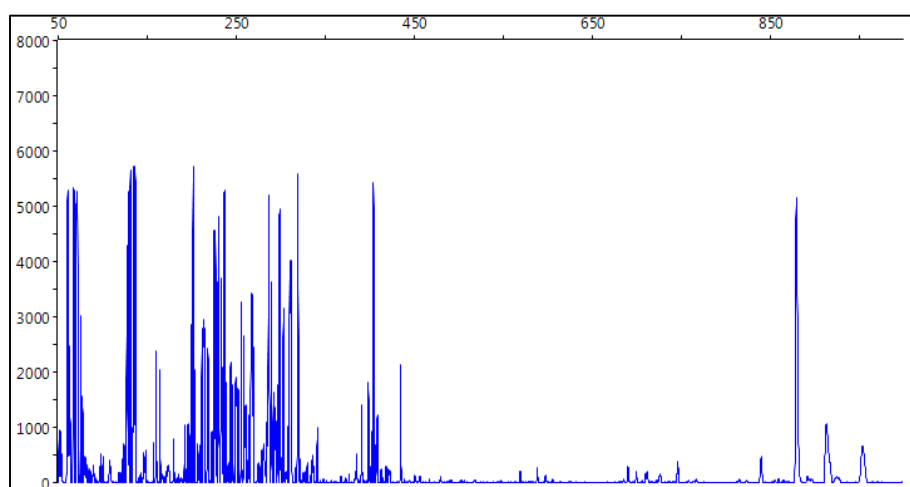
Muestra GL1f



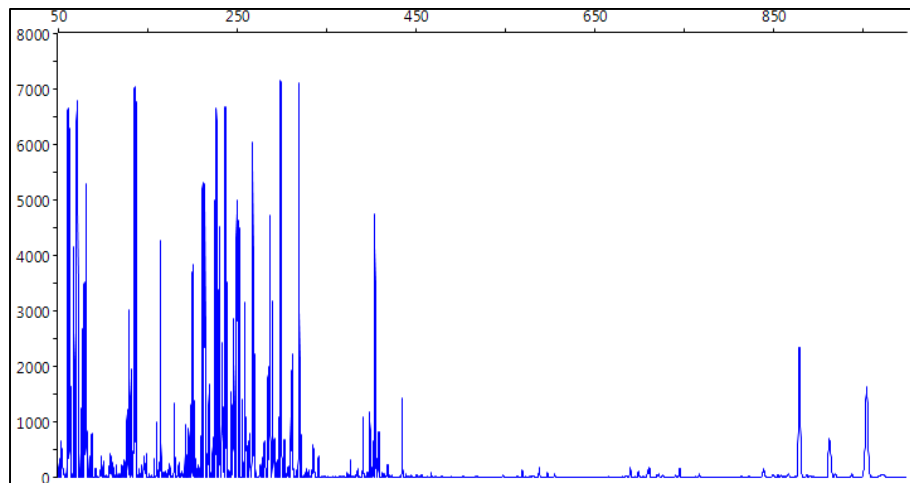
Muestra GL 2f



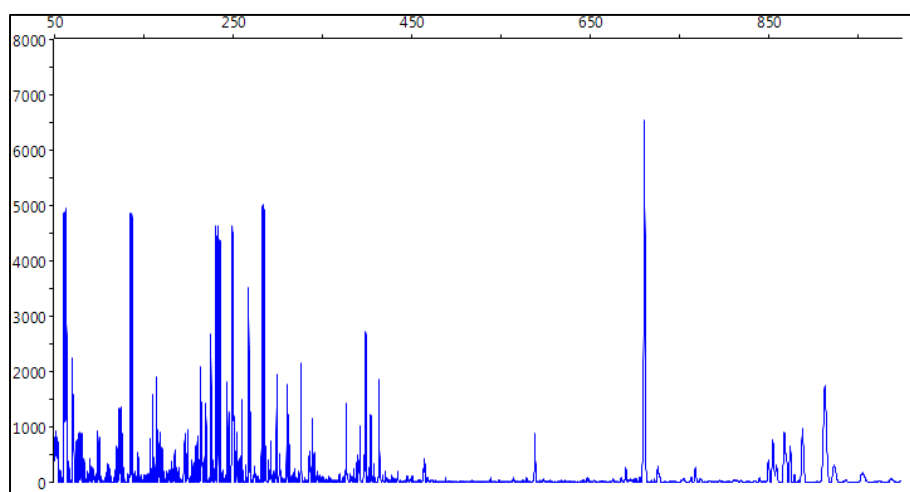
Muestra OL 1i



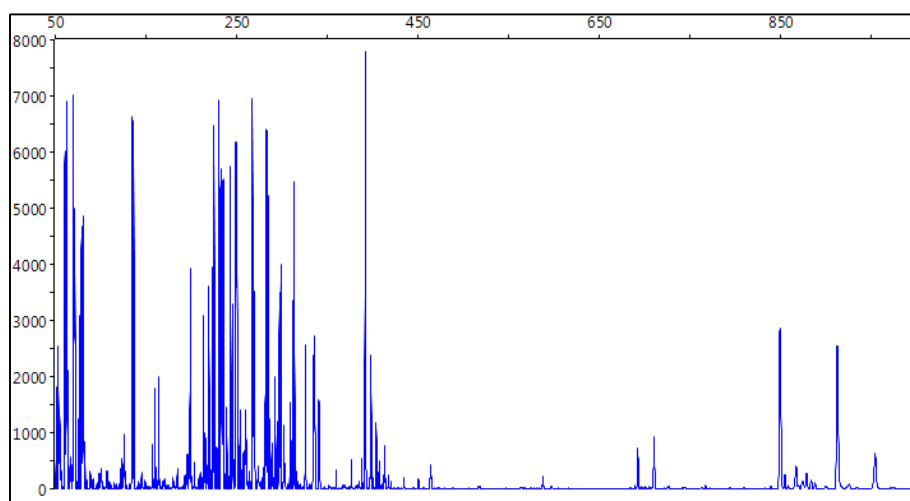
Muestra OL 2i



Muestra OL 1f



Muestra OL 2f



Muestra OL 3f

