



Metagenómica de un biorreactor enfocado a producción de biohidrógeno en el proceso de aprovechamiento de vinazas tequileras empleando inóculo pretratado

Jesús Roberto Muñoz-Estrada¹., Jesús Bernardino Velázquez-Fernández¹., Oscar Aguilar-Juárez^{1*}.

¹Unidad de Tecnología Ambiental, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco.

*Autor de correspondencia: oaguilar@ciatej.mx

Recibido 15 de agosto de 2020; aceptado 23 de septiembre de 2020

RESUMEN

Uno de los retos actuales es encontrar y generar fuentes de energía eficientes y menos dañinas para el medio ambiente. El hidrógeno es un gas acarreador de energía eficaz y limpio que se puede producir como metabolito intermediario en el proceso de digestión anaerobia y es posible enfocar la producción hacia este gas. Al realizar un pretratamiento térmico al inóculo empleado, se seleccionan artificialmente aquellos microorganismos resistentes tales como *Bacilli* y predominan géneros de bacterias productoras de biohidrógeno a lo largo de la fermentación, pertenecientes a las clases *Gammaproteobacteria* y *Clostridia*, disminuyendo la presencia de *Archaea* y así haciendo más eficiente la producción. En el presente trabajo se encontró que, en fermentaciones en modo de operación en lote en mesofilia con diferencias clave, tales como presencia o ausencia de nutrientes o procedencia del inóculo, las poblaciones microbianas se enfocan a ser aquellas que se caracterizan por ser anaerobias estrictas, productoras de hidrógeno y de ácidos grasos volátiles tales como *Klebsiella* o *Clostridium*.

PALABRAS CLAVE: Microbiota, dinámica microbiana, OTU, taxonomía, revalorización de residuos.

ABSTRACT

Nowadays, finding and producing energy sources that are both efficient and environmentally friendly is considered a challenge. Hydrogen is a clean, efficient energy carrier that can be produced as an intermediate metabolite in anaerobic digestion and it is possible to focus the process towards the production of this gas. By pretreating the inoculum, we are able to artificially select resistant microorganisms such as *Bacilli* and thus, genera of biohydrogen producers belonging to the *Gammaproteobacteria* and *Clostridia* class predominate throughout the fermentation, lowering the presence of *Archaea* and, in so, making production more efficient. In the present work it is shown that in a batch bioreactor, working in mesophilic conditions but with distinct differences such as presence or absence of nutrients or even the source of the inoculum, microbial population is more focused towards those with characteristics such as being strict anaerobes, hydrogen and volatile fatty acid producers like *Klebsiella* or *Clostridium*.

KEY WORDS: Microbiota, microbial dynamics, OTU, taxonomy, waste revaluation.

INTRODUCCIÓN

Conforme una sociedad progresa tecnológicamente los requerimientos energéticos aumentan a la par, por lo que es de especial relevancia hoy en día buscar y producir energía cada vez mejor en diversos aspectos tales como eficiencia o huella de carbono insignificativa en el medio ambiente. En este sentido, el hidrógeno es un acarreador de energía prometedor, ya que posee una capacidad calorífica de 142 kJ/g y además su combustión sólo genera vapor de agua y energía (Sinha et al., 2011; Stephen et al., 2017).

Un ejemplo de producción de biohidrógeno es la digestión anaerobia, en la cual se aprovecha la materia orgánica presente en desechos agroindustriales o domésticos. Es un proceso trunco, ya que la digestión anaerobia se enfoca en la producción de CH₄ en la cual organismos metanogénicos emplean el H₂ como sustrato con ayuda de bacterias formando una relación sintrópica (Ferreira et al., 2016).

Los microorganismos que participan en dicha fermentación han sido progresivamente descritos en la literatura (Lim et al., 2020), sin embargo, son pocos los trabajos que se dedican a analizar la metagenómica

presente cuando existe un pretratamiento al inóculo, sobre todo cuando se trata de vinazas tequileras.

El objetivo del presente trabajo fue identificar a diferentes niveles taxonómicos los microorganismos más abundantes presentes de manera planctónica en un biorreactor continuamente agitado en modo de operación por lote, alimentado con vinazas tequileras e inoculado con lodo anaerobio granular pretratado térmicamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñaron 3 fermentaciones en lote en un biorreactor de 2.5 L de volumen operacional, a una temperatura de 37.5 °C y pH inicial de 7.5 en condiciones anaerobias, variando entre ellas la procedencia del inóculo (tipo 1 y 2, ambos previamente pretratados térmicamente) y ausencia o presencia de nutrientes añadidos (minerales, fuente de nitrógeno, búffer de pH) y alimentados con vinaza conteniendo 20 g DQO/L, como se presenta en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Diseño experimental de las fermentaciones.

	Inóculo tipo 1	Inóculo tipo 2	¿Adición de nutrientes?
A	X		No
B	X		Si
C		X	Si

Se muestreó líquido del biorreactor a diversos tiempos del proceso fermentativo, las muestras seleccionadas fueron

centrifugadas y lavadas con solución salina; posteriormente, las muestras, en conjunto con las del inóculo seco (correspondientes a A0 y C0) fueron sometidas a extracción mediante el kit FastDNA® Spin Kit for Soil. Se realizaron pruebas de calidad de ADN y se descartaron muestras deficientes. Las pruebas de calidad consistieron en verificar la integridad de los ácidos nucleicos mediante AGE (*Agarose Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Agarosa) así como su pureza evaluada como el cociente entre la absorbancia de la muestra extraída medida a una longitud de onda de 260 nm y la absorbancia de la muestra extraída medida a una longitud de onda de 280 nm, empleando el equipo Nanodrop™ 2000.

Se enviaron las muestras a servicio de secuenciación, solicitando amplificación empleando los cebadores 357wF-CCTACGGGNGGCWGCAG y 806R-GACTACHVGGGTWTCTAAT, los cuales amplifican entre la región V3 y la región V4 del gen codificante ARNr 16S; esto utilizando la plataforma de Illumina Miseq con química de 2x300, trabajando así con amplicones de ~450 bp.

Las secuencias brutas obtenidas fueron sometidas a análisis de calidad y depuración empleando Vsearch en

la plataforma Linux para posteriormente agrupar OTUs a un nivel de similitud del 97%, luego se contrastaron contra la base de datos SILVA versión 138. La matriz de OTUs ya identificada fue graficada empleando MatLab® versión 2018^a a los niveles taxonómicos de dominio, filo, clase y género para identificar los taxones más abundantes.

RESULTADOS

En la Figura 1 se observa, a nivel de dominio, que *Bacteria* domina en abundancia a *Archaea* en todas las muestras. Esto indica que las arqueas presentes en el inóculo (tipos 1 y 2) hayan sido destruidas con el pretratamiento térmico. Asimismo, a pesar de que posiblemente haya presencia de arqueas de forma nativa en la vinaza, no lograron ser lo suficientemente abundantes a lo largo del proceso de fermentación, probablemente porque no tuvieron las condiciones lo suficientemente alcalinas para desarrollarse dada la acidificación del medio conforme avanzaba el tiempo por causa del metabolismo bacteriano y la continua generación de ácidos grasos volátiles.

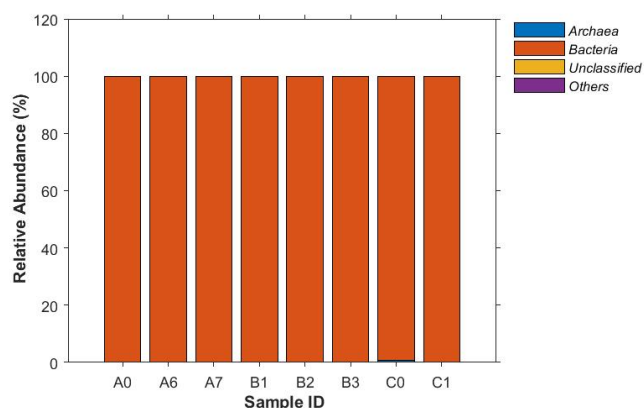


Figura 1. Abundancia relativa de OTUs identificados en el biorreactor a nivel de dominio.

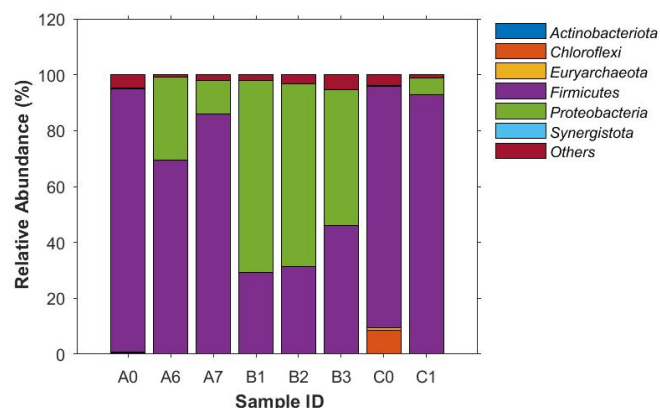


Figura 2. Abundancia relativa de OTUs identificados en el biorreactor a nivel de filo con corte al 0.3%.

A nivel de filo, se aprecia en la Figura 2 que, en el caso de las corridas A y C, mayormente predominaron *Firmicutes*; caso contrario en el caso B que el más abundante es *Proteobacteria* seguido por *Firmicutes*. Se distingue que desde el inóculo (A0, C0) la abundancia relativa de *Firmicutes* es >90%, mientras que a lo largo del proceso fermentativo varía la abundancia de *Proteobacteria* en todos los casos. Existe presencia de otros taxones mucho menos abundantes tales como *Chloroflexi*, *Actinobacteriota* o *Euryarchaeota*; este último siendo parte del dominio *Archaea*.

Los taxones más abundantes a nivel de clase se pueden observar en la Figura 3. Se distingue que en el inóculo pretratado (tipos 1 y 2) se encuentra gran presencia de *Bacilli*, abarcando el 80% de la abundancia relativa. Conforme la fermentación se lleva a cabo, en el caso de A y C las clases que abundan son *Clostridia*, mientras que en el caso de B las más abundantes son *Gammaproteobacteria*, seguida por *Clostridia*. Dado que en el biorreactor se mantuvieron condiciones de anaerobiosis, no es sorpresa que esta última sea la clase más abundante ya que se caracterizan por ser estrictamente anaerobios, a diferencia de *Bacilli* que poseen también metabolismo aerobio, por lo que se intuye que este último taxón permaneció dominado sobre los demás.

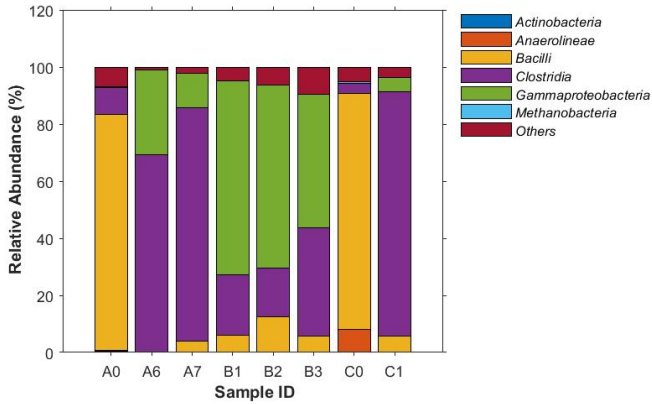


Figura 3. Abundancia relativa de OTUs identificados en el biorreactor a nivel de clase con corte al 0.4%.

Por otro lado, en la Figura 4 se observan los géneros de bacterias con mayor abundancia en las muestras. Se distingue que en las muestras A6, A7 y C1 se encuentra con gran abundancia *Clostridium*, género caracterizado por ser mayormente anaerobio, formadores de endosporas y presente en en el tracto gastrointestinal de mamíferos, algunos siendo incluso capaces de excretar enzimas degradadoras de polisacáridos, por lo tanto, útiles en el proceso de aprovechamiento de bagazo u otros desechos lignocelulósicos. En el caso de las muestras B1, B2 y B3 se puede distinguir que el taxón más abundante es *Klebsiella*, género característico por ser anaerobio facultativo, ubicuo en la naturaleza pero también presente en el tracto gastrointestinal cuyas condiciones óptimas de desarrollo son iguales a las

condiciones de operación ya descritas. Su abundancia disminuye y esto puede ser atribuido a la acidificación del medio. Conforme avanza el tiempo, en todas las corridas (correspondientes a las muestras A7, B3, C1) la riqueza bacteriana mejora, reflejado en el aumento de la abundancia relativa de *Others*, indicando el desarrollo de otros taxones que inicialmente eran menos abundantes pero que las nuevas condiciones (el pH del medio, la presencia de ácidos, la disminución de nutrientes conforme avanza la fermentación) lo propician. Asimismo, la mayoría de las bacterias presentes son capaces de producir ácidos grasos volátiles, intermediarios que normalmente se emplearían para la producción de CH₄.

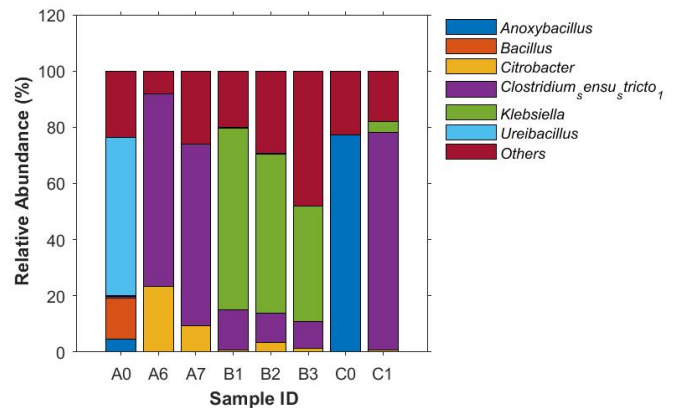


Figura 4. Abundancia relativa de OTUs identificados en el biorreactor a nivel de género con corte al 8%.

CONCLUSIONES

En el proceso de aprovechamiento de vinazas enfocado hacia la producción de biohidrógeno, existe presencia de taxones que son característicos de ser mayormente anaeróbicos y algunos esporuladores, así como generadores de ácidos grasos volátiles. El pretratamiento térmico es una buena técnica para seleccionar bacterias resistentes productoras de H₂, optimizando así la producción de energía limpia y eficiente, reflejándose en una abundancia relativa importante de géneros tales como *Klebsiella* o *Clostridium*.

El uso de otras herramientas tales como *Shotgun sequencing* o análisis proteómico permitirían ahondar en la anotación taxonómica, así como profundizar en el metabolismo para cada tipo de microorganismo o de la fermentación en general. Finalmente, tener en cuenta que no todos los microorganismos están presentes de manera planctónica, sino que algunos son capaces de excretar una matriz de polisacáridos y, así, adherirse a las paredes del biorreactor o demás superficies internas por lo que también es de interés su análisis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Sectorial CONACYT Secretaria de Energía-Sustentabilidad Energética, proyecto 247006 “Clúster biocombustibles gaseosos”.

BIBLIOGRAFÍA

- Lim, J. W., Park, T., Tong, Y. W. & Yu, Z. (2020). *The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis*. *Advances in Bioenergy*, 5:1–61.
- Sinha, P. & Pandey, A. (2011). *An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production*. *Int. J. Hydrogen Energy*, 36:7460-7478.
- Stephen, A. J., Archer, S. A., Orozco, R. L. & Macaskie, L. E. *Advances and bottlenecks in microbial hydrogen production*. *Microb Biotechnol.* 2017;10(5):1120-1127.
- Ferreira-Rosa, P. R., & Silva, E. L. (2017). *Review of Continuous Fermentative Hydrogen-Producing Bioreactors from Complex Wastewater*. *Frontiers in Bioenergy and Biofuels*, 13:257-284.