

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN



**DESARROLLO DE UNA BIOPELÍCULA ENRIQUECIDA CON ARQUEAS
METANOGÉNICAS METILAMINOTRÓFICAS TOLERANTES A AMONIACO PARA
EL TRATAMIENTO ANAERÓBICO DE VERTIDOS PROTEICOS**

**Tesis de Doctorado presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular**

POR

KATHERINE ELIZABETH SOSSA FERNANDEZ

2005

RESUMEN

Los residuos industriales líquidos (RILES) pesqueros se caracterizan por presentar elevada carga proteica y de sulfatos, condición que estimula particularmente la actividad de bacterias proteolíticas y Bacterias reductoras de sulfato (BRS) durante el proceso de digestión anaeróbica de estos vertidos. La actividad de estas bacterias disminuye la eficiencia de la depuración anaeróbica del vertido debido a que el producto metabólico de sus actividades, respectivamente: NH_3 y H_2S , son compuestos de reconocida actividad inhibitoria del proceso metanogénico.

Considerando que la eficiencia de la digestión de RILES es mayor, cuando se utilizan reactores colonizados con biopelículas bacterianas, y a objeto de controlar la génesis de H_2S se desarrolló una biopelícula sobre cerámica, enriquecida con arqueas metanogénicas que utilizan aminas metiladas (APMm), substratos que no pueden ser usados por las BRS.

Para mejorar la eficiencia de esta biopelícula experimental, en condiciones de tratamiento de vertidos proteicos, se requiere ahora mejorar su tolerancia a altas concentraciones de NH_3 , compuesto que también es producido por la conversión de metilamina a metano. Por este motivo, en esta tesis se hipotetiza, que para mejorar la producción de metano y la capacidad de degradación de vertidos con altos niveles de amoníaco, se debe estimular el asentamiento de APMm tolerantes a NH_3 en la biopelícula.

Para ello, en la primera etapa de este trabajo se estudió el efecto de la concentración de NH_3 en la cinética de crecimiento de APM en la biopelícula, estimada mediante el modelo Gompertz y la composición de la biopelícula mediante análisis de ARNr 16S. Se encontró que existe variación en los parámetros cinéticos de crecimiento en la biopelícula de las APMm y APM generales (que usan acetato y/o metilamina, referidas en adelante como APMg). A medida que aumenta la concentración de amoníaco, se observó una prolongación significativa de la duración de la fase lag de crecimiento

en ambos grupos ($\gamma=3$ días en el caso de APMg y 4 días para APMm) y se registró descensos significativos en la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) entre 100 y 248,8 mg NH₃-N/L manteniéndose constante a concentraciones menores y mayores.

Se encontró que todos los grupos microbianos fueron inhibidos a 150 mg NH₃-N/L, pero a otras concentraciones de amoníaco las *Methanococcaceae* y *Methanobacteriaceae* no fueron afectadas, en cambio *Methanosarcina* y *Methanosaeta* fue significativamente inhibida por el amoníaco.

En la segunda etapa, se estudió el efecto del NH₃ sobre la actividad metanogénica de una biopelícula enriquecida con APMm. Se observó que a medida que aumenta la concentración de amoníaco, disminuyó la actividad metanogénica desde $2,337 \pm 0,213$ g DQO metano / g SSV *día (a 48,8 mg NH₃-N/L) al valor más bajo equivalente a $0,639 \pm 0,162$ g DQO metano / g SSV *día, (a 848.8 mg NH₃-N/L), que correspondió al 27,34% de la actividad metanogénica a 48,8 mg NH₃-N/L. Además según el modelo de inhibición no competitivo se obtiene que el 50% de inhibición de la actividad metanogénica máxima ocurre a 365,29 mg NH₃- N/L.

Mediante enriquecimiento selectivo, en la tercera etapa se aisló y caracterizó molecularmente (ARNr 16S) una cepa de APMm tolerante a altas concentraciones de NH₃. Obteniendo una cepa de APMm tolerante a amoníaco perteneciente a la familia *Methanococcaceae* la crecer y produce metano (60% del biogás) a concentraciones iniciales de 848,8 mg NH₃-N/L.

Utilizando ensayos discontinuos y el modelo Gompertz, en la cuarta etapa se caracterizó la cinética de crecimiento de la biopelícula formada por la cepa APMm tolerantes a NH₃ aislada en cerámica. Se encontró que la duración de la fase lag fue de 3,69 días y la velocidad específica máxima de crecimiento fue de $0,67 \text{ d}^{-1}$.

En la quinta etapa se formó la biopelícula anaerobia enriquecidas con APMm NH₃ tolerantes, en un filtro anaerobio con anillos de cerámica como soporte. Se inoculó inicialmente con la cepa de

APMm tolerante a amoniaco (10^6 cel ml^{-1}) y después de 3 meses, se inoculó el resto de la comunidad anaerobia proveniente de un reactor control (enriquecido con APMm no tolerante a amoniaco).

La caracterización molecular, indicó que los organismos predominantes en ambas biopelículas (enriquecida y no enriquecida con APMm NH_3 tolerante) fueron arqueas de la familia *Methanococcaceae*. El crioseccionamiento, hibridación *in situ* y microscopia Confocal, indicó que en ambas biopelículas las arqueas se distribuyen hacia el interior de las prolongaciones de la biopelícula y que tienen espesores diferentes (100 μm en reactor control y 50 μm en reactor experimental).

En la sexta y última etapa se estudió el efecto del amoniaco en la producción de metano y consumo de carbono orgánico total (COT), para lo cual ambos reactores fueron sometidos a shock haciéndoles llegar concentraciones de amoniaco de 750 mg/L N- NH_3 , observándose que en el reactor control la producción de metano y el consumo de COT desciende a 70% y 36%, respectivamente, en cambio en el reactor de tratamiento estos parámetros se mantienen durante el periodo que fue sometido al Shock. Además, por análisis de ADNr 16S mediante DGGE, se reveló la presencia predominante de la cepa de APMm antes y después del shock de amoniaco, en el reactor de tratamiento.

Estos resultados se correlacionan con la hipótesis general de este trabajo, permitiendo concluir que utilizando biopelículas enriquecidas con metanogénicos metilaminotrofos tolerantes a amoniaco, se mejora significativamente la tolerancia a shock de amoniaco en la depuración de vertidos proteicos ricos en sulfato.