UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

FACULTAD DE INGENIERIA

BIOPROA

BIOTECNOLOGÍA DE PROCESOS PARA EL AMBIENTE

INSTITUTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
MONTEVIDEO - URUGUAY

# MICROBIOLOGÍA ANAEROBIA

Curso “Diseño y Operación de Sistemas Anaerobios”

Elena Castelló

elenacas@fing.edu.uy

# Objetivos de aprendizaje

- Conocer las 4 etapas fundamentales de la cadena de degradación anaerobia de compuestos orgánicos
- Tener la capacidad de incorporar ese conocimiento en el diseño y operación de un reactor anaerobio

# INTRODUCCIÓN

1. Ciclo del carbono
2. Reacciones redox y potenciales de óxido reducción
3. Metabolismo microbiano

# 1. CICLO DEL CARBONO

Estados de oxidación del C de importancia fundamental

$CH_4$ (metano), forma más reducida (EO: –4)

$(CH_2O)n$, fórmula general para el protoplasma (EO: 0)

$CO_2$, la forma más oxidada (EO: +4)

# CICLO DEL CARBONO

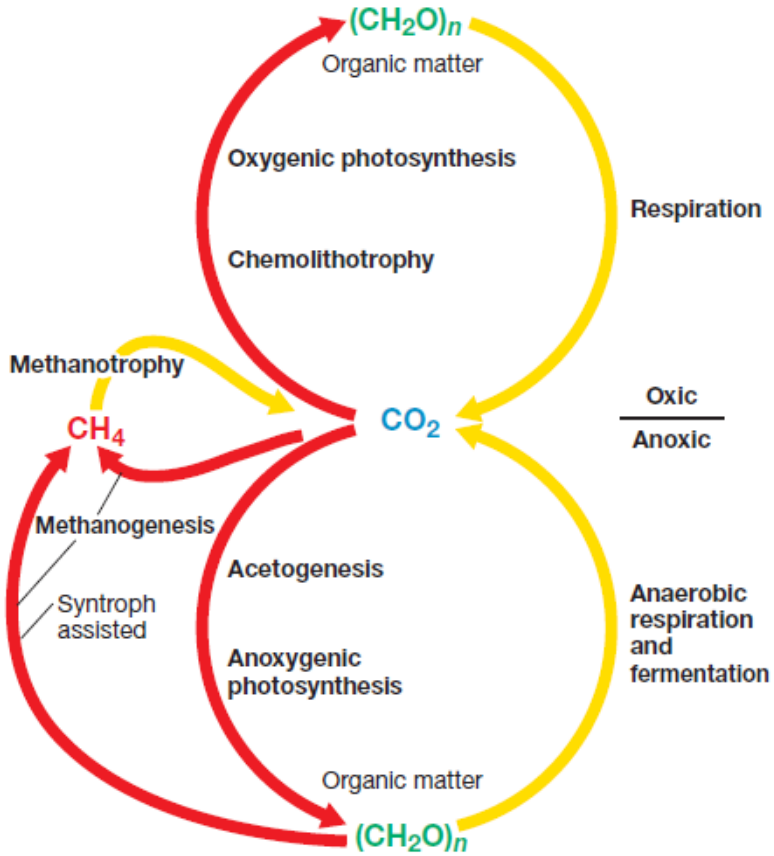



**Figure 24.2 Redox cycle for carbon.** The diagram contrasts autotrophic processes ($CO_2 \rightarrow$ organic compounds) and heterotrophic processes (organic compounds $\rightarrow CO_2$). Yellow arrows indicate oxidations; red arrows indicate reductions.

Tomada de: Brock *Biology of microorganisms*. 13th edition

# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

Una reacción típica de oxidación-reducción involucra un dador de electrones $A_{RED}$ y un aceptor de electrones $B_{OX}$.

$$A_{RED} \leftrightarrow A_{OX} + ne^-$$

$$B_{OX} + ne^- \leftrightarrow B_{RED}$$

Las dos reacciones están acopladas a través de la transferencia de e-

$$A_{RED} + B_{OX} \leftrightarrow A_{OX} + B_{RED}$$

# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

El cambio de energía libre de las reacciones redox en general se expresa por medio de parámetros electroquímicos.

$$\Delta G = -nF\Delta E$$

$$\Delta E = \Delta E^0 - \frac{RT}{nF}\ln\frac{[A_{OX}][B_{RED}]}{[B_{OX}][A_{RED}]}$$

$$\Delta E^0 = -\frac{\Delta G^0}{nF}$$

- n= número de electrones transferidos
- F= constante de Faraday (96649 kJ $V^{-1}mol^{-1}$)
- $\Delta E^0$ = expresado en V.

# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

| Par redox | E°'(V) |
|---|---|
| $CO_2$/gluc | -0.43 |
| $2H^+/H_2$ | -0.42 |
| $CO_2$/Metanol | -0.38 |
| $CO_2$/Acetato | -0.28 |
| $SO_4^{2-}/H_2S$ | -0.22 |
| Fumarato/Succinato | +0.02 |
| $NO_3^-/NO_2^-$ | +0.42 |
| $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ | +0.76 |
| $1/2O_2/H_2O$ | +0.82 |

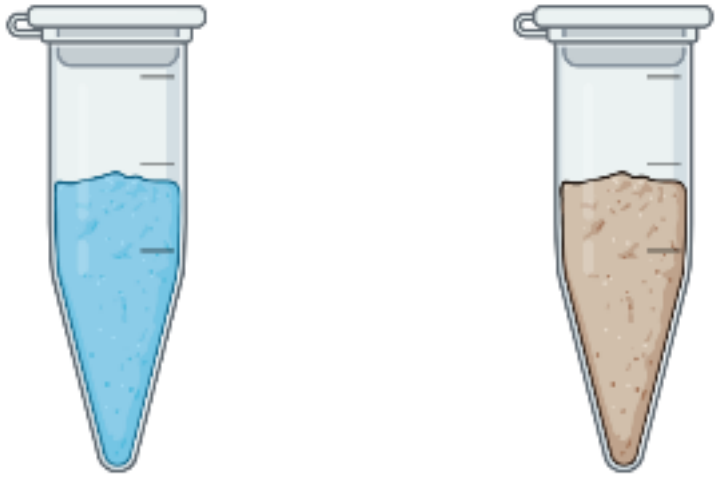
- La sustancia oxidada de la pareja en la parte superior de la torre tiene la tendencia más baja para aceptar electrones
- La sustancia oxidada de la pareja en la parte inferior tiene la mayor tendencia a aceptarlos
- El oxígeno en la parte inferior es el aceptor de electrones más favorable (oxidante poderoso)

# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

## DIGESTIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

Sistema cerrado en la oscuridad

Medio: agua, nutrientes, micronutrientes, materia orgánica



# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

**DIGESTIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS**

Las bacterias empiezan a degradar la materia orgánica de acuerdo con la siguiente ecuación:

$CH_2O + H_2O \rightarrow CO_2 + 4H^+ + 4e^-$

Como la botella contiene oxígeno este será utilizado como aceptor de electrones hasta que se acabe.

$4H^+ + 4e^- + O_2 \rightarrow 2H_2O$

La combinación de ambas reacciones da:

$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$

# 2. REACCIONES Y POTENCIALES DE ÓXIDO REDUCCIÓN

**DISTINTOS ACEPTORES FINALES DE ELECTRONES**

| Reacción | $\Delta G^{0'}$ $\left({}^{kJ}/_{mol}\right)$ |
|---|---|
| $CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$ | -117,5 |
| $CH_2O + {}^{4}/_{5}\, NO_3^- + {}^{4}/_{5}\, H^+ \rightarrow O_2 + {}^{2}/_{5}\, N_2 + {}^{7}/_{5}\, H_2O$ | -112,0 |
| $CH_2O + {}^{1}/_{2}\, SO_4^- + {}^{1}/_{2}\, H^+ \rightarrow CO_2 + {}^{1}/_{2}\, HS^- + H_2O$ | -18 |
| $CH_2O \rightarrow CO_2 + {}^{1}/_{2}\, CH_4$ | -16 |

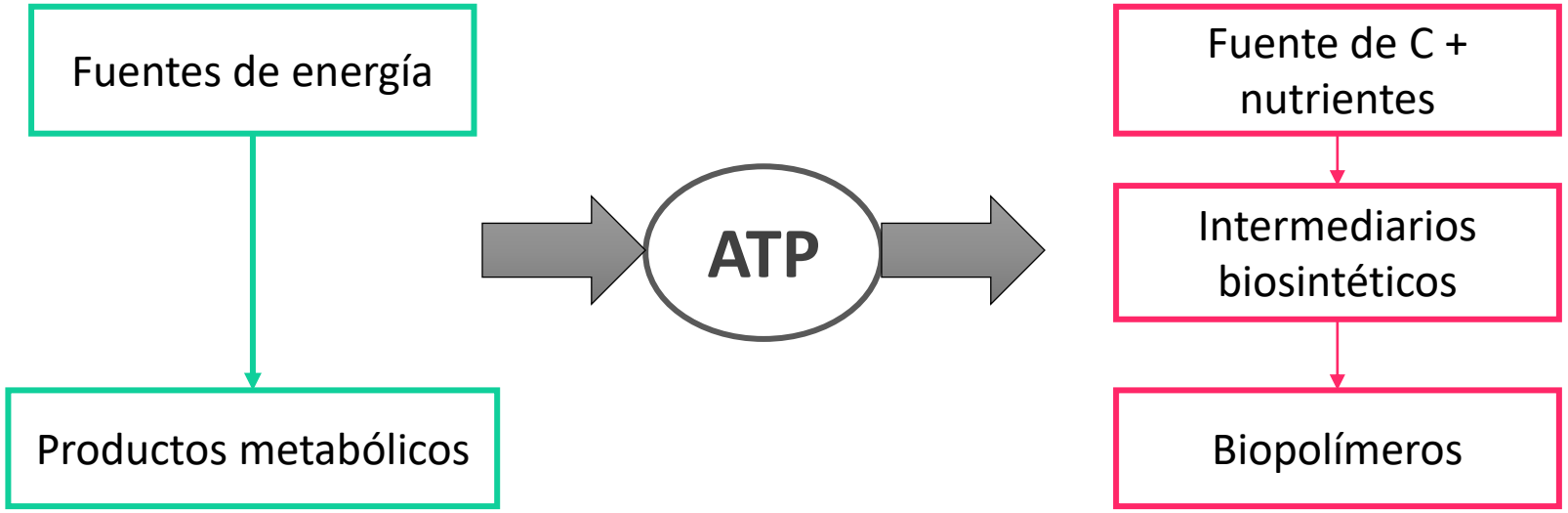
# 3. METABOLISMO

***Catabolismo***

*Generación de energía*

***Anabolismo***

*Generación de biomasa*



# 3. METABOLISMO

Heterótrofos: sintetizan biomasa a partir de compuestos orgánicos

Autótrofos: sintetizan biomasa a partir de $CO_2$

Fijadores de Nitrógeno: utilizan $N_2$ como fuente de nitrógeno

# 3. METABOLISMO

**CLASIFICACIÓN EN CUANTO AL CATABOLISMO**

Fotótrofos: utilizan la energía luminosa para la generación de energía

Quimiótrofos: utilizan compuestos químicos para la generación de energía

**CLASIFICACIÓN EN CUANTO AL ANABOLISMO**

Heterótrofos: sintetizan biomasa a partir de compuestos orgánicos

Autótrofos: sintetizan biomasa a partir de $CO_2$

Fijadores de Nitrógeno: utilizan $N_2$ como fuente de nitrógeno

# 3. METABOLISMO

**PROCESOS DE GENERACIÓN DE ENERGÍA**

**RESPIRACIÓN**

Oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico

Reducción de otro sustrato en general inorgánico (oxígeno, nitrato, etc.) que es el aceptor de e-

**FERMENTACIÓN**

Reacciones de OXIDO_REDUCCION de un sustrato orgánico

# MICROBIOLOGÍA ANAEROBIA

BIOTECNOLOGÍA DE PROCESOS PARA EL AMBIENTE
INSTITUTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
MONTEVIDEO - URUGUAY

# DIGESTIÓN ANAEROBIA

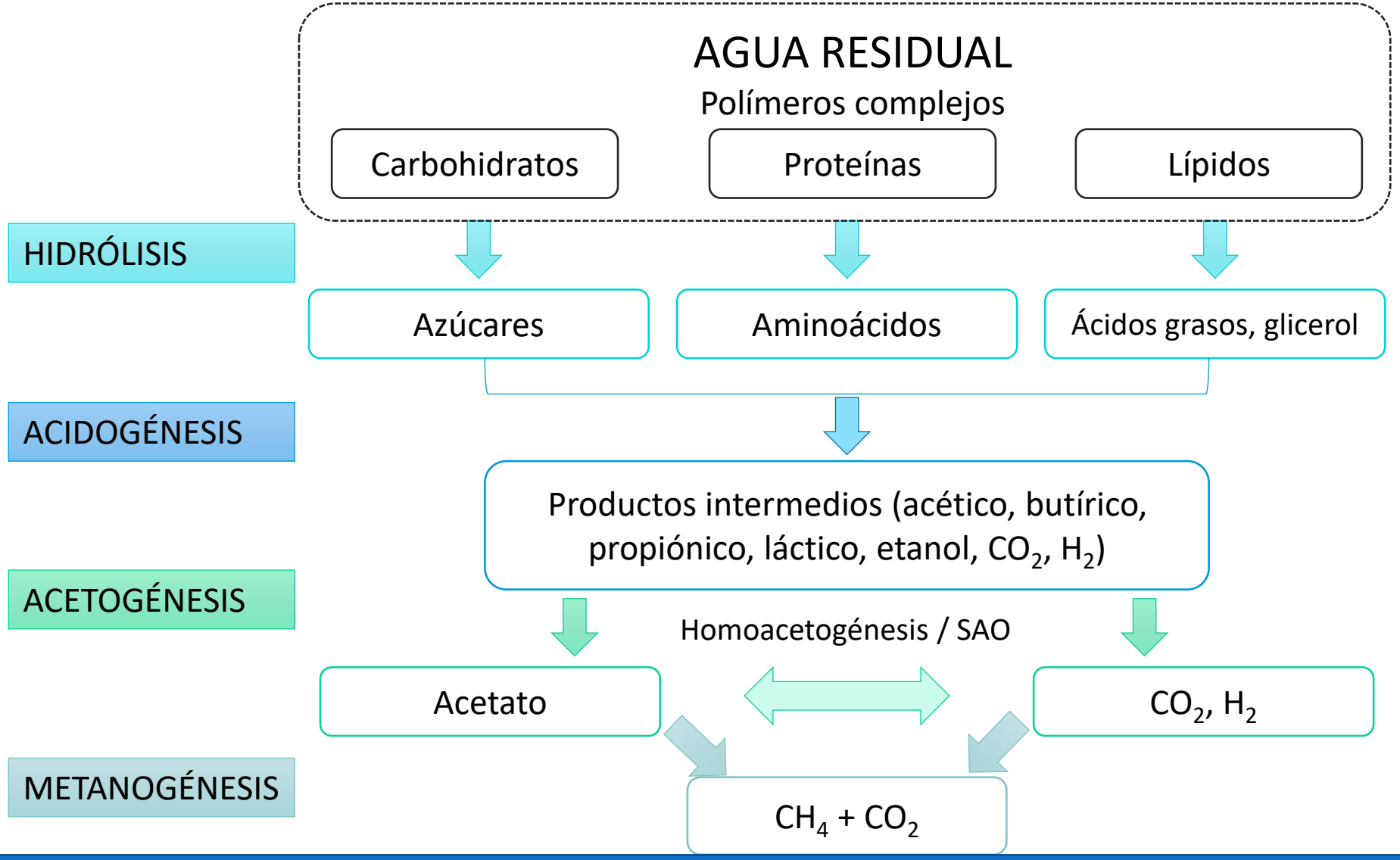
MATERIA ORGÁNICA → $CH_4$ + $CO_2$

**Secuencia de reacciones – Diferentes microorganismos**

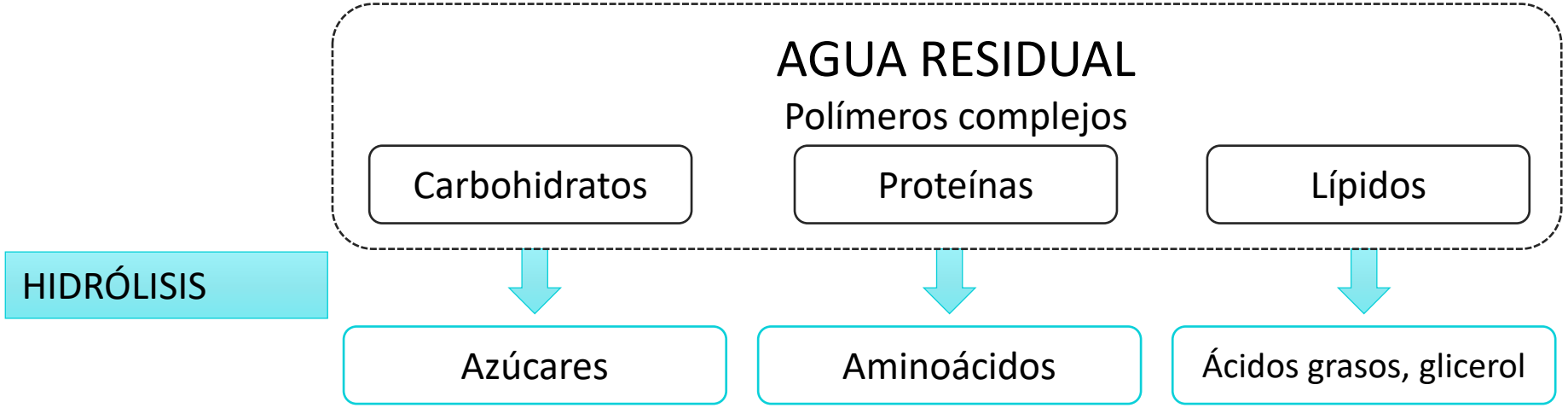
# DIGESTIÓN AEROBIA

MATERIA ORGÁNICA + $O_2$ → $CO_2$

## *Cadena de degradación anaerobia*

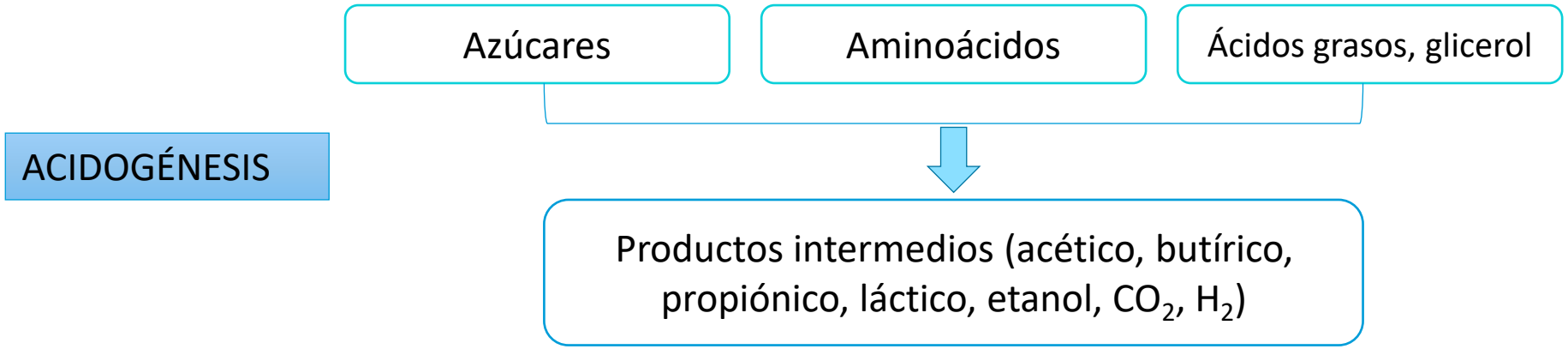


***Cadena de degradación anaerobia***

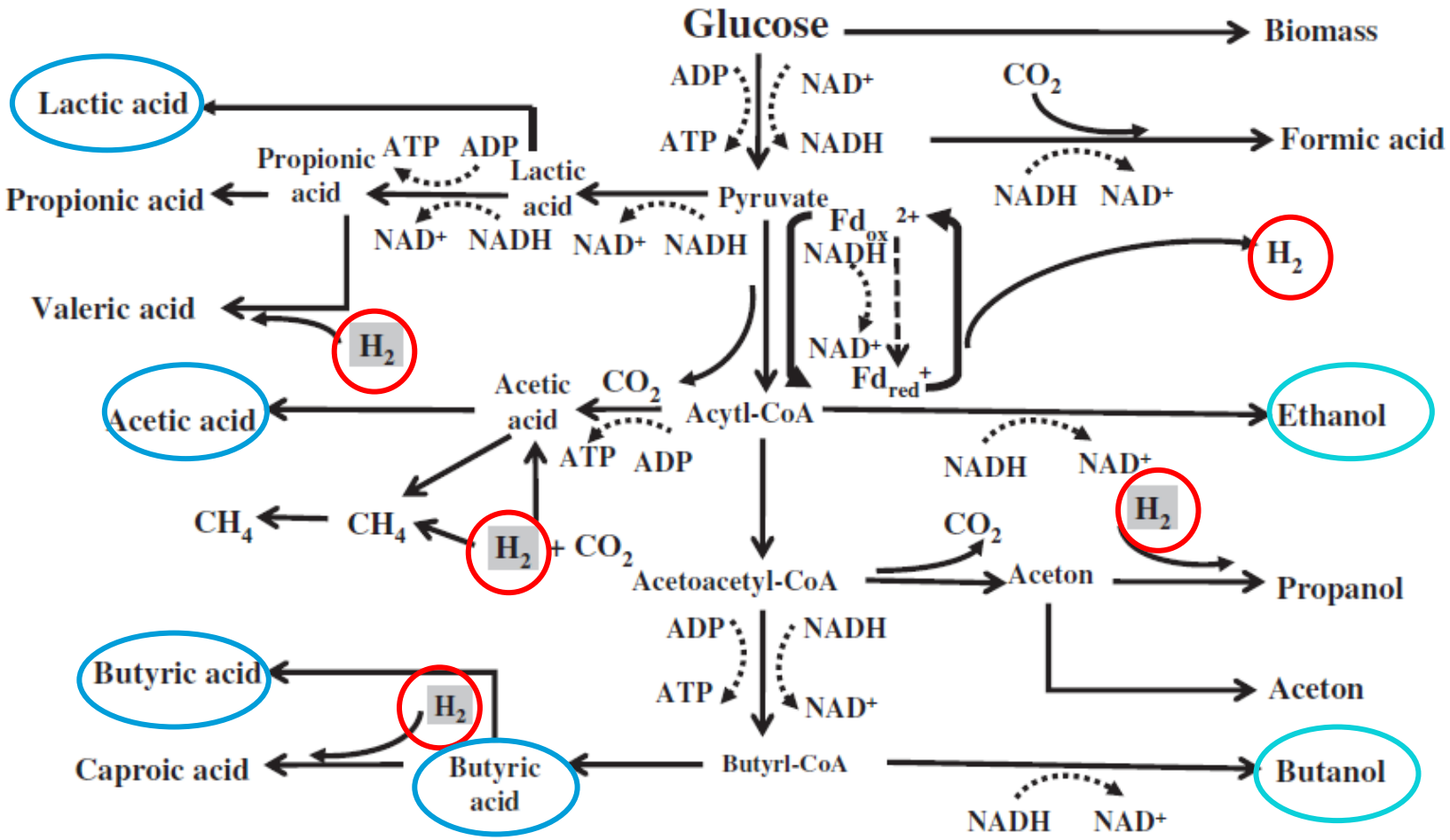



- Proceso muy dependiente de la temperatura.
- Dependiendo del sustrato puede ser el paso limitante de todo el proceso y en base al cual se realice el diseño del reactor.

## *Cadena de degradación anaerobia*




- Es el paso más rápido y termodinámicamente más favorable en la cadena de degradación anaerobia
- Puede ser llevado a cabo por un gran número de bacterias, en general facultativas




Saady N. (2013) Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation:

# REACCIONES ACIDOGÉNICAS

| REACCIONES | $\Delta G^{0\prime}$ $\left({}^{kJ}/_{mol}\right)$ |
|---|---|
| $C_{12}H_{22}O_{11} + 9H_2O \rightarrow 4CH_3COO^- + 4HCO_3^- + 8H^+ + 8H_2$ | -477 |
| $C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O \rightarrow 4CH_3CH_2CH_2COO^- + 4HCO_3^- + 6H^+ + 4H_2$ | -554 |
| $C_{12}H_{22}O_{11} + 3H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 6H^+ + 2H_2$ | -610 |

El producto obtenido depende de las condiciones de operación (pH, TRC) y los organismos fermentadores presentes (relevante en reactores exclusivamente fermentadores).

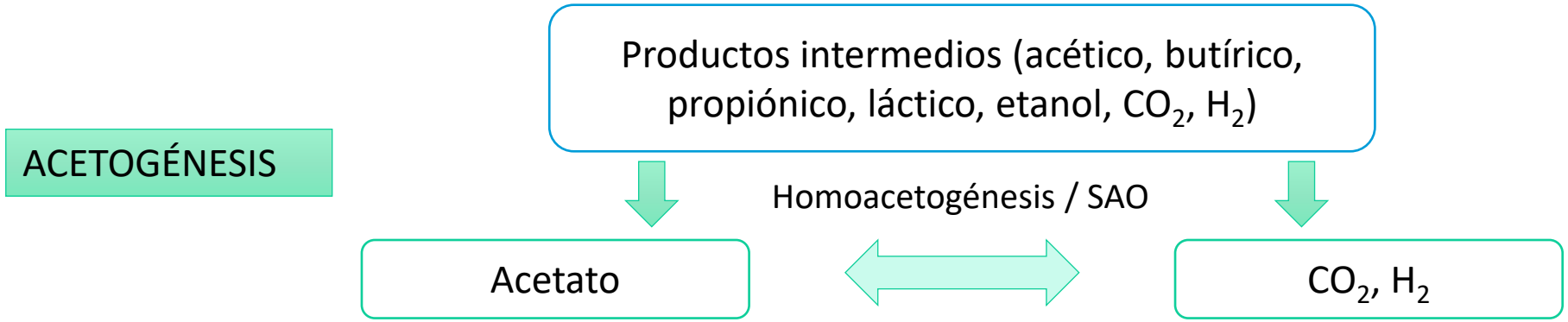
Si el hidrógeno es eficientemente removido del medio por los organismos consumidores de hidrógeno, el acetato será el principal producto obtenido.

# ACIDOGÉNESIS

Si el hidrógeno comienza a acumularse, se producirán productos más reducidos como propionato y butirato y posiblemente lactato y etanol (aún más reducidos)

Por lo tanto los efluente de reactores sobrecargados o reactores únicamente acidogénicos tienden a presentar productos más reducidos.

*Cadena de degradación anaerobia*




Los sustratos más importantes de las bacterias acetogénicas son el butirato y el propionato y en menor medida el lactato y el etanol.

# REACCIONES ACETOGÉNICAS

| Compuesto | Reacción | $\Delta G^{0\prime}\left({}^{kJ}/_{mol}\right)$ |
|---|---|---|
| Lactato | $CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$ | -4,2 |
| Etanol | $CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ | +9,6 |
| Butirato | $CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ | +48,1 |
| Propionato | $CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ | +76,1 |
| Palmitato | $CH_3(CH_2)_{14}COO^- + 14H_2O \rightarrow 8CH_3COO^- + 7H^+ + 14H_2$ | +345,6 |

# REACCIONES ACETOGÉNICAS

| Compuesto | Reacción | $\Delta G^{0\prime}\left({}^{kJ}/_{mol}\right)$ |
|---|---|---|
| Lactato | $CH_3CHOHCOO^- + 2H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 2H_2$ | -4,2 |
| Etanol | $CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ | **+9,6** |
| Butirato | $CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$ | **+48,1** |
| Propionato | $CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$ | **+76,1** |
| Palmitato | $CH_3(CH_2)_{14}COO^- + 14H_2O \rightarrow 8CH_3COO^- + 7H^+ + 14H_2$ | **+345,6** |

# ACETOGÉNESIS_ASPECTOS TERMODINÁMICOS

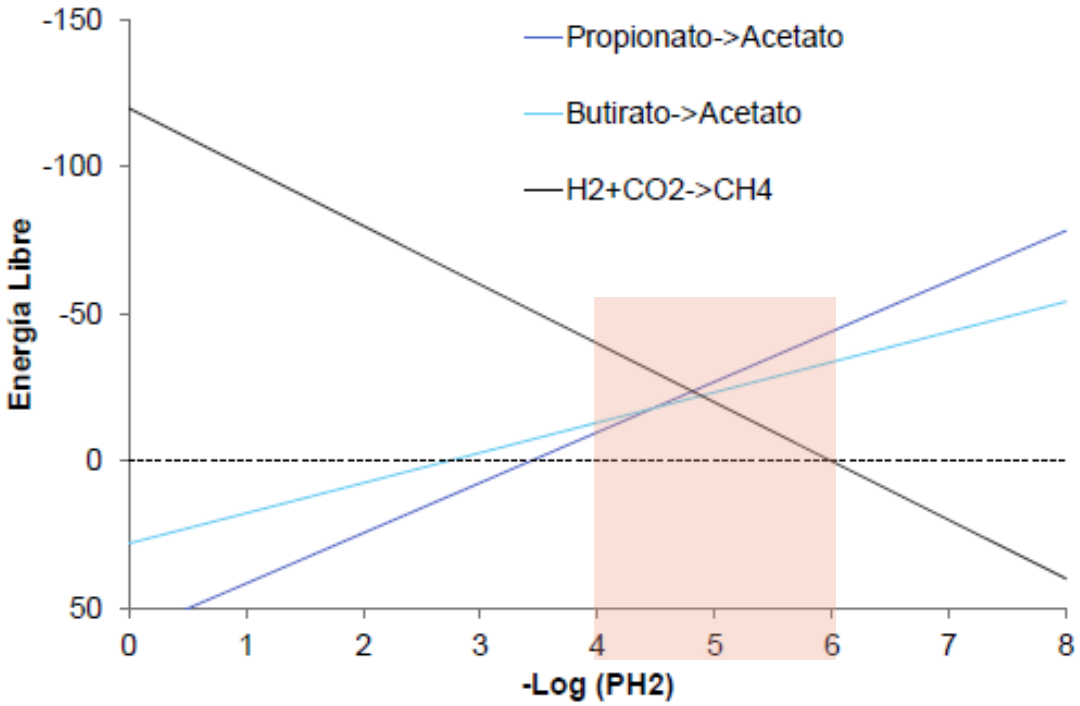
- Las reacciones para el etanol, butirato, propionato, palmitato no ocurrirán en condiciones estándar dado que su energía libre es positiva
- Su metabolismo es inhibido por el hidrógeno como se ve en la siguiente ecuación para el propionato

$$\Delta G' = \Delta G^{0\prime} + RT\left[Ln\left(\frac{[Acetato][CO_2][H_2]^3}{[Propionato]}\right)\right]$$

# ACETOGÉNESIS_ASPECTOS TERMODINÁMICOS

- Si el proceso de digestión anaerobia está estabilizado la presión de hidrógeno se mantiene muy baja
- Las archeas metanogénicas utilizan el hidrógeno molecular y mantienen la presión parcial en el ambiente en niveles suficientemente bajos como para que ocurran las reacciones acetogénicas.

# ACETOGÉNICAS



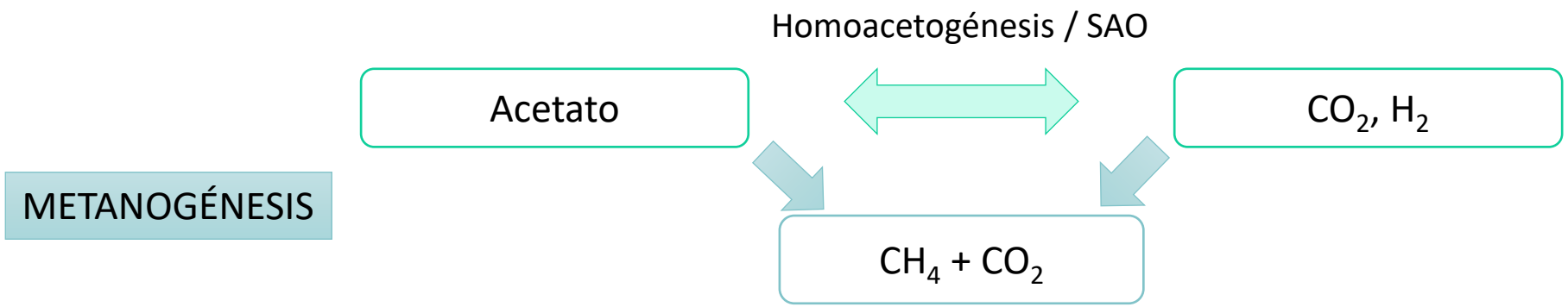

Henze M., van Loosdrecht MCM, Ekama G., Brdjanovic D. (2008) Biological Wastewater Treatment. *IWA Publication*

# ACETOGÉNESIS

En un reactor funcionando correctamente la presión de hidrógeno se encontrará entre $10^{-4}$ y $10^{-6}$ atm. A esa presión las reacciones acetogénicas se vuelven termodinámicamente favorables.

Las asociaciones microbianas en las que la actividad de un grupo de microorganismos depende de la actividad de otro distinto se llaman **asociaciones sintróficas**.

***Cadena de degradación anaerobia***




## Metanogénicas

- Acetotróficas — Consumidoras de acetato
- Hidrogenotróficas — Consumidoras de hidrógeno

# ARQUEAS METANOGÉNICAS

- Anaerobias estrictas y crecen solamente a bajos potenciales redox, por debajo de -400mV.
- Únicas capaces de producir metano
- Consumen un número limitado de sustratos ($H_2$, acetato)
- Utilizan amonio como fuente de nitrógeno, muy pocas especies conocidas fijan el nitrógeno molecular

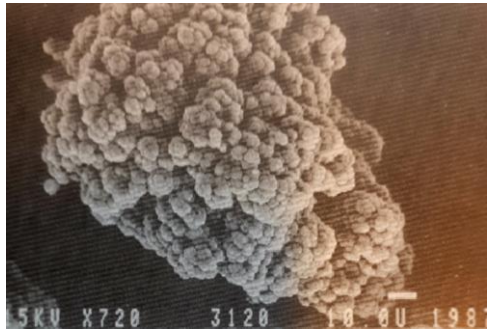
# ARQUEAS METANOGÉNICAS

- Sensibles a sustancias tóxicas presentes en el sistema (metales pesados, detergentes, etc.)
- Generadas en el proceso (amoníaco, sulfuro y ácidos grasos volátiles)
- Presencia de otros aceptores de electrones ($NO_3^-$) inhiben reversiblemente el proceso de la metanogénesis

# ARQUEAS METANOGÉNICAS

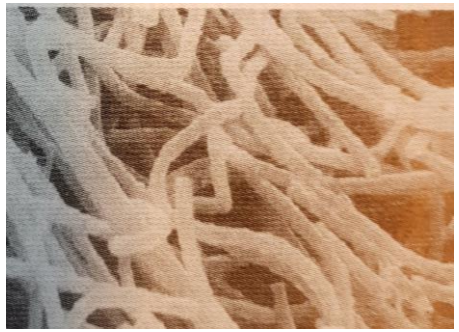
## Metanosarcina

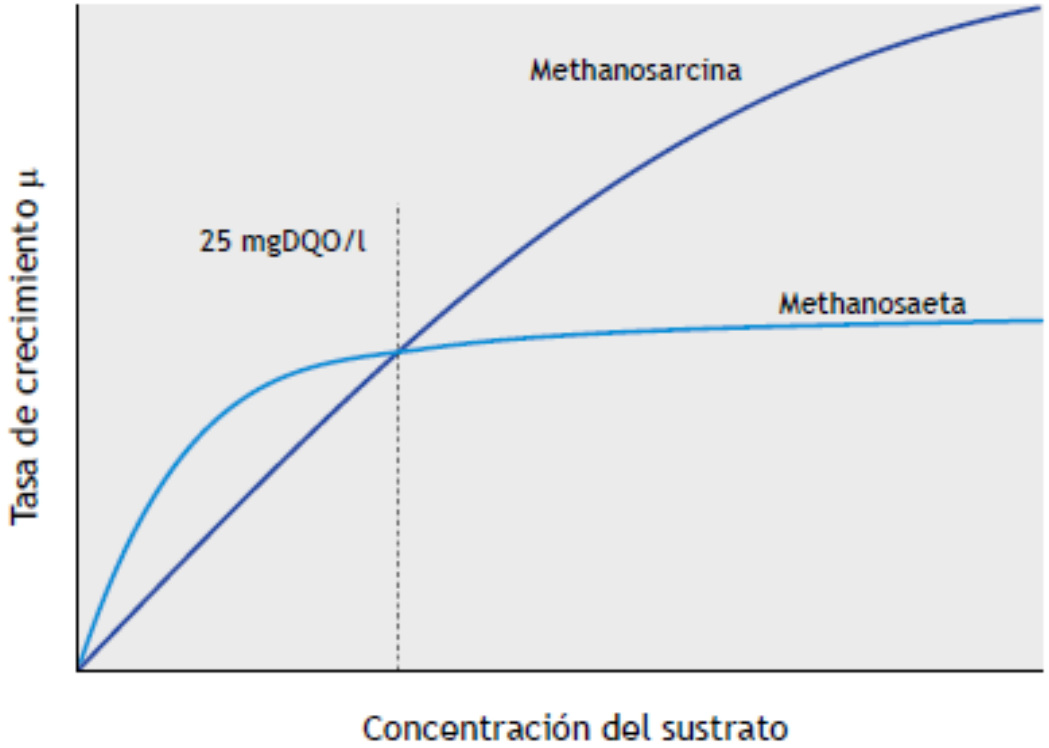
Crecen en racimos.




## Metanosaeta

Filamentos que aparecen en conglomerados tipo “spaguetti”.





# ASPECTOS CINÉTICOS EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

Dado que la digestión anaerobia de materia orgánica es un proceso compuesto por muchos pasos que involucran la acción sucesiva de distintas poblaciones microbianas, la velocidad global de conversión del sustrato está determinada por las características cinéticas del paso más lento.

# ASPECTOS CINÉTICOS – PASO LIMITANTE

## Sustratos difícilmente biodegradables

- El paso de hidrólisis ha sido reportado como el que gobierna la velocidad global de degradación.

## Sustratos fácilmente biodegradables

- El paso de acetogénesis y la metanogénesis han sido reportados como los que gobiernan la velocidad global de degradación.

# PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE METANO

**Temperatura del proceso**

**Composición del sustrato**

**pH del líquido**

# PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE METANO

## Composición del sustrato

- Si el sustrato contiene concentraciones altas de otros aceptores de e- ($NO_3^-$, $SO_4^{-2}$) estos serán reducidos primero
- El estado de oxidación medio del carbono en la alimentación

## pH en el reactor

Una pequeña acidez (6,3-6,6) reduce la actividad de los organismos metanogénicos

Menos ácidos grasos son oxidados y eso provoca una nueva bajada de pH

Al llegar el pH a 4,5 (máx capacidad buffer de los ácidos orgánicos) no se produce más metano.

Probablemente las metanogénicas han sido irreversiblemente dañadas

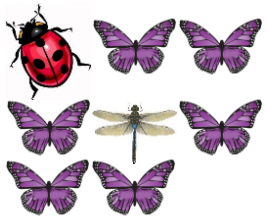
# MONITOREO DEL FUNCIONAMIENTO DEL REACTOR

- Producción y composición del biogás
- DQO a la entrada y salida del reactor
- pH y ácidos grasos volátiles
- Capacidad buffer
- Seguimiento de la biomasa

# BIOLOGÍA MOLECULAR

- El estudio de la estructura, función y composición de las moléculas biológicamente importantes
- Estudia dos grandes grupos de macromoléculas
  - Ácidos nucleicos (ADN y ARN)
  - Proteínas

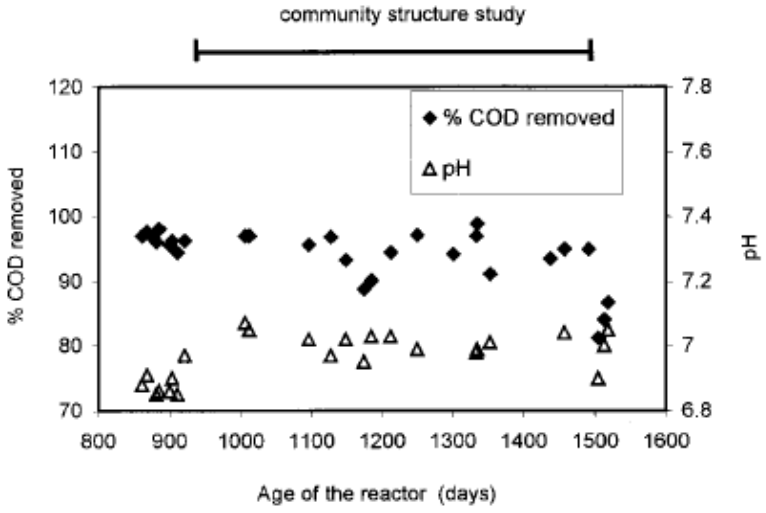
# PREGUNTAS QUE SE PUEDEN RESPONDER CON HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA A LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

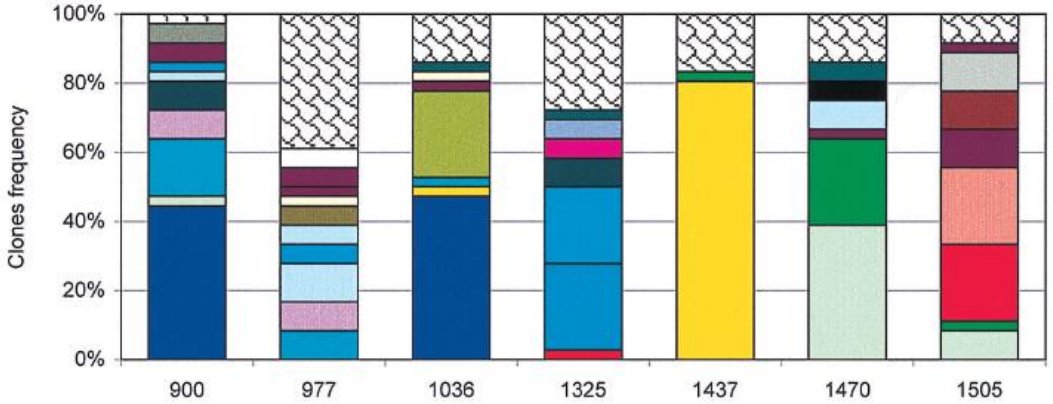
- Diversidad 
- Dinámica ¿Cómo varían en el tiempo?
- Estructura ¿Cuántos son?
- Función ¿Qué hacen?

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 1999, p. 3697–3704 Vol. 65, No. 8
0099-2240/99/$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

# How Stable Is Stable? Function versus Community Composition

ANA FERNÁNDEZ,[1,2] SUIYING HUANG,[1] SHERRY SESTON,[1,3] JIAN XING,[1,4]† ROBERT HICKEY,[1,4,5] CRAIG CRIDDLE,[1,4]‡ AND JAMES TIEDJE[1,3]*



769 © IWA Publishing 2011 Water Science & Technology | 63.4 | 2011

**A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities**

B. F. G. Pycke, C. Etchebehere, P. Van de Caveye, A. Negroni, W. Verstraete and N. Boon

Environmental Microbiology (2008) doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01572.x

**How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology**

Massimo Marzorati,[1†] Lieven Wittebolle,[1†] Nico Boon,[1] Daniele Daffonchio[2] and Willy Verstraete[1*]
[1]Laboratory for Microbial Ecology and Technology (LabMET), Gent University, B9000 Gent, Belgium.

**Introduction**

In the past years, the use of molecular tools in microbial molecular ecology to study the diversity and dynamics of microbial communities increased steadily. The fast accu-

Bioresource Technology 197 (2015) 208–216

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Key microbial communities steering the functioning of anaerobic digesters during hydraulic and organic overloading shocks

Leticia Regueiro *, Juan M. Lema, Marta Carballa
Department of Chemical Engineering, Institute of Technology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Appl Microbiol Biotechnol (2011) 89:303–314
DOI 10.1007/s00253-010-2858-y

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING

**Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors**

Marta Carballa · Marianne Smits · Claudia Etchebehere · Nico Boon · Willy Verstraete

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Current Opinion in Biotechnology

**Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus**

Marta Carballa, Leticia Regueiro and Juan M Lema

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Current Opinion in Biotechnology

**Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques**

Inka Vanwonterghem[1,2], Paul D Jensen[1], Dang P Ho[1], Damien J Batstone[1] and Gene W Tyson[1,2]

# ¿QUÉ SE ESTÁ BUSCANDO?

Entender el microbioma anaerobio

Determinar "indicadores microbianos"

# BIBLIOGRAFÍA


- Tratamiento biológico de aguas residuales: Principios, modelación y diseño. By: Carlos M. López Vázquez; Germán Buitrón Méndez; Héctor A. García; Francisco J. Cervantes Carrillo.

Disponible en:

https://iwaponline.com/ebooks/book/707/Tratamiento-biologico-de-aguas-residuales

- Brock. Biología de los microorganismos. Michael Madigan et al.

Disponible en: https://biblo.timbo.org.uy/opac/#fichaResultados