



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

METABOLISMO METANOGÉNICO PREDOMINANTE DE UN DIGESTOR UASB ALIMENTADO CON VINAZA EN TUCUMÁN, ARGENTINA

**Predominant methanogenic metabolism in a UASB digester fed with vinasse in
Tucumán, Argentina.**

Martínez MA^{1,2*}, Etchegorry D¹, Romero Brunetto H³ & Perotti NI^{1,2}

- (1) PROIMI-CONICET. Tucumán. Av- Belgrano y Pje. Caseros. SM de Tucumán -4000 - Tucumán, Argentina. E-mail: amartinez@proimi.org.ar.
- (2) Facultad de ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Independencia 1800. SM de Tucumán -4000 - Tucumán, Argentina. E-mail: nperotti@herrera.unt.edu.ar
- (3) Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. E-mail: eletor@fcien.edu.uy
* Autor para correspondencia: amartinez@proimi.org.ar

Palabras clave: metanogénesis, vinasa, digestor anaerobio

Key words: methanogenesis, vinasse, anaerobic digester

Título abreviado: Metanogénesis en un reactor UASB

ABSTRACT

The stillage produced by ethanol distilleries attached to sugar mills in Northwestern Argentina produce polluted watersheds with a problem of major dimensions if they are improperly discharged. Effluents from this type grow at the same time the demand for bioethanol in Argentina and the world. UASB reactors are a comprehensive solution option in the regeneration of waste waters, since the generation of biogas for the methanogenic

prokaryotes developed in these systems is an additional value to the decontamination of effluents with high organic load. Through the sequence analysis of ribotags obtained from the metagenome of a UASB reactor at pilot scale (200 L) fed with vinasse, we characterized the archaeal community. Its composition would contribute to the determination of operating conditions that maximize the removal of the organic load of effluent and the associated generation of biogas.

The methodology included total DNA extraction, amplification of the V4 domain with universal primers towards prokaryotic 16SrDNA gene and sequenced via pyrosequence technology.

Our results indicate that in the digester studied, methanogenesis is due to a combination of hydrogenotrophic and acetoclastic metabolisms. Rarefaction analyses to assess species richness indicate that the results obtained until now do not cover the microbial diversity of this reactor. As a consequence, new analyses are performed with changes in DNA purification protocols and sequence strategies. Concerning *Eubacteria*, it was striking the presence of Verrucomicrobiales - methanotrophs - in a proportion near 18%. This may indicate irregularities in maintaining digester system. Studies of this bacterial group in particular could be used as a parameter of efficiency in maintaining the microbial consortium.

RESUMEN

Los efluentes líquidos producidos por las destilerías de alcohol asociadas a ingenios azucareros en el Noroeste argentino son una fuente de contaminación si son vertidas en forma inadecuada en las cuencas hídricas. La generación de efluentes de este tipo crece con la demanda de bioetanol tanto en Argentina como en el mundo. En la depuración de los mismos, los reactores de tipo UASB son una solución integral dado que agregan el valor de la producción biogás. Por medio del secuenciado de fragmentos ribosomales del metagenoma de un reactor de tipo UASB a escala piloto (200 L), analizamos la comunidad de archaeas del mismo. Este estudio pretende contribuir a la determinación de las condiciones operativas de funcionamiento del digester para maximizar la depuración de la carga orgánica de los efluentes y la generación asociada de biogás.

La metodología incluyó extracción del metagenoma, su amplificación por medio de *primers* universales para procariotas dirigidos al dominio V4 del gen 16SrDNA y su posterior secuenciado usando la tecnología de pirosecuenciado.

Nuestros resultados indican que en el digestor alimentado con vinazas estudiado, la metanogénesis se debe a la combinación de metabolismos hidrogenotrófico y acetogénico. Dado que los estudios de rarefacción indicaron una cobertura de la diversidad insuficiente, se realizan nuevos análisis con cambios en los protocolos de extracción y purificación de ADN y en las estrategias de secuenciado. Con relación a *Eubacteria*, resultó llamativa la proporción de Verrucomicrobiales, cercana al 18%. Esta proporción de metanótrofos puede indicar irregularidades en el mantenimiento del régimen del digestor. Estudios sobre este grupo bacteriano en particular podrían usarse como parámetro de eficiencia en el mantenimiento del consorcio microbiano.

INTRODUCCIÓN

Este trabajo estudia un biorreactor a escala piloto alimentado con vinaza, efluente generado por las destilerías de alcohol asociadas a ingenios azucareros del Noroeste argentino que ocasionan la contaminación cuenca del Salí - Dulce hídricas si son inadecuadamente vertidas.

Los biorreactores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) son digestores anaerobios de configuración tubular que operan en régimen continuo y en flujo ascendente. En ellos la biomasa se agrega formando gránulos macroscópicos donde los procariotas metanogénicos suman la generación de biogás a la depuración de efluentes con alta carga orgánica.

Las vinazas contienen carbohidratos simples, melanoidinas, compuestos fenólicos y altas concentraciones de iones, lo que lleva a la selección de una microflora única. La composición y las interacciones dentro de una comunidad microbiana productora de biogás,

es en general un proceso poco conocido, en particular cuando el reactor es alimentado con un residuo de alto poder contaminante como la vinaza. Por otra parte, la influencia de la físico-química parámetros sobre la estructura de la población y la eficiencia de la formación de biogás está aún bajo investigación (Schluter *et al.*, 2008).

Dentro de enfoque racional para mejorar el rendimiento de las plantas de biogás, parte de nuestros estudios se concentraron en la determinación de los parámetros operativos necesarios para llegar a la formación de biogránulos eficientes tanto en la disminución de la carga orgánica del residuo como para la generación asociada de biogás. Los ácidos orgánicos formados de los azúcares simples (acidogénesis) se convierten en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno y éstos son convertidos a metano por archaeas por medio de las vías metanogénicas hidrogenotrópica o acetoclástica. La primera produce metano por reducción de CO_2 de acuerdo a $\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$; mientras que la vía acetoclástica produce metano a partir de sustratos orgánicos sencillos como el ácido acético, el formiato y otros, de acuerdo la ecuación general $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (Liu *et al.*, 2007).

Este trabajo tiene por objeto secuenciar el metagenoma del contenido de un reactor UASB alimentado con vinazas para caracterizar composición de la comunidad procariota del mismo y contribuir a la determinación de las condiciones operativas que maximicen la remoción de la carga orgánica del efluente y la generación asociada de biogás.

MÉTODOS

Muestra.

La muestra fue tomada en agosto de 2011 a tres alturas de un digestor UASB de 200 L alimentado con vinaza durante 9 meses desde su inoculación (Figura 1. PROIMI - CONICET, <http://g.co/maps/dqcn5>). Las muestras fueron mezcladas para extraer el metagenoma.

Extracción del metagenoma y secuenciado.

El material granuloso conteniendo el consorcio microbiano del digestor fue la fuente de ADN total extraído de acuerdo a Schluter *et al.*, (2008) modificado. La filiación taxonómica de la comunidad de archaeas fue caracterizada por medio de la amplificación y secuenciado del dominio V4 del gen 16S rDNA con dos sets de *primers* (Klocke *et al.*, 2008; Bates *et al.*, 2011) y usando la plataforma GS FLX-454, Roche (INDEAR. Rosario, Argentina). La búsqueda de identidades de las secuencias parciales detectadas se realizó contra bases de datos de datos públicas (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/ y RDP, rdp.cme.msu.edu/).



Figura 1. Digestor UASB estudiado.

Figure 1. UASB digester studied.

RESULTADOS

La muestra granular del contenido del digestor presentó un pH de 6.8 a 7.0 y temperatura de 30°C. La extracción del metagenoma se realizó a partir de 1 g de sedimento del contenido del digestor. Los pigmentos de la vinaza se separaron en la fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos y colorearon irreversiblemente el ADN.

En nuestro estudio, los *primers* F515 y R806 (Bates *et al.*, 2011) sólo detectaron la población de *Eubacteria* presente en el momento de muestreo, mientras que la detección *Archaea* sólo fue posible con los *primers* con F563 y R802 (Klocke *et al.*, 2008). A pesar de que ambos sets de *primers* se dirigen al dominio V4 del 16S rRNA, los resultados fueron diferentes con cada uno de ellos. Es posible que el contenido en compuestos fenólicos de la vinaza (Figura 2) haya condicionado parte de la amplificación de *ribotags* en nuestro estudio (Horne *et al.*, 2004; Cankar *et al.*, 2006).

En total se detectaron 299 OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales), de las que las correspondientes al Dominio *Archaea* se distribuyen como se ve en la figura 2, de acuerdo al análisis realizado con el Naive Bayesian rRNA Classifier v.2.2 (RDP).

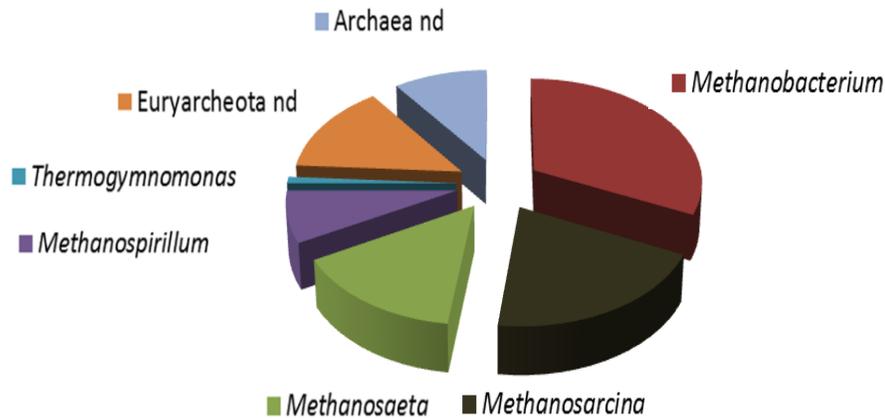


Figura 2. Distribución de la población de *Archaea* detectada a nivel de género y con una confianza del 80%.

Figure 2. Distribution of *Archaea* detected at the genus level and with a confidence of 80%.

El 89.4% de los *ribotags* de *Archaea* correspondieron al phylum Euryarchaeota, sin detección de Methanococcales en nuestras condiciones de trabajo. Los datos fueron homologados con la base de datos del NCBI.

Se observó predominio de la clase Methanomicrobia (42%), de la que se detectaron los géneros *Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta* spp. que crecen sobre acetato. Este último sólo utiliza acetato como un sustrato - acetoclástico obligado - y el género es de especial importancia para la productividad de las plantas de biogás, especialmente en el rendimiento del reactor y su estabilidad. Unos pocos miembros del orden Methanosarcinales son capaces de producir metano de fuentes de C diferentes al acetato y utilizan mayoritariamente la vía acetoclástica. (Welte & Deppenmeier, 2011).

Las especies del orden Methanomicrobiales (32%) son considerados metanógenos de Clase II aunque son fisiológicamente cercanos a los metanógenos de Clase I y utilizan H_2/CO_2 o formiato para producir metano (Anderson *et al.*, 2009).

Methanospirillum spp. y *Thermogymnomonas* spp. fueron detectadas en menor proporción en el digestor analizado (Figura 2). Estos resultados, sumados a la proporción de Methanobacteriales detectados, sugieren que tanto la metanogénesis hidrogenotrófica y acetoclástica son parte integral de la vía productora de metano el digestor alimentado con vinaza. Más aún las especies hidrogenotróficas han sido descritas como ácido tolerantes y acidófilas (Kotsyurbenko *et al.*, 2004). La presencia del género acidófilo *Thermoplasma* spp., aunque escasa, da cuenta de la tendencia al desarrollo de especies acidófilas indicativas de la necesidad de un control riguroso de la acidez del reactor alimentado con el efluente vinaza.

CONCLUSIONES

En el digestor estudiado la producción de metano se debería a la combinación de las vías acetoclástica e hidrogenotrófica. Las curvas de rarefacción indican que los resultados obtenidos hasta ahora no cubren la diversidad microbiana de este reactor (datos no mostrados), por lo que se realizan nuevas determinaciones con cambios en los protocolos de purificación de DNA y la utilización de pirosecuenciado directo y / o de secuencias de mayor especificidad (dirigidas a las secuencias de coenzimas clave en la síntesis de metano) como alternativas para eliminar las dificultades e interferencias debidas a la amplificación previa de fragmentos para secuenciar.

Más aún, la discrepancia de resultados con ambos métodos de amplificación de *ribotags* en este estudio y en la literatura podría deberse a la presencia a las dificultades de la

amplificación previa al secuenciado: naturaleza de la muestra (inhibidores), eficiencia de amplificación (diversidad y predominio de algunos grupos procariontes).

Con relación a *Eubacteria*, resultó llamativa la proporción de Verrucomicrobiales que fue cercana al 18% (datos no mostrados). Esta proporción de metanótrofos puede indicar irregularidades en el mantenimiento del régimen del digestor, usualmente controlado por pH y determinación de ácidos volátiles. Estudios sobre este grupo bacteriano en particular podrían usarse como parámetro de eficiencia en el mantenimiento del consorcio microbiano.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a CIUNT 26/E440, MINCYT PFIP-ESPRO 056/10, 164/10 y el Programa Escala Docente para intercambio académico del Grupo Montevideo que permitió la colaboración con el Dr. Romero.

BIBLIOGRAFÍA

- Bates ST, Berg-Lyons D, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N (2011). Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal* 5: 908-917.
- Klocke M, Nettmann E, Bergmann I, Mundt K, Souidi K, Mumme J, Linke B (2008). Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic Applied Microbiology* 31: 109-205.
- Kotsyurbenko OR, Chin KJ, Glagolev MV, Stubner S, Simankova MV, Nozhevnikova A and Conrad R (2004). Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog. *Environmental Microbiology* 6: 1159–1173.
- Liu Y, Beer LL and Whitman W (2012) Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. *Trends in Microbiology* 1–8. doi:10.1016/j.tim.2012.02.002.
- Schluter A, Bekel T, Diaz NN, Dondrup M, Eichenlaub R, Gartemann KH, Krahn I, Krause L, Krömeke H, Kruse O, Mussgnug JH, Neuweiger H, Niehaus K, Puhler A, Runte KJ, Szczepanowski R, Tauch A, Tilker A, Viehöver P, Goesmann (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136: 77-90.