



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

MICROBIOLOGÍA ANAEROBIA II

Curso “Diseño y Operación de Sistemas Anaerobios”

Cecilia Callejas

ceciliac@fing.edu.uy

1

Organización

1. Introducción a fundamentos de la microbiología

- Definición de microorganismos y tamaños
- Organización celular de procariotas y eucariotas
- Comparación de estructuras celulares básicas: bacterias y arqueas
- Breve introducción a la diversidad microbiana.

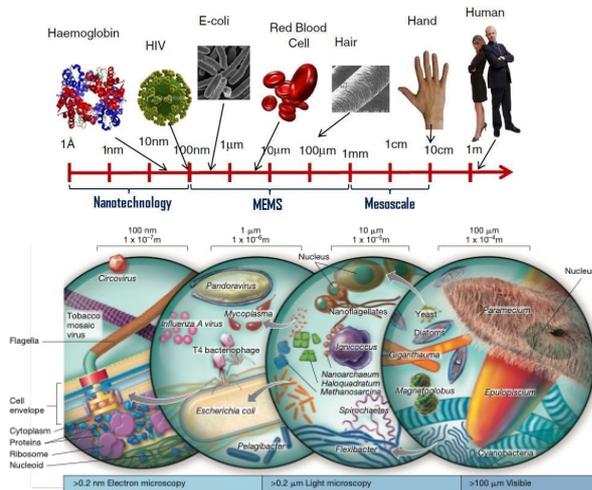
2. Principios microbiológicos involucrados en la digestión anaerobia

- Estructura de gránulos anaerobios: bacterias anaeróbicas, arqueas metanogénicas
- Conceptos de Ecología Microbiana en el proceso de DA
- Herramientas de Biología Molecular y ejemplos

2

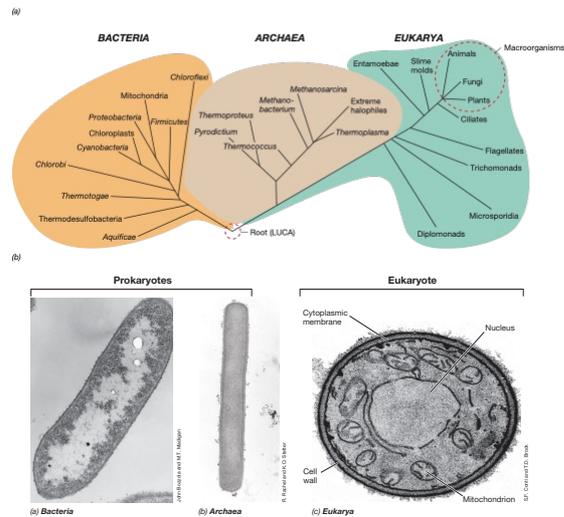
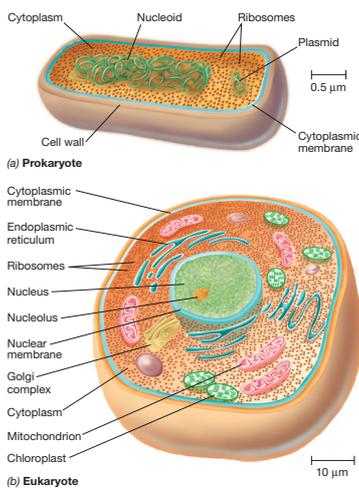
Introducción a la microorganismos

- Los microorganismos se definen como aquellos organismos que por su tamaño solo pueden observarse al microscopio
- Bacterias, arqueas, cianobacterias, microalgas, protozoarios, hongos y levaduras y virus
- Pueden vivir como células de una única especie o en comunidades en donde establecen interacciones con otras especies
- Habitan en el planeta antes que las plantas y los animales
- Representan la mayor fracción de biomasa del planeta



3

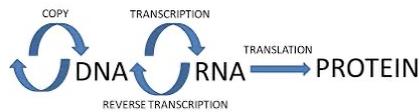
Organización celular en procariontas y eucariotas



4

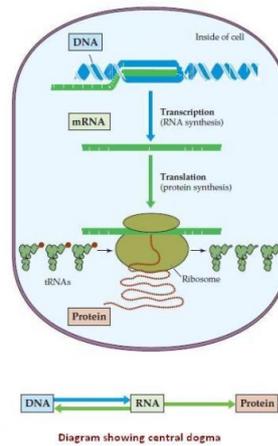
Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) contienen la **información** genética de la célula almacenada químicamente

El dogma central de la Biología Molecular:



ADN o DNA: Ácido desoxirribonucleico

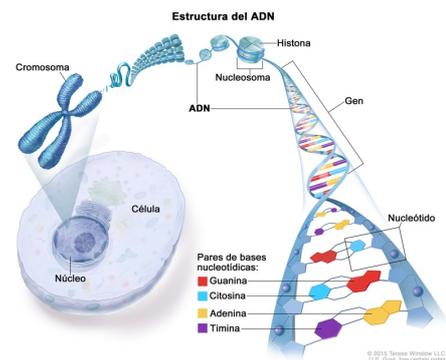
ARN o RNA: Ácido ribonucleico



5

Información genética: algunos conceptos

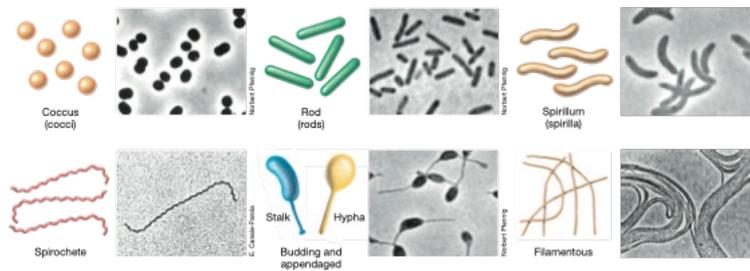
- La unidad genética funcional de la información es el **gen**. Es una **secuencia o segmento de ADN** necesario para la síntesis de ARN que luego se traducirá en una proteína.
- Todas las formas de vida que conocemos contienen genes
- Físicamente los genes están localizados en cromosomas y dentro de estos en *loci*
- Químicamente la información genética es conservada en el ADN
- El ADN es el molde de la información (*blueprint*), mientras que el ARN es una biomolécula intermediaria para convertir el molde, a una secuencia de aminoácidos específicos o proteína.



6

Células procariotas

- Los organismos procariotas comprenden bacterias y arqueas
- Las células pueden describirse por su forma (morfología) y tamaño
- La distribución de tamaños es muy variable
- En comparación más pequeñas que células eucariotas



7

Diferencias entre arqueas y bacterias

Característica	Arqueas	Bacterias
Dominio	Archaea	Bacteria
Pared celular	Sin peptidoglicano; pueden contener pseudopeptidoglicano o proteínas	Contienen peptidoglicano (mureína)
Membrana celular	Enlaces éter en lípidos de membrana	Enlaces éster en lípidos de membrana
ARN polimerasa	Múltiples tipos, similares a las de eucariotas	Un tipo principal
Ribosomas	70S (pero muy similares a los de eucariotas)	70S
Ambientes	Extremos (altas temperaturas, alta salinidad, alta acidez) y ambientes normales	Ambientes variados, incluyendo normales y extremos
Metabolismo	Diversos, incluyen metanogénesis	Diversos, no incluyen metanogénesis
Genoma	Circular, con secuencias y características genéticas únicas	Circular, con secuencias y características genéticas diferentes
Reacción a antibióticos	Generalmente resistentes a antibióticos que afectan a bacterias	Generalmente sensibles a antibióticos específicos

8

¿Dónde encontramos microorganismos?

- Los microorganismos se encuentran en casi todos los ambientes del planeta y tienen un impacto en varias áreas que van desde ciclos biogeoquímicos, hasta aplicaciones en la industria, bioenergías o salud animal y humana.



9

Recursos y condiciones para el crecimiento celular

Table 23.1 Major resources and conditions that govern microbial growth in nature

Resources	Conditions
Carbon (organic, CO ₂)	Temperature: cold → warm → hot
Nitrogen (organic, inorganic)	Water potential: dry → moist → wet
Other macronutrients (S, P, K, Mg)	pH: 0 → 7 → 14
Micronutrients (Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Ni, Mn, Ni)	O ₂ : oxic → microoxic → anoxic
O ₂ and other electron acceptors (NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Fe ³⁺ , etc.)	Light: bright light → dim light → dark
Inorganic electron donors (H ₂ , H ₂ S, Fe ²⁺ , NH ₄ ⁺ , NO ₂ ⁻ , etc.)	Osmotic conditions: freshwater → marine → hypersaline

- **CONDICIÓN** Cualquier factor abiótico que varía en el espacio y en el tiempo. No son consumidos por los organismos
- **RECURSO** Cantidad de algo que puede ser reducido por la actividades de un organismo vivo durante su crecimiento y desarrollo
- Diferencias en el tipo y la cantidad de los recursos y las condiciones fisicoquímicas de un hábitat definen el **nicho** para cada microorganismo

10

Lodos de biomasa granular: anaerobios

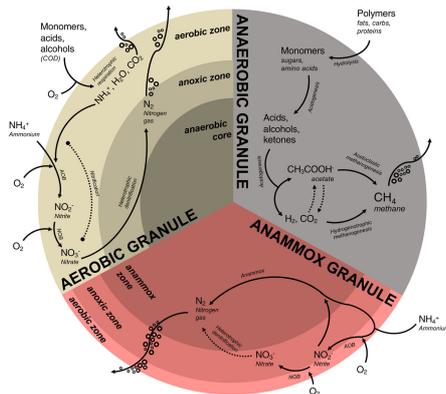


Figure 1. Zones of activity, and biochemical conversions, characteristic of anaerobic, aerobic and anammox granules.

CITIZEN SCIENCE IN ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
Taylor & Francis

Granular biofilms: Function, application, and new trends as model microbial communities

Anna Christine Treger¹, Simon Mills², and Gavin Collins^{3,4*}

¹Marine Communities Laboratory, School of Natural Sciences, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland; ²Open Institute, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland; ³Water Engineering Group, School of Engineering, The University of Glasgow, Glasgow, UK

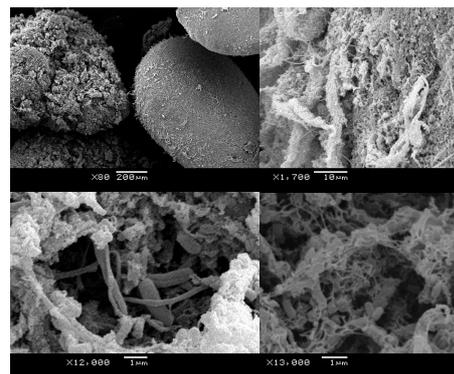


Características: esférico, 0,5 a 3mm, alta densidad, sedimenta, produce biogas, mayor resistencia a inhibidores

11

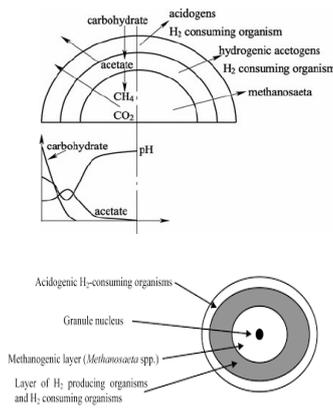
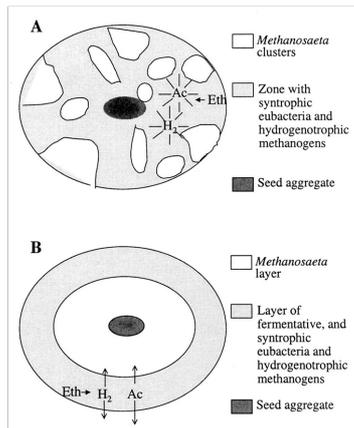
En el caso de los gránulos anaerobios

- Organismos quimiótrofos: quimiheterótrofos y quimioautótrofos
- Fuente de C: orgánica (monómeros de azúcares, proteínas, ácidos grasos y AGVs) e inorgánica (CO₂)
- Respiración anaerobia (aceptor de e- distinto al O₂, ambiente reductor) y/o metabolismo fermentativo
- Estas características generan nichos para una gran cantidad de especies de bacterias y arqueas | con metabolismo anaerobio y/o fermentativo.
- Arqueas y bacterias anaerobias



12

Los micorambientes del gránulo alojan distintos grupos metabólicos



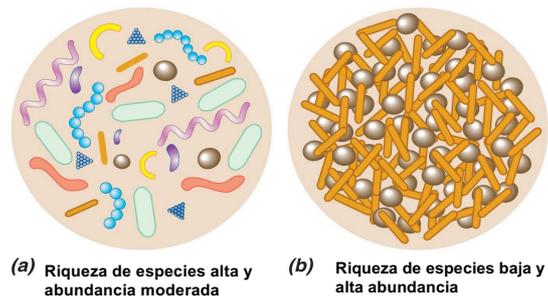
- Formación, al inicio agregado de microcolonias y producción de EPS, crecimiento, maduración y estabilización
- Los m.o. están rodeados de microambientes (conc. nutriente, pH)
- Un gránulo posee distintos microambientes
- Comunidades con cierta complejidad y diversidad

G. Gonzalez-Gil et al. Appl. Environ. Microbiol. 2001.67.3683-3692

13

Diversidad microbiana: comunidades

- Riqueza: Número total de especies presentes
- Abundancia: Proporción de cada especie en la comunidad
- Pueden cambiar rápidamente en el tiempo
- Uno de los objetivos de la Ecología Microbiana es entender los cambios en la riqueza y la abundancia junto con las actividades de las comunidades y los factores abióticos

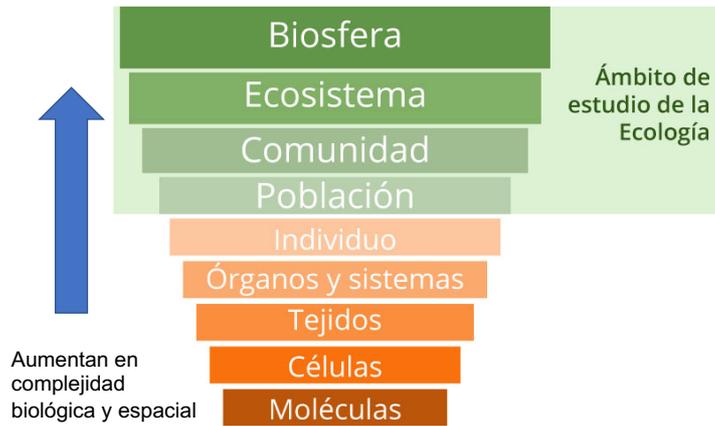


14

¿Cómo estudiamos las comunidades?

La Ecología Microbiana se centra en conocer cómo se ensamblan las poblaciones microbianas para formar comunidades y cómo esas comunidades interactúan entre ellas y el ambiente

Quiénes y qué hacen



15

Podemos describir las reacciones y su cinética

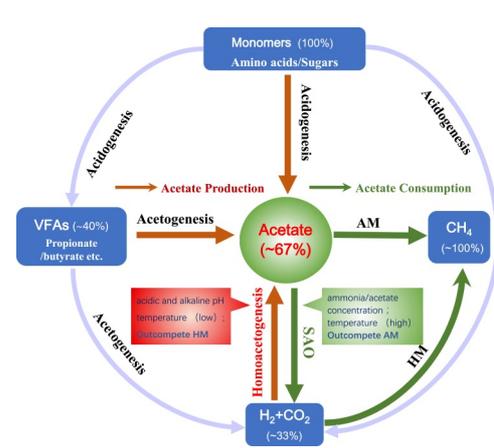
Table 1
Main anaerobic bioreactions during the whole anaerobic digestion.

Bioreactions ¹	ΔG° (kJ)
Acidogenic reactions:	
(1) Acetate: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$	-206
(2) Butyrate: $C_4H_8O_2 \rightarrow CH_3CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$	-254
(3) Propionate: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$	-279.4
(4) Lactate: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + H^+$	-225.4
(5) Ethanol: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$	-164.8
(6) Butyrate: $2CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \rightarrow CH_3CH_2COOH + 2HCO_2^- + 2H^+ + 2H_2$	-56.3
(7) Valerate: $CH_3CH_2COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 4H_2O$	-143.3
(8) Valerate: $3CH_3COO^- + 3H_2 + 2H^+ \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 4H_2O$	-96.7
(9) Valerate: $CH_3(CH_2)_3COO^- + CH_3COO^- + 2H_2 + H^+ \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 2H_2O$	-48.0
(10) Caproate: $CH_3(CH_2)_4COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COO^- + 4H_2O$	-143.3
Acetogenic reactions:	
(11) Propionate: $CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$	+76.2
(12) Butyrate: $CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$	+48.4
(13) Lactate: $CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + 2H_2$	-4.2
(14) Ethanol: $CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$	+9.6
Methanogenic reactions:	
(15) Hydrogen: $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-135.0
(16) Acetate: $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-31.0
(17) Formate: $4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-304.2
(18) Methanol: $4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-312.8
(19) Ethanol: $2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH$	-31.6
Syntrophic acetate oxidizing reaction:	
(20) $CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 4H_2$	+104.6
Homoacetogenic reactions:	
(21) Autotrophic: $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	-104.6
(22) Heterotrophic: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH + 3H^+$	-310.9

¹ Cited from Saady 2013, Lee et al. 1988.

X. Pan, L. Zhao, C. Li et al.

Water Research 190 (2021) 116774



Si bien describe la cinética, no tiene en cuenta distintos grupos de m.o. sino las transformaciones químicas

16

Podemos conocer la estructura taxonómica

- Por métodos independientes de cultivo (moleculares)
- MiDAS 5 tiene la mayor base de datos del gen 16S de microbiotas de DA
- La diversidad microbiana en la DA es enorme, aunque siempre < 1000 generos o especies

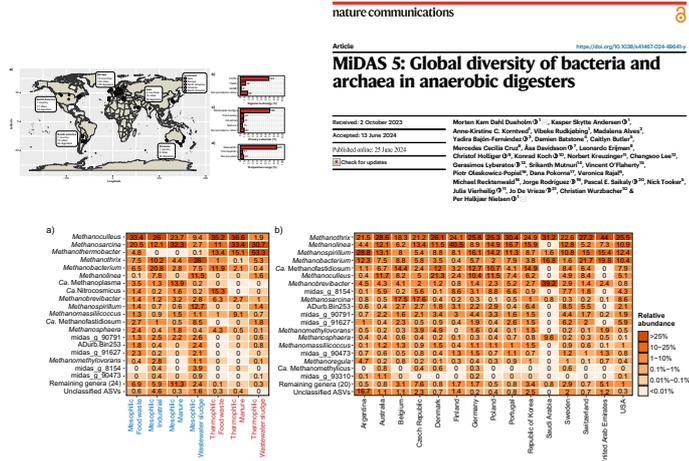
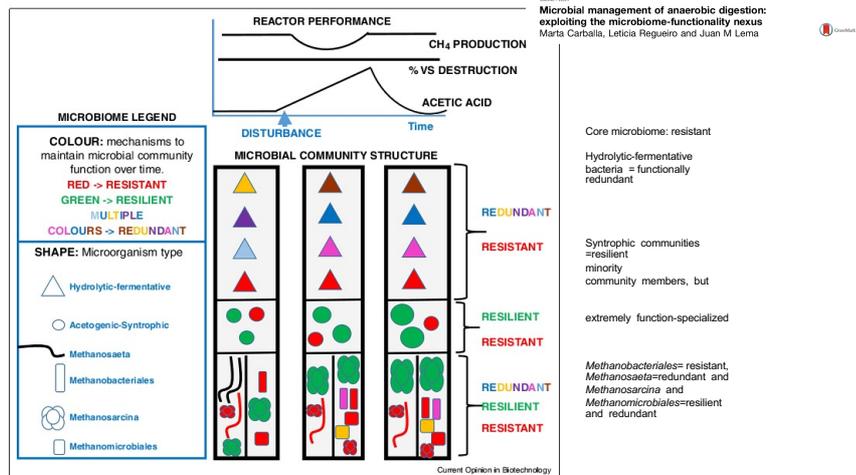


Fig. 6 | Top 25 archaeal genera based on V4 amplicon data. The percent relative abundance represents the mean abundance relative to all archaea across (a) different temperature range and primary substrates, and (b) different countries considering only mesophilic ADs treating mainly wastewater sludge.

17

Podemos describir las interacciones en base a su función ecológica en la comunidad

- Este modelo toma en cuenta la respuesta de los distintos grupos de m.o. en términos de su función en la comunidad
- Ayuda a identificar organismos clave, que no pueden desearcer



18

¿Cómo hacemos? Herramientas moleculares y microscopia

Rev Environ Sci Biotechnol (2021) 14:855–903
 DOI 10.1007/s11743-020-0360-8

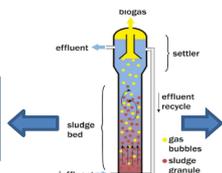
REVIEW PAPER



How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?

Angela Cabezas · Juliana Calabró de Araújo · Cecilia Caldas · Annaliese Gallo · Jérôme Hamelin · Antonella Marone · Diana Z. Sousa · Eric Trably · Claudia Echeverri

Reactor configuration, substrate composition, source of inoculum.
 Environmental data
 pH, T, HRT, SRT, OLR, VFA, SSV, CH₄



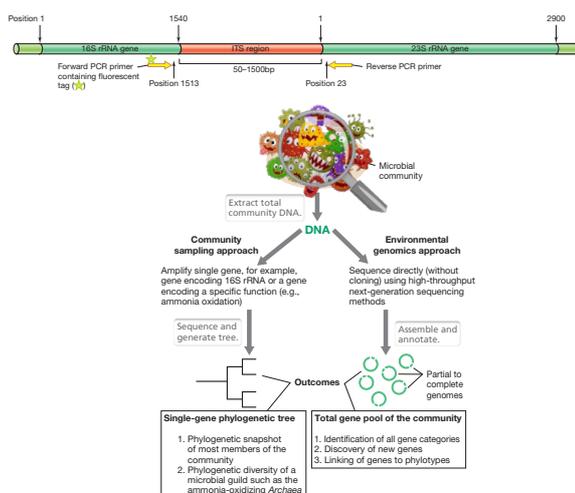
Define question Choose technique
 Biomass sampling
 Storage /Fixation for FISH
 DNA/RNA / proteins extraction

Question	Who is there?	Changes during operation ?	How many ?	Which is the function ?
Methods	Cloning & sequencing NGS	DGGE T-RFLP SSCP	Q-PCR FISH	Advanced FISH SIP Meta-omics
Results obtained	Sequences OTUs matrix Taxonomy Phylogenetic tree 	Gel/ Chromatogram Band/peak matrix Taxonomy Band/peak 	Copy number Biovolume 	Identity of active cells Metabolic diversity Genes Transcripts Proteins Molecules
Data analysis	Cluster analysis PCA, CCA Diversity indices Rr, Dy, Fo 			Amount of mRNA Energy pathway

19

Estructura de la comunidad: Quiénes?

- Librerías de amplicones de ARNr de 16S/V4
- Librerías metagenómicas por shotgun (MAGs y 16S)
- Identifican a nivel de género
- Se estiman diversidad (riqueza de especies y abundancias relativas)
- Se pueden analizar varias muestras (series temporales) para monitorear cambios en la estructura de la comunidad



20

Estructura de la comunidad: Cuántos?

- F.I.S.H. (Fluorescence in situ hybridization)
- Identificación de Microorganismos Específicos y/o de la estructura microbiana. Sondas para para determinados grupos de bacterias y arqueas, permite la visualización de diferentes grupos presentes y su distribución espacial.
- Monitoreo, de la dinámica de las poblaciones microbianas durante los procesos de digestión anaerobia, facilitando el control y optimización del proceso.
- 4. Detección demetanogénicas y/o ulfatoreductoras, que son cruciales en la digestión anaerobia.
- Estudios de Interacciones Microbianas, ayuda en el estudio de interacciones simbióticas y antagonistas entre diferentes poblaciones microbianas en los lodos anaerobios.
- Diagnóstico de Problemas en Sistemas de Digestión Anaerobia, mediante la identificación de cambios en la población microbiana
- Estudios de Biopelículas, permite la visualización y estudio de biopelículas en los sistemas de tratamiento de lodos, ayudando a entender su formación y desarrollo.
- Se necesita infraestructura y personal entrenado

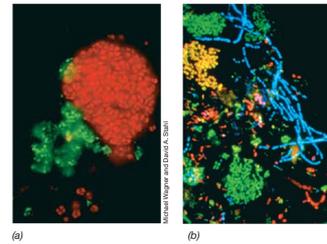
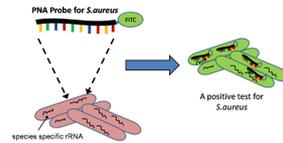


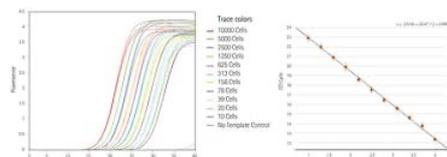
Figure 22.10 FISH analysis of sewage sludge. (a) Nitrifying bacteria. Red, ammonia-oxidizing bacteria; green, nitrite-oxidizing bacteria. (b) Confocal laser scanning micrograph of a sewage sludge sample. The sample was treated with three phylogenetic FISH probes, each containing a fluorescent dye (green, red, or purple) that identifies a particular group of Proteobacteria. Green-, red-, or purple-stained cells reacted with only a single probe; other cells reacted with multiple probes to give blue or yellow.



21

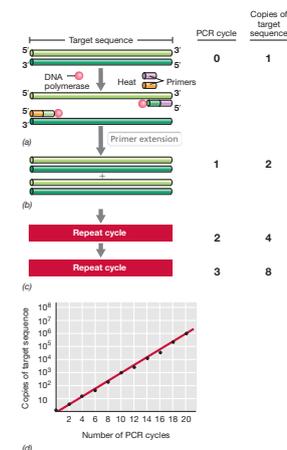
Estructura de la comunidad: Cuántos?

- Q-PCR: es una PCR modificada que permite la detección del número de copias de un gen
- Cuantificación a nivel de dominio (Bacterias/Arqueas) u organismos indicadores a nivel género, especie
- Cuantificación de genes funcionales, monitoreo de patógenos, virus
- Validación de métodos de tratamiento, cuantificación de la reducción de patógenos
- Se necesita infraestructura y personal entrenado



PCR cuantitativo o Q-PCR, PCR en tiempo real o RT-PCR

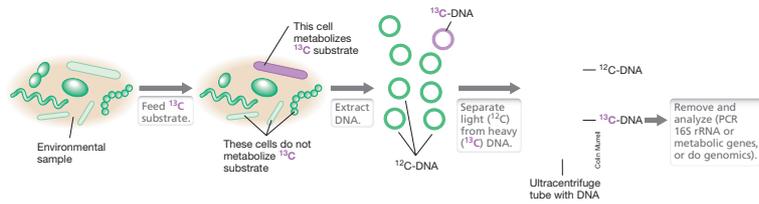
Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR



22

Función de la comunidad: Qué hacen?

- Técnica de Sondas con Isótopos Estables permite identificar los microorganismos que están activamente metabolizando compuestos específicos marcados con isótopos estables, como el carbono-13 (¹³C) o el nitrógeno-15 (¹⁵N).
- Estudio de rutas metabólicas, contribución de los diferentes microorganismos en la degradación de sustrato específicos, análisis de biodegradación de contaminantes

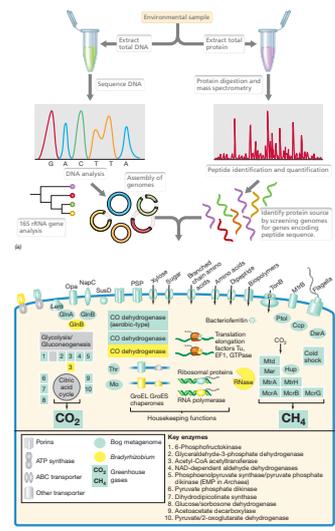
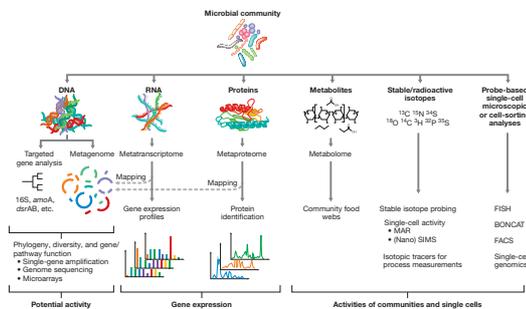


Ejemplo: Ensayo con sondas con isotopos estables o SIP

23

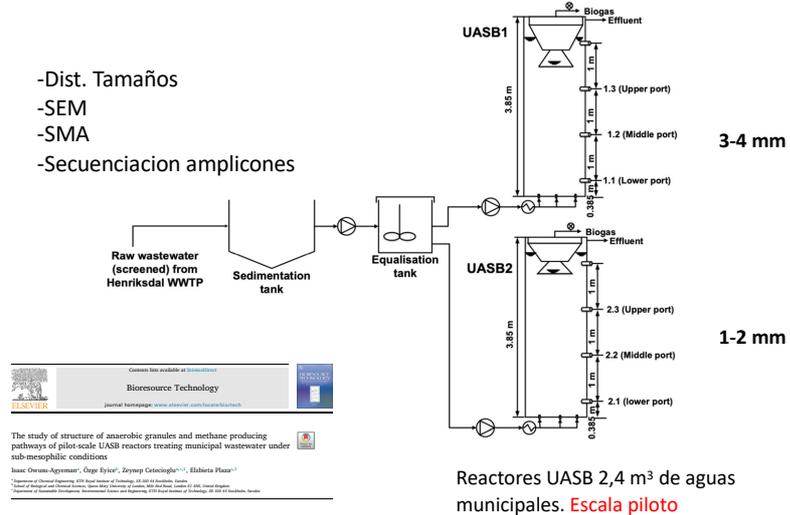
Función de la comunidad: Qué hacen?

- Para conocer las funciones que están se utilizan técnicas que recuperen aquellos metabólicamente activos
- Permite cuantificar a nivel de género, especie, dominio
- Permite cuantificar genes funcionales



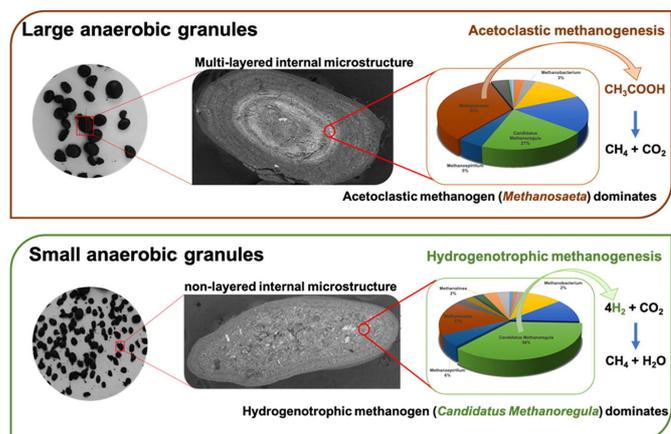
24

Ejemplo 1: Las vías metanogénicas cambian durante la granulación



25

Las vía metanogénica hidrogenotrófica es la principal en gránulos más pequeños



26

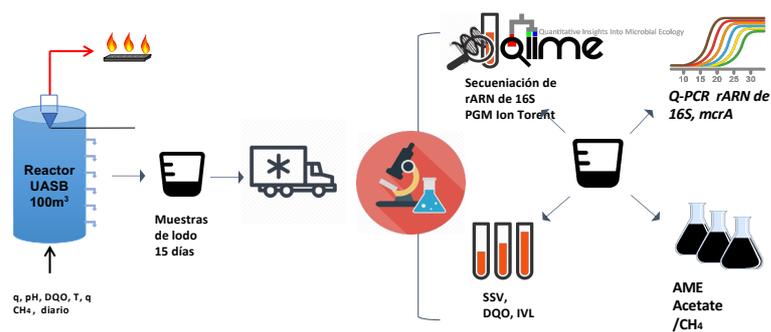
Ejemplo 2: Digestión de efluente lácteo y aumento de pH

- Reactor UASB modificado 40m³ (Passeggi *et al.*, 2012). **Escala real**
- Inoculación 1300kg SSV de lodo floculento proveniente de una laguna anaerobia de frigorífico
- Régimen de alimentación intermitente: 3 días alim./4 días recirculación
- Aumento gradual de carga orgánica por aumento de caudal (q)



27

Estrategia de estudio



28

“el shock de NaOH”

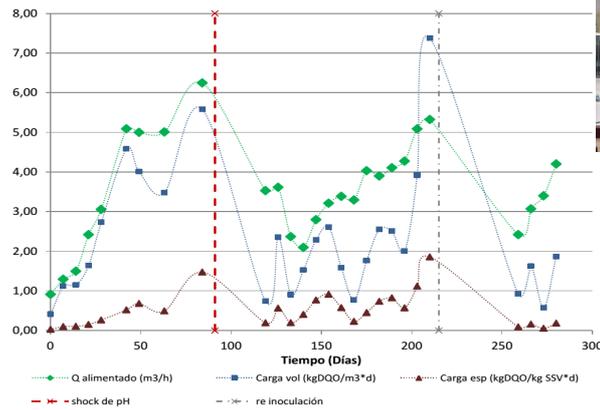
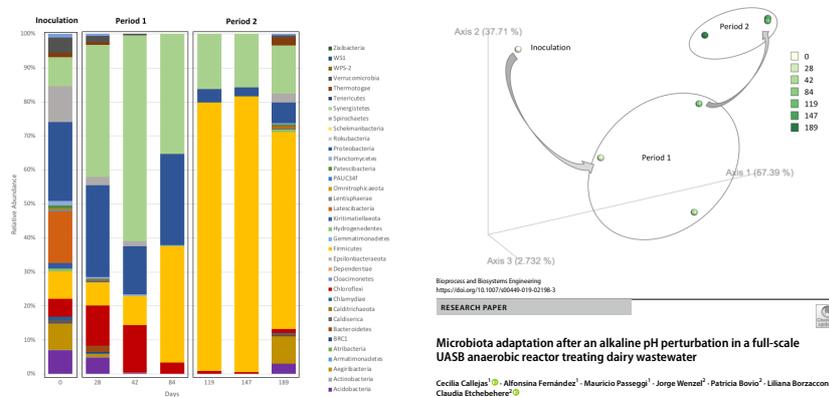


Figura 16 Gráfico de cargas y caudal alimentado al reactor Fuente: Fernández, 2016

29

¿Cómo impactó el aumento de pH en la comunidad de procariontas?

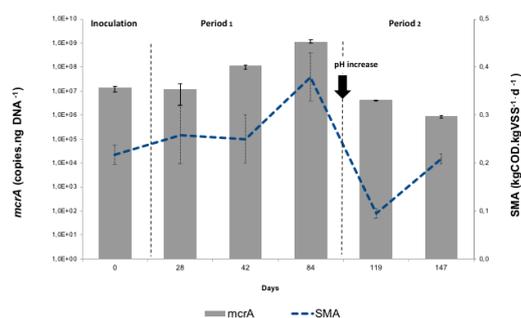
Secuenciación amplicones de ARNr de 16S V4



30

¿Cómo impactó el aumento de pH en la comunidad de arqueas metanogénicas?

Q-PCR de mcrA y actividad metanogénica acetoclastica



31

Ejemplo 3: Codigestión de sólidos en celulosa y lípidos

- 3 digestores 1,5L (CTRS). **Escala lab**
- 54° C (termofilicos)/HRT 15 días
- 3 períodos:
 - I días 0-37 alimentado con estércol ganado (CM)
 - II días 38– 80 alimentado con CM y oleato de Na 12g/L
 - III días 81 – 125 alinetado solo con CM

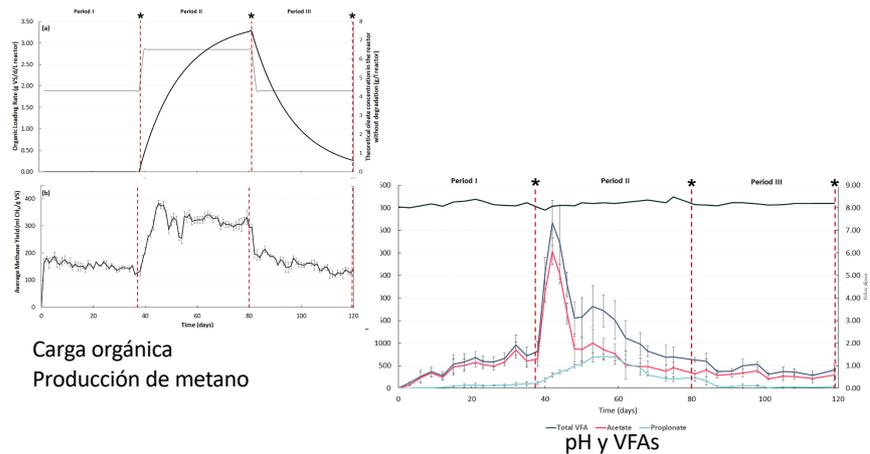


- Sólidos totales, volátiles
- Metano
- pH
- VFAs
- Metagenoma shotgun, MAGs



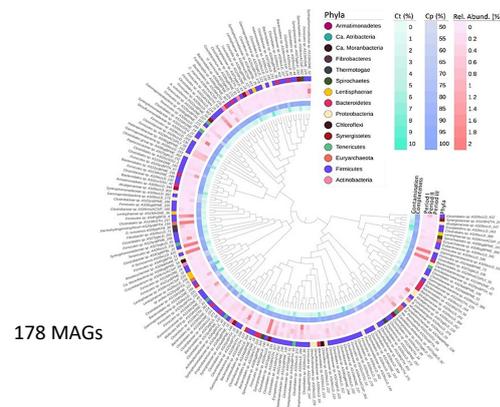
32

El aumento en lípidos se corresponde con un aumento en AGVs y pH



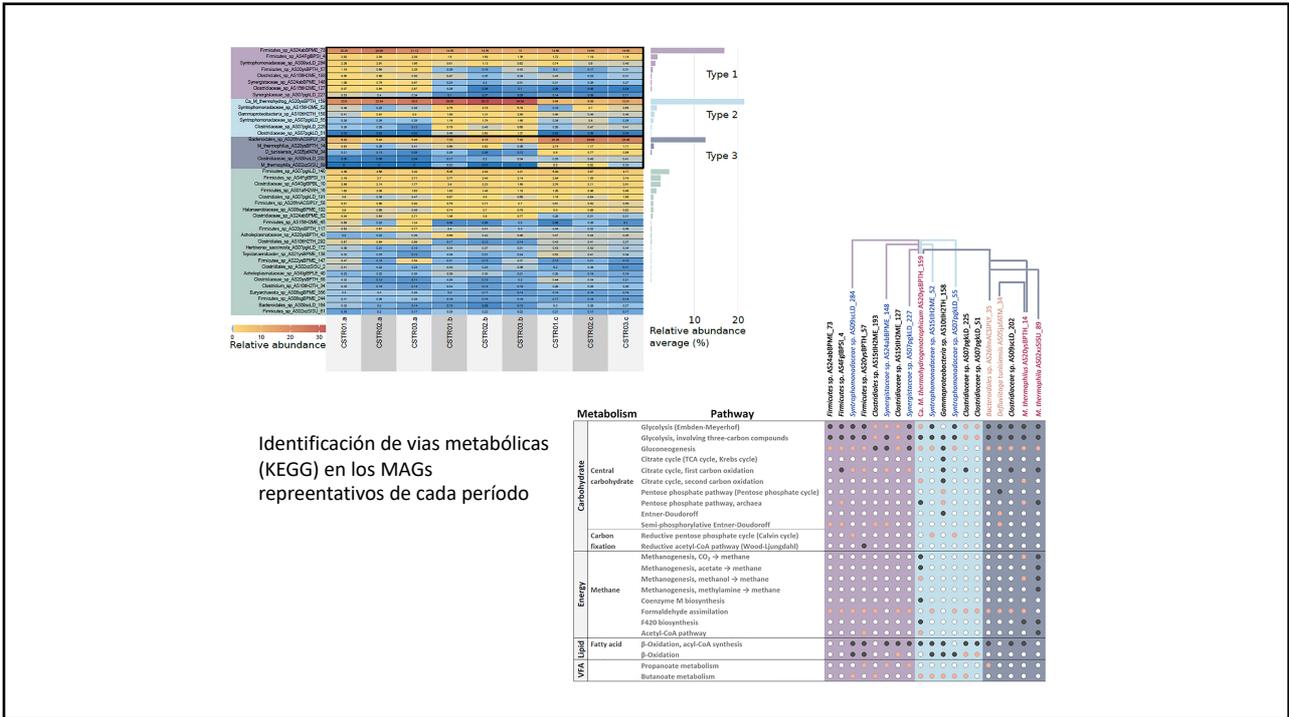
33

Estructura de la comunidad por MAGs

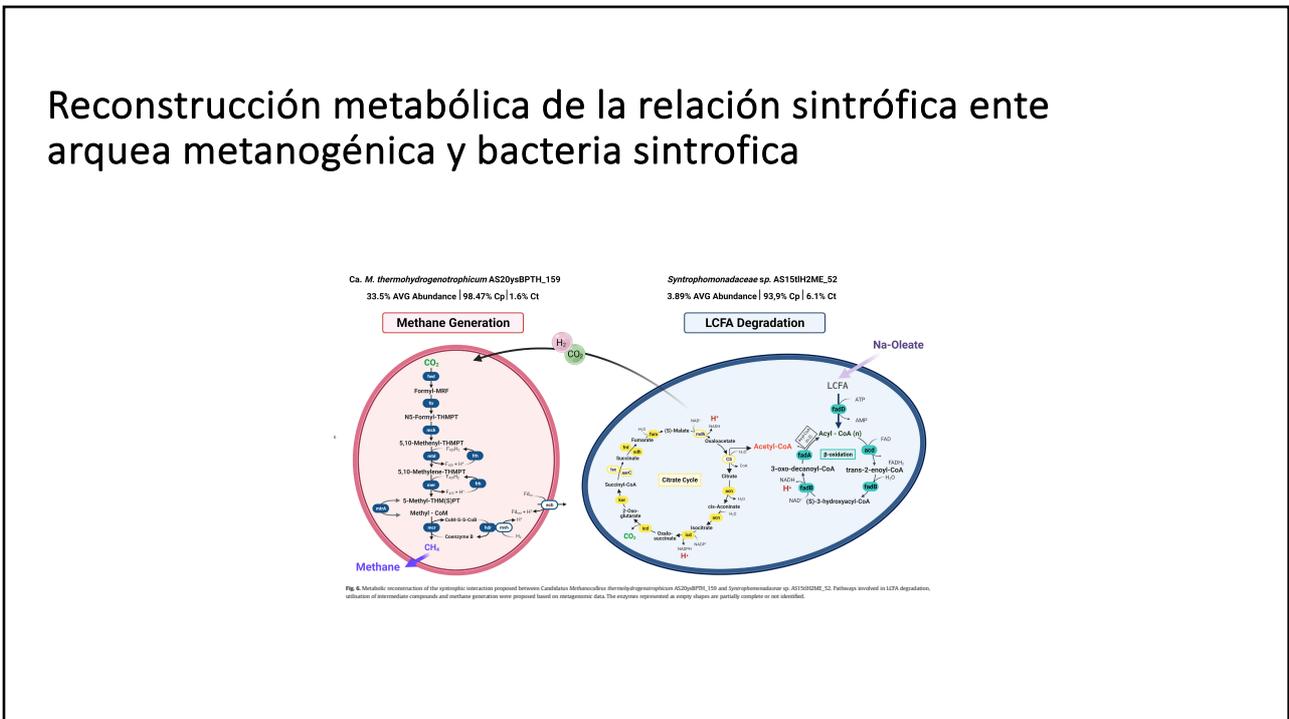


178 MAGs

34



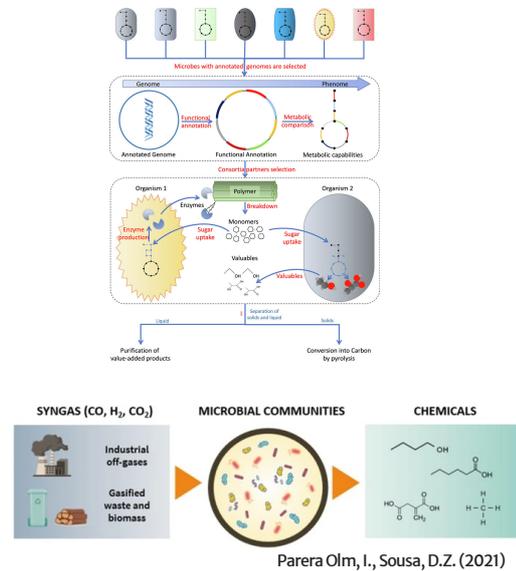
35



36

Acompañando a la transición verde: más allá del biogas

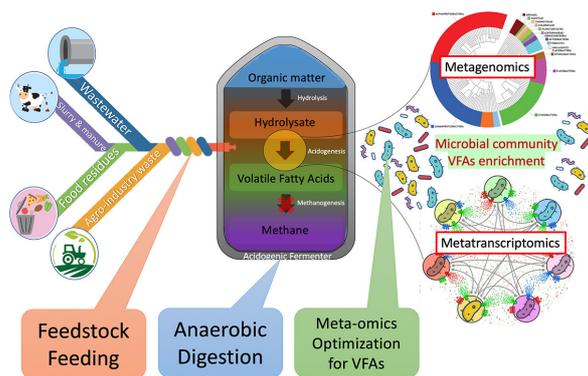
- Estamos en la era de las tecnologías microbianas
- Fermentaciones controladas de cultivos mixtos
- Cambio de paradigma, biodiseño de consorcios microbianos (SynCONS) para obtener productos de interés
- Productos: AGVs, biocombustibles, bioplásticos, combustibles de aviación
- Consorcios microbianos para captura de CO₂, prod. Proteínas, valorización de residuos en productos con alto valor agregado y reciclado de nutrientes, entre otros



37

Concepto para llevar a casa: Las comunidades se pueden manipular

- Los **lodos anaerobios** se caracterizan por poseer **comunidades de bacterias diversas y con redundancia funcional en las primeras etapas** de la digestión anaerobia, **es posible 'manipular'** dichas comunidades, mediante la operación adecuada de los reactores (ambiente) que las contienen y/o el **biodiseño de consorcios microbianos**



Microbiología + Ingeniería = Tecnología Microbiológica

Kumar, R., Kumar, R., Brar, S. K., & Kaur, G. (2022)

38

Metabolismo energético

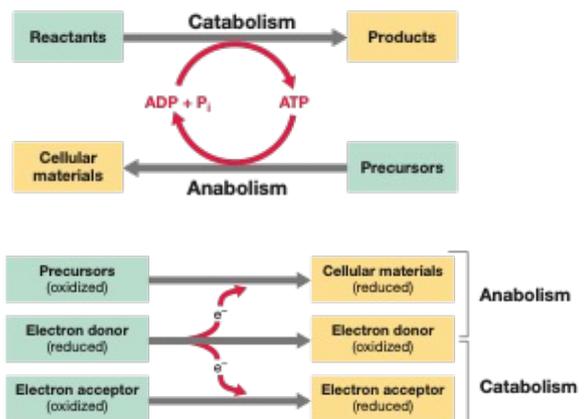
- Se pueden clasificar según su fuente de energía en quimiótrofos o fotótrofos
- Los quimiótrofos conservan la energía ya sea por respiración o fermentación

Tipo	Fuente de energía	Fuente de carbono
Fototróficas:	Luz	--
Fotoautótrofos	Luz	CO ₂
Fotoheterótrofos	Luz	Compuestos orgánicos
Quimiotróficas:	Oxidación compuestos	--
Quimiolautotótrofos	Oxidación de compuestos inorgánicos	CO ₂
Quimiorganohetrótrofos	Oxidación de compuestos orgánicos	Compuestos orgánicos

39

Metabolismo en procariontas

- Conservación de la energía
- Para crecer las células necesitan convertir la energía disponible en sus alrededores en una forma útil para la célula (ATP)
- Flujo de e⁻
- Los requerimientos energéticos básicos: agua, fuente de C y nutrientes, energía libre y poder reductor (e⁻)
- El catabolismo es exergónico y el anabolismo endergónico



40