



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTAS Y BIOTECNOLOGÍA

“Caracterización de la comunidad microbiana y formación de biopelícula sobre membrana bioactiva compuesta para la producción y captura de H₂ a partir de aguas residuales”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniera en Biotecnología Molecular

JOSEFINA ISIDORA LEWIN PALMA

Director: Dra. Ana Lucía Prieto

Codirector: Dr. Nicolas Giuliani

Patrocinante: Dr. Nicolas Giuliani

Julio, 2023

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTAS Y BIOTECNOLOGÍA

Informe de Aprobación de Seminario de Título

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por

JOSEFINA ISIDORA LEWIN PALMA

“Caracterización de la comunidad microbiana y formación de biopelícula sobre membrana bioactiva compuesta para la producción y captura de H₂ a partir de aguas residuales”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título:

Dra. Ana Lucía Prieto

Co- director Seminario de Título:

Dr. Nicolás Guiliani

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente de la Comisión:

Dr. Marcelo Baeza

Evaluador/a:

Dra. María Elena Lienqueo

Santiago de Chile, Julio 2023

AGRADECIMIENTOS

Proyectos de financiamiento: FONDECYT 11191123 (Dra. Ana Lucía Prieto)

Laboratorio: Enormemente agradecida de mis tutores, Ana Lucía Prieto y Nicolás Guilliani, por acompañarme en este proceso, enseñarme cómo se trabaja en el laboratorio y perfeccionarme como profesional. Ambos laboratorios me entregaron muchísimos conocimientos que me servirán de aquí en adelante. Muchísimas gracias por todo.

Tengo que agradecer también a mis compañeros de ambos laboratorios, Javiera Lecourt y Diego San Martín, que me acompañaron, aconsejaron y ayudaron muchísimo durante este proceso. Gracias por todo el apoyo y entusiasmarme siempre a salir de las frustraciones y seguir avanzando. Y una mención especial a Viviana, Adriana y Mauricio, quienes me ayudaron y asistieron con la esterilización de mis viales, la toma de muestras en cromatógrafo y las fotos en el microscopio electrónico respectivamente, sin su ayuda, tiempo y apoyo no habría podido lograr los resultados que obtuve.

Familia: Gracias totales a mi familia por escucharme en los momentos complejos y darme todas las fuerzas y amor necesario para lograr todo lo que me propongo, gracias a mi mami y mis hermanitas Sofi, Gabri y Juli, a mis abuelos Nieves y Abraham, tí@s Consue y Gonza con mi primo Gero. También quiero agradecer a mi familia extendida, mis suegros Coca y Fernando, mis cuñadas Ñaki, Josita, Andrés y Panchi, a mi Coty y Jeannie por estar presente y acompañarme en todo este proceso.

A mis amigas de mi corazón, Tania, Colo, Lucas y Alonso, por escucharme siempre que lo necesité, a mi Paula, Carla y Gabi, por todo el apañe y la compañía durante estos largos 5 años. Y a mi Pipo, por el amor, la fuerza y el apoyo incondicional que me das todos los días, siempre buscando la forma de ayudarme y acompañarme en los momentos más difíciles, y celebrando todos los pequeños logros como si fueran tuyos. Agradecida de todo corazón.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1-INTRODUCCIÓN.....	3
1. Motivo.....	3
2. En un contexto de emergencia climática	4
3. Tratamiento de aguas residuales.....	5
4. Energía renovable y H ₂	6
5. Obtención de hidrógeno a partir de aguas residuales.....	6
6. Biorreactores y anaeróbicos	7
7. Membrana bioactiva compuesta	10
2-MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Diseño experimental y estandarización de métodos	13
1.1. Cultivos anaeróbicos	13
1.1.1 Reactores batch	13
1.1.2 Lavado de nitrógeno.....	13
1.1.3 Medio de cultivo	14
1.1.4 Muestra stock	14
1.1.5 Preinóculo	15
1.2. Estandarización de métodos	15
1.2.1 Conteo por cámara de Neubauer	15
1.2.2 Variaciones del cultivo.....	16
1.2.3 Mediciones de H ₂	16
1.2.4 Visualización de la comunidad microbiana	17
1.2.5 Set – up final	17
2 Obtención de curva y dinámicas de crecimiento de la comunidad microbiana anaeróbica. .19	
2.1 Cultivo microbiano.....	19
2.2 Toma de muestras	19
2.3 Conteo celular	19
2.4 Densidad óptica.....	20
2.5 Curva de calibración.....	20
2.6 Curva de crecimiento	20
2.6.1 Cinética de crecimiento	21
2.6.2 pH.....	22
2.6.3 Temperatura	22
2.6.4 Demanda de oxígeno.....	22

2.6.5 H ₂	22
3 Análisis de la formación de biopelícula sobre la membrana de PES	23
3.1 Curva de crecimiento	23
3.2 Diseño de membranas	23
3.2.1 Alcohol polivinílico.....	23
3.2.2 Dopamina clorhidrato.....	23
3.2.3 Membrana PES + PVA + PDA	24
3.3 “Set-Up”.....	24
3.4 Tinción DAPI.....	24
3.4.1 Solución “stock”.....	24
3.4.2 Solución de trabajo	25
3.4.3 Tinción de membranas	25
3.5 Análisis en microscopía de fluorescencia.....	25
3.6 Análisis en microscopía electrónica	25
4 Caracterización de la composición de la comunidad microbiana presente en el agua residual.....	25
4.1 Muestra biológica.....	25
4.2 Extracción DNA.....	26
4.3 Cuantificación DNA.....	26
4.4 Gel de agarosa	26
4.5 Partidores oligonucleotídicos	27
4.6 PCR	27
4.7 Electroforesis	28
3-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5 Obtención de curva y dinámicas de crecimiento de la comunidad microbiana presente en las CBMems.	29
5.1 Curva de calibración.....	29
5.2 Curva de crecimiento	30
5.3 Producción de Hidrógeno	32
5.4 Cambios de pH.....	35
6 Análisis de la formación de biopelícula sobre la membrana de PES	36
6.1 Formación de biopelícula sobre la membrana PES por DAPI	36
6.2 Formación de biopelícula sobre la membrana PES por SEM	38
7 Caracterización de la composición de la comunidad microbiana presente en el agua residual.....	39
7.1 Extracción y cuantificación de ADN a partir de la muestra microbiológica	39
7.2 PCR con partidores universales.....	41

5- CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA	47
MATERIAL COMPLEMENTARIO	51

RESUMEN

En los últimos años, el tratamiento y reúso de aguas residuales han surgido como una solución al grave problema de contaminación y escasez hídrica en Chile y el mundo, dado el contexto de emergencia y cambio climáticos que se vive hoy en día. Dentro de las tecnologías más prometedoras, se encuentra el desarrollo de biorreactores anaeróbicos para la producción de H₂. Este seminario de título busca caracterizar el desarrollo de la comunidad microbiana anaeróbica productora de H₂ proveniente de aguas residuales municipales y la formación de biopelícula sobre una membrana bioactiva compuesta (MBC), para determinar parámetros cinéticos del crecimiento y productividad del cultivo en prototipo de biorreactor.

Se estudiaron las dinámicas de crecimiento utilizando un sistema “batch” cerrado en condición anaeróbica para generar curva de crecimiento evaluando la concentración celular por cámara de Neubauer y densidad óptica con espectrofotómetro en función del tiempo, cuyos resultados permitieron estandarizar metodología y obtener una curva de 3 fases: Latencia (1-4h), exponencial (4-9 h) y estacionaria (9-11 h). También se obtiene curva de calibración que define la relación lineal entre concentración celular y densidad óptica asociada a este cultivo microbiano y algunos parámetros cinéticos al graficar el log de la concentración celular vs el tiempo, relación lineal definida por la ecuación $Y=0,7291 * X + 11.01$. A partir de esta relación, se obtiene tasa de crecimiento específica (μ) = 0,7291 h⁻¹, tiempo de generación (g) = 0,95 h, la velocidad de crecimiento (K) = 1,05 h⁻¹ y una cosecha máxima $M = 4,047 \times 10^7$ cel/mL. Además, se evaluó la producción de biogás por cromatografía de gases, logrando evidenciar un aumento progresivo de CO₂ y presencia de H₂ a las 98 h. Por último, se obtuvieron datos preliminares respecto la formación de biopelícula y adhesión de células sobre la MBC utilizando tinción DAPI, logrando evidenciar un aumento de adhesión en el transcurso de 12 días, por lo que se propone analizar en un periodo de tiempo más extenso para evidenciar formación de biopelícula.

ABSTRACT

In recent years, the treatment and reuse of wastewater have emerged as a solution to the serious problem of contamination and water scarcity in Chile and the world, given the context of climate emergency and climate change that is experienced nowadays. Among the most promising technologies is the development of anaerobic bioreactors for H₂ production. This title seminar seeks to characterize the development of the H₂-producing anaerobic microbial community from municipal wastewater and the formation of biofilm on a composite bioactive membrane (CBM), to determine kinetic parameters of growth and productivity of the culture in a bioreactor prototype. The growth dynamics were studied using a batch system in anaerobic condition to generate a growth curve evaluating cell concentration by Neubauer chamber and optical density with a spectrophotometer as a function of time, whose results allowed to standardize methodology and obtain a 3 phases' curve: Latency (1-4 h), exponential (4-9 h) and stationary (9-11 h). A calibration curve is also obtained, defining the linear relationship between cell concentration and optical density associated with this microbial culture and some kinetic parameters by plotting the log of cell concentration vs. time, with a linear relationship defined by the equation $Y=0.7291 * X+11.01$. From this relationship, specific growth rate (μ) = 0.7291 h⁻¹, generation time (g) = 0.95 h, growth rate (K) = 1, is obtained. 05 h⁻¹ and a maximum harvest $M = 4,047 \times 10^7$ cell/mL. In addition, biogas production was evaluated by gas chromatography, evidencing a progressive increase in CO₂ and the presence of H₂ at 98 hours. Finally, preliminary data were obtained regarding the formation of biofilm and cell adhesion on the MBC using DAPI staining, evidencing an increase in adhesion over the course of 12 days, for which analysis in a longer period of time is proposed to demonstrate formation of biofilm.

1-INTRODUCCIÓN

1. Motivo

El tratamiento y reúso de aguas residuales surge como solución al grave problema de contaminación y escasez hídrica en Chile (Ministerio de obras públicas, 2020). En la actualidad los esfuerzos se enfocan en desarrollar nuevos procesos que permitan la recuperación de subproductos y recursos provenientes de estos tratamientos, logrando avanzar de esta forma hacia un sistema económico más circular (Solon et al., 2019). Dentro de este contexto, se ha desarrollado un proceso alternativo para la recuperación de biohidrógeno a partir de aguas residuales, mediante una membrana bioactiva compuesta (MBC o CBMem por sus siglas en inglés) que en condiciones adecuadas permite alcanzar una producción y captura eficiente de H₂ (48,4 ± 9,4 mL/día y 71% respectivamente) gracias a la acción metabólica de una comunidad microbiana anaeróbica (Prieto et al., 2016). Si bien se ha reportado evidencias consistentes acerca de la producción de H₂ en MBC y las condiciones operacionales de éstas, conocimiento que ha permitido el desarrollo de un prototipo de biorreactor eficiente en términos de producción de H₂, poco se sabe acerca de las dinámicas de crecimiento y desarrollo de la comunidad microbiana anaeróbica en dicha membrana. Conocer las fases de crecimiento y su tiempo, así como también su capacidad de formar biopelículas sobre la membrana de polietersulfona (PES), es imprescindible para diseñar un biorreactor que pueda mantenerse productivo en el tiempo.

En este marco expuesto, se desarrolla el presente seminario de título “Caracterizar el desarrollo de la comunidad microbiana en una MBC involucrada en la producción de H₂ a partir de aguas residuales”.

2. En un contexto de emergencia climática

En la actualidad, nuestro planeta enfrenta una emergencia climática producto de la actividad y el desarrollo humano, generando un calentamiento global que impacta tanto a nuestra especie como al resto de fauna, flora y otras formas de vida que habitan este planeta.

Uno de los factores más contribuyentes a este cambio climático es la extracción y uso de combustibles fósiles como fuente de energía, ya que la quema de estos genera gran parte de los gases de efecto invernadero como por ejemplo el dióxido de carbono, CO₂ (Kang y col., 2020).

Se ha registrado un aumento de 1°C de la temperatura del planeta desde la época pre-industrial hasta la fecha, evidenciando en el tiempo una fuerte correlación entre el aumento de emisión de gases de efecto invernadero y este aumento de temperaturas (Macedo, 2023).

El gran aumento de la población humana en los últimos años ha incrementado la demanda de recursos, por lo que urge el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan obtener energías renovables y que además sean lo suficientemente eficientes como para sustituir los combustibles fósiles y soportar el aumento de demanda asociado al crecimiento económico y poblacional sin generar una sobreexplotación de los recursos (Bilgen, 2014). Actualmente, dos tercios de la población mundial sufren de escasez hídrica al menos durante un mes al año (Onu-Agua, 2017) y en Chile las precipitaciones han disminuido un 30% desde el año 2010, lo cual ha derivado en un déficit hídrico que impacta principalmente a la macrozona central, dado que se concentra el 88% de la ocupación (Del Congreso Nacional, s. f.) e («Informe Hidrometeorológico Semanal 20 Marzo 2023», 2023).

Los efectos del aumento de temperaturas impactan directamente a los ecosistemas y por ende al desarrollo de todas comunidades, ya que las condiciones se vuelven cada vez más extremas, aumentan olas de calor, disminuye la disponibilidad de agua dulce y se hacen cada vez más frecuentes fenómenos naturales catastróficos (Macedo, 2023b).

3. Tratamiento de aguas residuales

La escasez hídrica es un problema que se encuentra fuertemente vinculado con el cambio climático, ya que los recursos hídricos se reducen cada día más producto al desbalance del ciclo hídrico, generando un aumento de inundaciones y sequías, dependiendo de la zona geográfica y la época del año, lo cual repercute en la disponibilidad de agua dulce y por ende en el desarrollo y seguridad de las comunidades (Onu-Agua, 2017).

Dentro de la emergencia climática y la escasez hídrica, el tratamiento de aguas residuales surge como una necesidad y el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan optimizar este proceso podría traer un gran número de beneficios y soluciones que permitan el desarrollo de comunidades más resilientes.

A nivel mundial, se estima que el 80% de las aguas residuales no son tratadas y se liberan al medio ambiente sin un tratamiento previo (Onu-Agua, 2017). Esta acción, tiene un gran impacto a nivel de los ecosistemas que se desarrollan en estos espacios, ya que se trata de aguas altamente contaminadas que perjudican la salud de las comunidades.

Por otro lado, el aumento de la población y la sequía ha generado un aumento considerable en la demanda de aguas dulces, por lo que la reutilización de aguas residuales cada vez a tomado más importancia (Donoso y Rivera, 2020).

En Chile, a pesar de ser un país ejemplar ya que tiene una gran cobertura de saneamiento, tiene un sistema poco eficiente, ya que el 96% de estas aguas son descargadas en cuerpos de agua superficiales, en donde un 22% de estos son descargadas por emisarios submarinos y solamente un 4% es realmente reutilizado (Donoso y Rivera, 2020).

En términos generales, el agua residual se encuentra compuesta en un 99% por agua y un 1% por sólido disueltos, suspendidos o coloidales (Onu-Agua, 2017). Estos sólidos, tienen un gran potencial de reutilización, ya que es un recurso que puede utilizarse tanto como fuente de energía como de nutrientes (nitrógeno y fósforo, por ejemplo).

El desarrollo de nuevas tecnologías enfocadas en la reutilización de estos desechos permitiría avanzar hacia un proceso más optimizado, eficiente y circular, que permita disminuir la contaminación ambiental asociada al proceso actual y mejorar la calidad del agua residual obtenida al final del proceso, para posterior reúso (Onu-Agua, 2017).

4. Energía renovable y H₂

En el último tiempo, se han desarrollado diferentes tecnologías enfocadas en la obtención de energía a partir de recursos renovables que permitan sustituir los combustibles fósiles, dentro de las cuales se encuentra la energía eólica, energía solar, gas natural, geotérmica, a partir de biomasa, aprovechamiento energético de residuos (WTE por sus siglas en inglés) y energía a partir de H₂, destacándose las últimas dos como las más emergentes y prometedoras (Kang et al., 2020).

El hidrógeno se destaca como fuente de energía ya que su combustión sólo genera como producto agua y calor. Existen métodos diversos de producción de hidrógeno, en donde los más utilizados, principalmente por el tiempo que estos llevan estandarizados y optimizados, todavía dependen del uso de combustibles fósiles en el proceso, como la gasificación del carbón.

Actualmente, existe un gran número de investigaciones enfocadas en el desarrollo de una producción de hidrógeno sustentable, en donde se ha destacado el uso de recursos renovables como residuos orgánicos, separación fotoelectroquímica del agua, actividad de microorganismos anaeróbicos o algas (Amin y col., 2022).

5. Obtención de hidrógeno a partir de aguas residuales

Las aguas residuales contienen una gran cantidad de energía almacenada, que de existir una tecnología lo suficiente eficiente para extraerla, podría abastecer los requerimientos energéticos a nivel mundial (Mohan y col., 2013).

Existen procesos biológicos asociados al metabolismo de microorganismos o algas, procesos fermentativos principalmente, que han sido estudiados ya que generan como subproducto biohidrógeno de manera natural y que pueden utilizar los compuestos orgánicos presentes en las

aguas residuales como fuente de energía (Saravanan et al., 2021).

El desarrollo de una tecnología que permita generar hidrógeno en gran escala a partir de aguas residuales por la acción de microorganismos permitiría contar con un sistema totalmente circular, que aporte de manera simultánea a la obtención de una fuente de energía renovable y a la reutilización de aguas residuales.

6. Biorreactores y anaeróbicos

Dentro de este marco, se han desarrollado biorreactores a pequeña escala que utilizan diferentes microorganismos o algas para producir bio-hidrógeno.

La obtención de biohidrógeno a partir de aguas residuales se puede clasificar según el tipo de fermentación que permite su obtención, dividiéndose principalmente en fermentación foto-dependiente (fotosíntesis) y fermentación oscura (Mohan y col., 2013).

La fermentación foto-dependiente es un bioproceso asociado al metabolismo de algunas bacterias fotosintéticas y microalgas que transforman ácidos orgánicos variados en H_2 utilizando la energía lumínica, que dependiendo del microorganismo presente puede darse en una condición aeróbica o anaeróbica (Mohan y col., 2013).

Por otro lado, la fermentación oscura es un bioproceso asociado al metabolismo de un grupo de bacterias anaeróbicas, estrictas o facultativas, las cuales generan H_2 a partir de carbohidratos (como la glucosa) mediante el proceso de acidificación principalmente, obteniendo como producto una serie de ácidos orgánicos volátiles y CO_2 (Mohan, 2009). En este contexto, se han estudiado diferentes especies y comunidades anaeróbicas con el propósito de obtener el mejor rendimiento en términos de productividad de hidrógeno, como por ejemplo la inhibición de metanógenos comúnmente presentes en los cultivos mediante calor y condiciones del medio, para evitar el consumo de biohidrógeno producido por los microorganismos acidófilos (Kapdan & Kargi, 2006).

Los microorganismos destacados por excelencia en términos de productividad y mantenimiento son del género *Clostridium*, bacterias que pueden ser obtenidas con facilidad desde lodos activos,

de *S. vineae* y *C. butyricum* genera un incremento en la producción de bio-hidrógeno (Park y col., 2021). Las condiciones del medio como lo son el pH, la temperatura, el sustrato y la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo también son factores que impactan de manera directa en la producción de bio-hidrógeno (Mohan, 2009).

La curva de crecimiento de un microorganismo, si se cuenta con una fuente de sustrato limitada, se constituye de cuatro fases (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007):

- 1) Fase adaptativa o lag, en donde los microorganismos se adaptan al medio en el cual fueron inoculados. El tiempo que estos microorganismos tardan en aclimatarse depende directamente de lo óptimas que sean las condiciones del medio para estos.
- 2) Fase exponencial, en donde los microorganismos comienzan a alimentarse del sustrato disponible y alcanzan su tasa de crecimiento máxima ya que se encuentran en un medio con alta cantidad de sustrato.
- 3) Fase estacionaria, en donde el sustrato cada vez comienza a ser más escaso, y comienza un aumento de muertes de células que iguala la cantidad de nuevas células generadas.
- 4) Fase de muerte celular, en donde las células comienzan a morir paulatinamente por la falta de disponibilidad de sustrato.

Los tiempos asociados a esta curva varían dependiendo del microorganismo y las condiciones, por lo que es importante entender estas dinámicas de crecimiento al momento de diseñar tecnologías que incorporen el uso de microorganismos en sus bioprocesos.

Para la implementación de microorganismos en procesos industriales se han desarrollado diferentes biorreactores, los cuales permiten mantener condiciones controladas y óptimas para el crecimiento del cultivo y la producción del producto de interés.

Dependiendo del objetivo del proyecto, se pueden encontrar 3 tipos de procesos “Batch”:

- 1) “Batch” cerrados, en se mantiene un volumen interno determinado y no existe un contacto con las condiciones externas.

- 2) “Batch” semi-continuos, en donde se mantienen todas las condiciones internas, pero se va suministrando sustrato adicional en el tiempo.
- 3) “Batch” de flujo continuo, en donde existe un flujo de entrada y otro de salida que se mantiene constante.

7. Membrana bioactiva compuesta

Dentro de estas categorías, existen diversas variaciones que se han prototipado para la producción de biohidrógeno, en donde se destaca la utilización de membranas biológicas tanto para aumentar la productividad del biorreactor (Song y col., 2022) como para aumentar la filtración del agua residual y mejorar su calidad (Vera et al., 2014).

Dentro de este contexto, se ha desarrollado un proceso alternativo para la recuperación de biohidrógeno a partir de aguas residuales, mediante una MBA que en condiciones adecuadas permite alcanzar una producción y captura eficiente de H₂ (48,4 ± 9,4 mL/día y 71% respectivamente) gracias a la acción metabólica de una comunidad microbiana anaeróbica (Prieto y col., 2016).

Esta membrana bioactiva compuesta, a diferencia de otras membranas, se encuentra compuesta por una membrana PES con microfibras huecas que se encuentran cubiertas por dos capas de polímeros, generando una inter-capa en donde se adhiere y desarrolla la comunidad microbiana anaeróbica proveniente de aguas residuales municipales. Este sistema permite capturar de manera eficiente el bio-hidrógeno generado en el espacio inter-membrana a medida que se va generando, impidiendo que sea consumido por posibles metanógenos presentes.

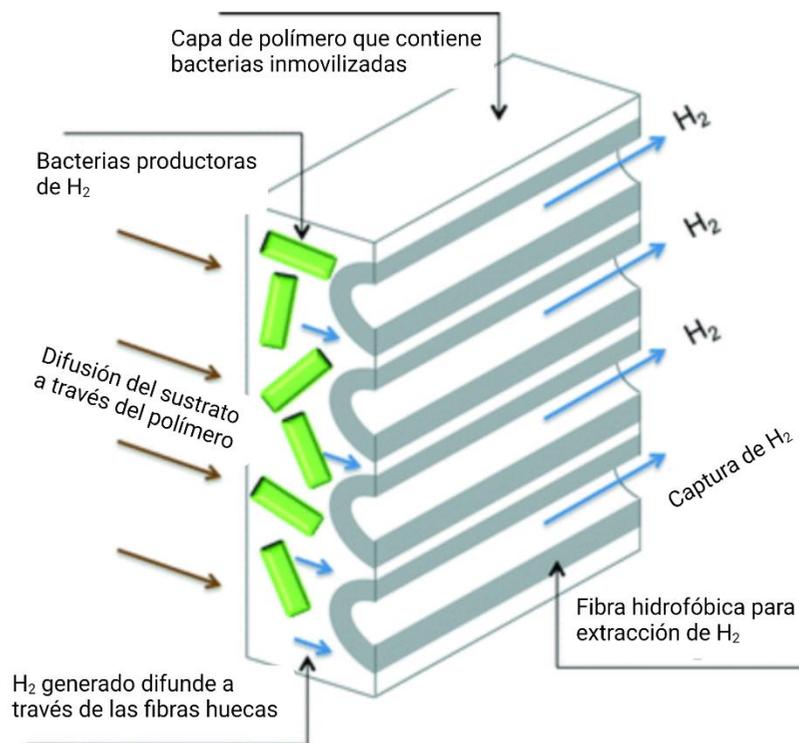


Figura 2. Esquema conceptual del prototipo de membrana bioactiva compuesta (Prieto y col., 2016).

Si bien se ha reportado evidencia consistente acerca de la producción de H₂ en MBC y las condiciones operacionales de ésta, poco se sabe acerca de las dinámicas de crecimiento y desarrollo de la comunidad microbiana anaeróbica en la membrana. Se requiere del desarrollo de una metodología que de luces acerca de las dinámicas de crecimiento del cultivo y la curva que la define para poder evaluar su productividad en el tiempo.

Paralelamente, caracterizar su composición microbiana específica permitiría incrementar su potencial productor, estudios que en otras instancias se han llevado a cabo mediante técnicas de biología molecular como la reconocida secuenciación del gen 16S ribosomal (Chen et al., 2019).

Por otro lado, conocer el desarrollo de la comunidad microbiana y su interacción sobre la membrana es crucial para poder evaluar la viabilidad el prototipo a gran escala.

El objetivo general de este seminario de título es caracterizar el desarrollo de la comunidad microbiana en una CBMems (MBC por sus siglas en español) para la producción de H₂ a partir de aguas residuales, mediante los siguientes objetivos específicos (OE): OE1) Determinación de curva y dinámicas de crecimiento de la comunidad microbiana, OE2) Análisis de la formación de biopelícula sobre la membrana de PES y OE3) Caracterización de la composición de la comunidad microbiana presente en el agua residual.

2-MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental y estandarización de métodos

1.1. Cultivos anaeróbicos

Para todos los experimentos, el cultivo microbiano se mantiene y desarrolla en un sistema de “batch” cerrado, es decir, con una cantidad de sustrato limitada y en donde no existe una interacción líquido-gas con el exterior. Para esto se utilizan viales sellados, de diferentes tamaños, que contienen una cantidad de medio de cultivo inicial que no es modificada en el tiempo.

1.1.1 Reactores batch

Se prepararon viales de diferentes capacidades con agua residual sintética (RIL) en condición anaeróbica. Los viales de 100 mL se mantuvieron con 82 mL de RIL, los de 50 mL con 42 mL y uno de 250 mL con 152 mL. Todos los viales fueron sellados con tapón de goma y sellos de aluminio, lavados en nitrógeno y autoclavados a 121°C durante 15 min, para obtener una condición de esterilidad.

1.1.2 Lavado de nitrógeno

Para mantener una condición anaeróbica en el interior de los viales, una vez sellados, se insertaron dos puntas de jeringa conectadas a válvulas de 3 pasos. Una de las puntas de jeringa se conecta con una manguera a un tanque de gas nitrógeno y manteniendo ambas válvulas abiertas se abre flujo de gas hacia el interior del vial. Dependiendo del tamaño del vial, el tiempo del lavado varía entre 45 s (vial de 100 mL) y 20 s (vial de 50 mL). Para terminar el lavado, se cierra el tanque junto con las válvulas y se extraen las jeringas del interior.

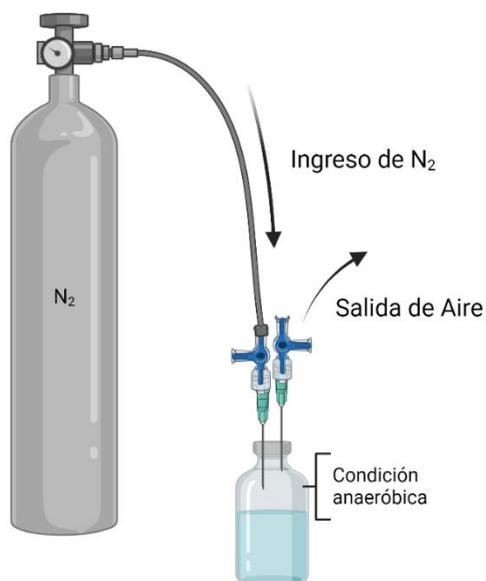


Figura 3. Diagrama que esquematiza proceso de lavado de nitrógeno en viales para condición anaeróbica.

1.1.3 Medio de cultivo

Para el cultivo de los microorganismos se utiliza un agua residual sintética (RIL), utilizando preparación previamente estandarizada por Klatt y LaPara (2003) y ajustada para obtener una demanda química de oxígeno (DQO) de 6.000 g/L, en donde todos los componentes fueron disueltos en 1L de agua destilada: 2,75 g de gelatina, 1,28 g de almidón, 0,67 mL de Polisorbato 80, 0,06 g de levadura, 0,06 g de casaminoácidos, 0,15 g de cloruro de amonio, 0,18 g bicarbonato de sodio, 0,03 g fosfato de sodio, 0,03 g fosfato de potasio, 0,09 g de cloruro de magnesio, 0,06 g de cloruro de calcio y 0,1 ml de solución de minerales traza SL7. Para homogenizar la muestra, se diluyen los reactivos sobre un agitador con calefactor.

1.1.4 Muestra “stock”

El cultivo bacteriano fue obtenido a partir de una muestra de lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal. Esta muestra fue diluida 1:10 en agua destilada y tratada a 95°C por 40 min para obtener la comunidad microbiana de interés. El lodo tratado se incubó en

agua residual sintética a 36°C durante 24 h alcanzando un crecimiento exponencial de los microorganismos.

1.1.5 Preinóculo

Para inocular los cultivos se preparó un pre-inóculo, el cual fue inoculado con una jeringa un vial con 40 mL de RIL con 2 mL de cultivo bacteriano y se deja incubando durante 18 h a una temperatura de 36°C. Antes de inocular los viales experimentales, se extrajo una muestra del pre-inóculo para conteo celular, obteniendo la concentración celular a la que se encuentra este, lo cual permite calcular la concentración inicial de los viales experimentales y la cantidad a administrar.

1.2. Estandarización de métodos

Para todos los experimentos, el cultivo microbiano se mantiene y desarrolla en un sistema de “batch” cerrado, es decir, con una cantidad de sustrato limitada y en donde no existe una interacción líquido-gas con el exterior. Para esto se utilizan viales sellados, de diferentes tamaños, que contienen una cantidad de medio que no es modificada en el tiempo.

Para abordar los objetivos planteados y llevar a cabo el procedimiento experimental, se tuvo que hacer una serie de pruebas que permitieron la estandarización del método de cultivo, toma y análisis de las muestras.

1.2.1 Conteo por cámara de Neubauer

Para familiarizarse con la técnica de conteo, se diseñaron mediciones con muestras diluidas 1:5, 1:10, 1:100. Se utilizó un aumento de 400X para analizar cada muestra y contar el número de células presentes en cada cuadrante de 4. Luego, se promedió el resultado de 25 cuadrantes y se multiplica por un factor de conversión para obtener la concentración celular en células/mL. Se consideran células contables aquellas en foco y dentro de las grillas perimetrales del cuadrado 5x5. Por último, se analiza relación entre el factor de dilución y la concentración celular, con el objetivo de estandarizar la metodología y el correcto manejo de esta técnica de conteo.

1.2.2 Variaciones del cultivo

Se identificaron como variables controladas: 1) la concentración del sustrato, 2) la temperatura de incubación, 3) la anaerobiosis interna del vial, 4) la relación líquido/gas del vial y 5) Concentración inicial y volumen del inóculo. Para controlar la concentración del sustrato se prepara RIL sobre un agitador con calefactor asociado, asegurándose de que todos los componentes se disuelvan por completo y por ende de obtener una mezcla homogénea antes de distribuir el contenido en cada botellín individualmente. Todos los viales fueron incubados dentro de una incubadora mantenida a una temperatura constante de 36°C, logrando controlar esta segunda variable. La relación líquido/gas se mantiene constante trabajando con viales de una misma capacidad e igualando la cantidad de RIL contenida en cada uno de estos (en este caso, se mantuvo una relación 4/5). Para mantener condición anaeróbica interna de los viales, posterior a la incorporación del volumen apropiado de RIL, estos son sellados con tapón de goma afirmado con seguro y aluminio, para luego lavar internamente con gas nitrógeno, durante un tiempo y flujo apropiado pensado de acuerdo al volumen de la fase gaseosa en el interior del vial. Con respecto a la concentración inicial del inóculo, se cultiva pre-inóculo en un vial tratado de la misma manera que el resto entre 18-24 h antes del inicio del experimento, a partir de cual se extraer una misma cantidad para inocular cada uno de los viales a un mismo tiempo inicial (con una diferencia mínima). Adicionalmente, se extrae una muestra del pre - inóculo para obtener concentración del vial al tiempo de inocular, lo cual permite calcular la concentración inicial experimental de los viales.

1.2.3 Mediciones de H₂

Para evaluar la relación existente entre las dinámicas de crecimiento, sus diferentes fases y la productividad de la comunidad microbiana, se plantea medir el hidrógeno generado en los diferentes tiempos de la curva de crecimiento, mediante cromatografía de gas. El hidrógeno, al ser un gas “pequeño” altamente volátil, se complejiza su extracción y cuantificación. Por esto, debe evitarse la presencia de aire, humedad en la muestra y una situación presionada (presión de gas

alta). Para la extracción de muestras se probaron diferentes métodos: 1) Extraer 10 mL de muestra de un vial experimental para inyectarlo dentro de un sistema desecador con sílica-gel al cual previamente se le extrae el aire con bomba y luego extraer la muestra para inyectar en un vial de 10 mL sellado que permite guardar la muestra hasta que se pueda analizar en el cromatógrafo; 2) extracción de 10 mL e inyección directa a un vial de 10 mL que contiene sílica-gel previamente lavado con gas nitrógeno; 3) Extracción de 10 mL de muestra e inyección directa en vial de 10 mL que contiene sílica-gel al vacío (extracción de aire con bomba); 4) Extracción de 5 mL e inyección directa en cromatógrafo y 5) Extracción de 1 mL e inyección directa en cromatógrafo.

1.2.4 Visualización de la comunidad microbiana

Para visualizar la formación de biopelícula sobre la membrana se plantea el uso de 4',6-diamidino-2-fenilindol o DAPI, con el objetivo de teñir las células en la superficie y visualizarlas posteriormente bajo un microscopio de fluorescencia. Además, se llevan a cabo prueba de análisis de la membrana utilizando microscopía electrónica (SEM).

1.2.5 “Set-up” final

Se utilizan nueve viales de 100 mL, nueve viales de 50 mL y un vial de 250 mL, los cuales fueron rellenos con RIL en las cantidades de 82 mL, 42 mL y 152 mL, respectivamente. Luego, estos fueron sellados y lavados en nitrógeno como se describe previamente, para luego enviar todo el material a autoclavar durante 15 min a 121 °C. Antes de inocular los viales, se extrajo 1 mL de cada vial de 100 y 250 mL con una jeringa de 10 mL, el cual se guarda en un tubo eppendorf de 1,5 mL estéril para usarlo posteriormente como blanco en el espectrofotómetro. Además, se extrajeron los mL necesarios de cada vial considerando la cantidad de inóculo a administrar, para que queden con un volumen total de 80, 40 y 150 mL respectivamente. Estos mL extraídos fueron utilizados posteriormente para análisis de DQO. Luego, se inocularon los viales de 100 y 250 mL con 1 y 1,5 mL de cultivo proveniente de un pre-inóculo, se agitaron para una distribución homogénea y luego se extrajeron 1 mL para hacer un conteo celular en cámara de Neubauer y

determinar una concentración inicial del cultivo. En el caso de los viales de 50 mL, se inocularon cada uno con 0,2 mL de cultivo proveniente de un pre-inóculo. Todo el trabajo se llevó a cabo bajo campana de flujo laminar y con mechero, para mantener la esterilidad durante todo el procedimiento. Además, todos los viales fueron inoculados a un mismo T0 (con un error de 2 min de diferencia).

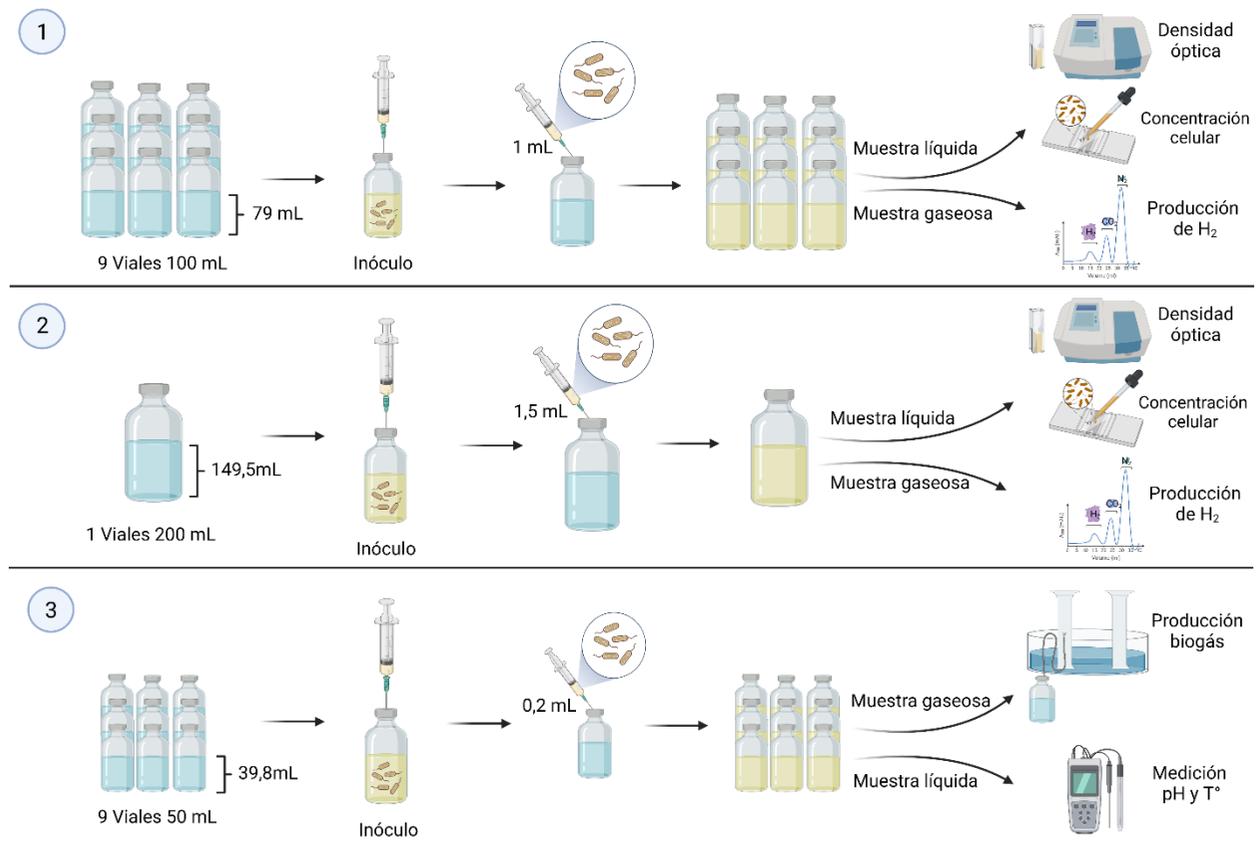


Figura 4. “Set-up” final para toma de muestras en sistema de cultivo anaeróbico.

2 Obtención de curva y dinámicas de crecimiento de la comunidad microbiana anaeróbica.

2.1 Cultivo microbiano

Se utilizó un cultivo de bacterias proveniente del “stock” de muestra microbiana extraído de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal, previamente mencionado.

2.2 Toma de muestras

Para la primera curva de crecimiento con sistema de replicados, se utilizan nueve viales diferentes, uno para cada tiempo en la curva, a partir de los cuales se extrajeron una muestra de gas y otra líquida. Primero se extrajeron la muestra gaseosa, utilizando jeringa de precisión (de cromatografía) de 5 mL para muestra de gas, en donde se extrajeron 10 mL e inyectaron en vial de 10 mL previamente sellado y lavado con nitrógeno para analizar en cromatografía de gas. Luego, se extrae 1 mL de muestra líquida de cada uno con una jeringa de 10 mL, el cual se depositó en una cubeta para espectrofotómetro de 10 mm para análisis de D.O, y luego con una jeringa estéril se extrajeron 1 – 0,5 mL en un tubo eppendorf de 1,5 mL, para contar en la cámara de Neubauer.

Para la segunda curva, se utilizó un solo vial de 250 mL a partir del cual se extrajeron 9 muestras en diferentes tiempos. Al igual que en el primer caso, se extrajeron una muestra de gas y luego una muestra líquida.

Paralelamente, se utilizaron serie de 9 viales de 50 mL, a partir de los cuales se obtienen muestras de gas, pH y temperatura a los diferentes tiempos de la primera curva (a los mismos tiempos determinados), uno por uno. Primero, cada vial se conectó a un sistema de probetas para medir cantidad de biogás generado, de acuerdo con el desplazamiento de volumen en el interior de la probeta al abrir la válvula de 3 pasos. Luego, para obtener muestra líquida se abre vial y traspasa el contenido a un vaso para medir pH y temperatura.

2.3 Conteo celular

Se obtuvo una concentración celular para cada muestra líquida tomada con una cámara de

Neubauer, contando en el aumento 400X los cuadrantes de $0,004 \text{ mm}^3$ (4 nL). Se promedió el número de células obtenido en cada cuadrante (la suma de las células contadas en los 25 cuadrantes dividido en 25) y se multiplicó por el volumen asociado al cuadrante (4 nL) y el factor de conversión asociado (10^6), para la obtención de la concentración final del vial. En el caso de que la muestra se encontrara altamente concentrada y no se pudiese contar las células con precisión, esta fue diluida y luego en los cálculos se multiplicó adicionalmente por el factor de dilución.

2.4 Densidad óptica

Para el análisis de densidad óptica (D.O) se requiere de una muestra blanco para calibrar el espectrofotómetro. Para esto se extrajo 1 mL de RIL estéril y se vertió en una cubeta de 10 mm para espectrofotometría. Este trabajo se llevó a cabo bajo mechero para mantener una condición de esterilidad y se sella con Parafilm la superficie de la cubeta para que esta pueda ser utilizada en el espectrofotómetro sin contaminarse. Luego de calibrar el equipo con la muestra blanco, se extrajeron 3 mL de muestras biológicas de interés a diferentes concentraciones celulares y se depositaron en cubetas de 10 mm con mayor capacidad, para medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

2.5 Curva de calibración

Para obtener la relación lineal entre la D.O. y la concentración celular, se graficaron resultados obtenidos de las curvas de crecimiento planteadas en el punto 3.6, considerando los valores para los 8 primeros tiempos de la curva. Cabe destacar que se ajustan valores al punto cero y se calcula línea de tendencia para obtener parámetros de interés.

2.6 Curva de crecimiento

De acuerdo con el diseño experimental previo, se plantearon dos curvas de crecimiento diferentes:

1) Se formó la curva a partir de nueve viales diferentes, que son inoculados a un mismo T0 (10:00), y a partir de los cuales se van tomando muestras de D.O. y conteo celular a 9 tiempos diferentes (15:00, 16:30, 17:10, 17:45, 18:30, 19:00, 19:45, 20:30 y 12:00 del día siguiente), analizando un

vial por cada tiempo de la curva. 2) Se determinó una curva de crecimiento a partir de un único vial de 250 mL con 150 mL de RIL, en donde se inoculó a un T0 (10:00 hras) y a partir del cual se fueron extrayendo muestras de D.O y conteo celular a nuevos tiempos diferentes (15:00, 16:30, 17:10, 17:45, 18:30, 19:00, 19:45, 20:30 y 12:00 hras del día siguiente), obteniendo muestras que provinieron de un único vial. Luego, con los datos obtenidos se analizó la curva con gráficos de concentración celular vs tiempo y D.O vs tiempo.

2.6.1 Cinética de crecimiento

A partir de los datos de concentración celular se identifican los valores asociados a la fase exponencial para obtener un gráfico de crecimiento lineal a partir del logaritmo de la concentración celular (biomasa) vs tiempo.

Luego, se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) utilizando la siguiente fórmula:

$$\ln N_t - \ln N_0 = \mu * (t - t_0) \quad (1)$$

En donde N_t es la concentración final, N_0 es la concentración inicial y $(t - t_0)$ es el diferencial del tiempo (duración total de la fase exponencial). Este valor también representa la pendiente en la ecuación de la recta del gráfico Ln cell/mL vs Tiempo.

A partir de la tasa de crecimiento específica se calculó el tiempo de generación (g) utilizando la siguiente fórmula:

$$g = \frac{0,693}{\mu} \quad (2)$$

En donde μ es la tasa de crecimiento específica.

Por último, se obtuvo la velocidad de crecimiento (K), a partir de la siguiente fórmula:

$$K = \frac{1}{g} \quad (3)$$

En donde g es el tiempo de generación.

2.6.2 pH

Se utilizó un medidor de pH con termómetro acoplado para medir pH inicial y final de los viales inoculados. Primero, se calibra el equipo utilizando “buffer” a pH 7,4 (ácido) y pH 4 (básico). Una vez calibrado el equipo, se vierte contenido del vial en un vaso de precipitados de 40 mL en el cual se introduce el electrodo con termómetro, se espera unos minutos para que se estabilizara y anota el pH que marca.

2.6.3 Temperatura

Se utilizó termómetro para medir temperatura inicial y final de viales inoculados. Para esto, se vierte contenido del vial en un vaso de precipitados de 40 mL en el cual se introduce el electrodo con termómetro se espera unos minutos para que se estabilice y anota la temperatura que marca.

2.6.4 Demanda química de oxígeno (DQO)

Se extrajeron 2 mL de cada vial de 50 mL, previo a inocular, para medir su DQO inicial individualmente. Cada muestra fue diluida 1:5 con 8 mL de agua destilada.

2.6.5 H₂

Para medir H₂ presente en los viales de 100 mL, utilizados para la primera curva de crecimiento, se extrajeron 10 mL con una jeringa de 5 mL de precisión para gases, e inyectaron en vial de 10 mL anaeróbico sellado, para llevar muestra a cromatógrafo, en donde se inyectan 5 mL de muestra en la columna del cromatógrafo (marca PerkinElmer, modelo Claus 500) para obtener la composición de los gases presentes en esta.

Paralelamente, se diseñó un sistema de probetas, en donde se dispusieron dos probetas invertidas llenas hasta la mitad de agua sobre un recipiente que también contenía cierto nivel de agua (se registra mL de aire iniciales dentro de ambas probetas). En una de las probetas, se introduce manguera delgada que hacia el exterior se encuentra conectada a una llave de 3 pasos con punta de jeringa asociada. Para tomar la muestra, se inyecta la punta en vial de 50 mL con llave de paso cerrada, luego esta se abre para que entre el biogás generado en la probeta, modificando el volumen

de gas interno de este, por diferencia de presión. Se registra volumen interno para cada uno de los 9 viales, a diferentes tiempos de crecimiento microbiano, para obtener finalmente volumen de biogás generados.

3 Análisis de la formación de biopelícula sobre la membrana de PES

3.1 Curva de crecimiento

Se utilizó cultivo de bacterias descendiente (proveniente) del stock de muestra microbiana extraído de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal, previamente mencionado.

3.2 Diseño de membranas

Las membranas utilizadas para la tinción DAPI son de dos tipos: 1) Membrana PES y 2) Membrana PES + capa de los siguientes polímeros: alcohol de polivinilo (PVA) y dopamina clorhidrato (PDA). Todo el trabajo con la membrana y su preparación con los polímeros se llevó a cabo con materiales estériles, mesón limpio y bajo campana con mechero, para mantener condición de esterilizada.

3.2.1 Alcohol de polivinilo

Se preparó una solución al 8,3% p/v, diluyendo 16,6 g de alcohol de polivinilo (PVA) en 200 mL de agua destilada estéril en un frasco sobre un agitador con calefactor asociado a una temperatura que varía entre 60 – 80°C durante 90 min. Luego, se selló con Parafilm hasta ser utilizado.

3.2.2 Dopamina clorhidrato

Primero se preparó medio Tris base al 10 mM, mezclando 1 L de agua destilada (previamente autoclavada) con 1,211 g de Tris base. Luego, se ajusta el pH a 8,55 agregando 6,46 mL de solución HCl al 0,1 N. Una vez listo el medio, se agregaron 2 g de dopamina clorhidrato (PDA) para obtener solución de trabajo. Cabe destacar que todo el procedimiento fue llevado a cabo en un frasco de 1 L sobre un agitador para obtener una solución homogénea.

3.2.3 Membrana PES + PVA + PDA

Se trabajó con pedazos de membrana de 1 cm² cortados previamente y sumergidos en alcohol al 70% para desinfección y aumentar la esterilidad. Se vierte el PDA en un “bowl” para luego sumergir las membranas en la solución durante 5-10 min. Pasado el tiempo, se extraen las membranas y dejan secar durante 20 min, colgando de un soporte para evitar el contacto con otra superficie el máximo posible. Una vez seco el PDA, se adhiere con pincel la solución de PBA para luego dejar secar, primero por un lado y luego por el otro.

3.3 “Set-up”

Para estudiar la formación de biopelícula sobre la membrana y cómo varía esta en el tiempo, se prepararon siete viales anaeróbicos (tal y como se describe en la sección 3.2 de la metodología): un vial de 250 mL con 150 mL de RIL sin inocular, al cual se le incorporaron tres membranas PES y tres membranas con polímeros, y los viales de 50 mL con 39 mL de RIL, donde a tres de estos se les agregaron triplicados de membrana PES (3 pedazos de membrana de 1 cm² en cada vial) y a tres se les agregaron triplicados de membranas con el tratamiento de polímeros. Estos seis viales fueron inoculados con 1 mL de cultivo microbiano de interés a un mismo T₀ y se analizaron a diferentes tiempos del desarrollo de la comunidad microbiana. Para esto se trabajó bajo campana y con mechero, se abrió el vial y extrajeron las membranas para ser depositadas cada una en una placa de cultivo diferente. Primero, al día 4 se analizó grupo control (vial de 200 mL sin inocular) y 2 viales de 50 mL (cada uno con un tipo de membrana). Este procedimiento se repite al día 8 con otros dos viales de 50 mL y al día 12 con los últimos dos viales de 50 mL.

3.4 Tinción DAPI

3.4.1 Solución “stock”

Se prepara solución stock mezclando 10 mg de DAPI en 2 mL de agua purificada en Mili-Q, para obtener una concentración de 5 mg/mL. Esta solución se distribuye en 5 tubos eppendorf de 1,5 mL con 0,4 mL de solución. Cuatro tubos Eppendorf se mantienen en refrigeración a -22°C.

3.4.2 Solución de trabajo

Se preparó una solución de trabajo con una concentración de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, diluyendo 1 μL de solución “stock” en 4,999 mL de solución PBS estéril, pensando en una preparación para dos membranas.

3.4.3 Tinción de membranas

Se extrajeron membranas del vial y depositaron de forma individual en microplacas de cultivo (12 pocillos), para luego enjuagar dos veces con PBS, eliminando así el exceso de células plantónicas que se podrían encontrar en la superficie. Una vez lavada, se sumergió cada membrana en 2 mL de solución DAPI, tapando las placas con papel aluminio para dejar incubar durante 8 min en total oscuridad. Posteriormente, se lava tres veces con PBS.

3.5 Análisis microscopio de fluorescencia

Para visualizar las células teñidas con DAPI, se utilizó filtro 49 de ZeissTM. Previamente, se ajustó el enfoque del microscopio manteniendo un aumento de 400X, se enciende la cámara y ajusta exposición, para finalmente encender el foco de fluorescencia. Se analizaron las membranas y capturaron imágenes de la superficie de los túbulos en donde se percibe fluorescencia a 100X.

3.6 Análisis de microscopía electrónica

Posterior al análisis por microscopía de fluorescencia, se hicieron pruebas de análisis de membranas PES con y sin polímeros cultivadas en viales con sistema “batch” cerrados durante 8 días. Se analizaron dos de las membranas, una con y otra sin tratamiento de polímeros, las cuales fueron bañadas en oro y luego introducidas en la cámara del microscopio electrónico para obtener las imágenes de su superficie.

4 Caracterización de la composición de la comunidad microbiana presente en el agua residual.

4.1 Muestra biológica

Para extraer el material genético de la muestra, se centrifugaron los 80 ml de muestra microbiológica contenida en los “batch” en $t=8$ y $t=9$ (muestras en donde se registra mayor

crecimiento y producción de H₂) a 6000 RPM por 10 min, para obtener un concentrado de células, y se almacenaron en refrigerador a -22°C.

4.2 Extracción DNA

Se re-suspendió el concentrado celular en 1 mL de agua destilada ambos concentrados celulares (t8 y t9), para luego extraer el material genético utilizando el “kit” “Wizard Genomic DNA Purification” y siguiendo el protocolo definido por el fabricante.

4.3 Cuantificación DNA

Para cuantificar la cantidad de material genético extraído de la muestra, se utilizó equipo Nano Drop, el cual se calibró utilizando como blanco 1 µL de solución de rehidratación del “Kit” para extracción de DNA. Luego, se depositó 1 µL de solución de DNA de cada muestra para determinar su concentración en ng/ µL.

4.4 Gel de Agarosa

Para analizar tanto el DNA extraído como los fragmentos obtenidos del PCR por electroforesis, se preparó medio de agarosa al 1% mezclando 1,5g de agarosa en 150 mL de “Buffer” TAE 1x (composición solución stock a 50X: Tris base 242 g/L, CH₃COOH 57,1 mL/L y 0.5M EDTA 100 mL/L) para luego calentar en microondas por 7 min, revisando y revolviendo cada 1 min aproximadamente. Una vez que se lograra una mezcla completamente transparente y homogénea, se vertieron 50 mL en una probeta y se adicionaron 5 µL de solución RED GEL, procurando agitar la probeta para mantener homogeneidad de la mezcla. Se repitió procedimiento, pero ahora con 30 mL de agarosa y 3 µL de RED GEL. Paralelamente, se dispuso dos moldes de gel para electroforesis (30 y 50 mL) con “peinetas” de 8 y 26 pocillos, respectivamente, y se nivelaron sobre una superficie firme y estable. Por último, se vertió el contenido de las probetas respectivas en los moldes y se dejó enfriar en oscuridad tapando con papel aluminio hasta lograr que el gel se solidifique.

4.5 Partidores oligonucleotídicos

Se compraron tres pares de partidores universales: 27F y 1492R (bacterias), Arc-112F y Arc- 533R (arqueas) y Cris 150F y ClostlR (*Clostridium*). Se preparó una solución de trabajo de 100 mM, agregando diferentes volúmenes de agua libre de nucleasas (Tabla 1).

Tabla 1. Partidores universales para bacterias (27 F y 1492 R), arqueas (Arc-112 F y Arc- 533 R) y *Clostridium* (Cris 150 F y Clost R).

Primer	Secuencia (5' - 3')	Agua (μ L)	Bibliografía
27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	292,8	(H. Chen et al., 2016)
1492 R	GGTTACCTTGTTACGACTT	331.2	(H. Chen et al., 2016)
Arc-112 F	GCTCAGTAACACGTGG	203.8	(Shanmugam et al., 2014)
Arc- 533 R	TTACCGCGGCGGCTGGCA	416.9	(Shanmugam et al., 2014)
Cris 150 F	AAAGGRAGATTAATACCGCATAA	309.6	(Hung et al., 2008)
Clostl R	TTCTTCCTAATCTCTACGCA	284.4	(Hung et al., 2008)

4.6 PCR

Se prepararon siete reacciones para cada par de partidores, para lo cual se utilizaron micropipetas de 10 μ L y en un tubo Eppendorf de 0,6 mL se agrega: 2,8 μ L de partidor F, 2,8 μ L de partidor R, 70 μ L de “Buffer” 2X, 7 μ L de ADN y 57,4 μ L de agua pura. Luego, se agitó y distribuyeron 20 μ L de esta solución en seis tubos Eppendorf de 600 μ L. Esto se repite para los tres pares de partidores, obteniendo finalmente dieciocho reacciones en total.

Se preparó el equipo de PCR, en donde se ajustan las casillas en una gradiente de temperaturas 55 – 65°C en donde la fila A = 55°C, fila D = 57,2°C, fila F = 59,6°C, H = 61,9°C, J = 64°C y L = 65°C. Se dispuso todas las reacciones de los partidores universales para bacteria entre A1 – L1, para arqueas entre A2 – L2 y para *Clostridium* A3 – L3.

4.7 Electroforesis

Se dispuso el primer gel de agarosa (50 mL) dentro de una cámara de electroforesis horizontal que contiene medio TAE el cual debe cubrir el gel. Luego, se cargó el primer pocillo con 5 μ L de “Ladder” (1 kb DNA “Ladder”) y el resto con 5 μ L de las muestras obtenidas de las reacciones de PCR dispuestos ordenadamente. En el caso del segundo gel, se cargó el Ladder (1) y las muestras de DNA puro + Buffer a diferentes concentraciones dispuestas en el siguiente orden: 3 preparaciones para muestra 9 con un total de 6 μ L (5 de muestra y 1 de Buffer, 4 de muestra y 1 de buffer, 3 de muestra y 1 de buffer) en pocillos 2-4 y 3 preparaciones para muestra 8, repitiendo procedimiento que para muestra 9, dispuestos en pocillos 5-7. Luego de cargar todas las muestras, se encienden los electrodos y programa una pre-corrída de 5 min a 135 V y luego una corrída de 35 min a 100 V, siempre tapando con papel aluminio para evitar contaminación lumínica y revisando de vez en cuando cómo van corriendo las bandas. Terminado el proceso, se analizó el gel bajo luz ultravioleta para analizar resultado y capturar imágenes de los geles.

3-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 Obtención de curva y dinámicas de crecimiento de la comunidad microbiana presente en lasMBCs.

5.1 Curva de calibración

En el caso de las curvas de calibración obtenidas a partir de los datos experimentales utilizados para formar la curva de crecimiento, se puede evidenciar que se mantiene una relación lineal definida por la ecuación $Y=6,14 \times 10^7 * X + 4,38 \times 10^6$.

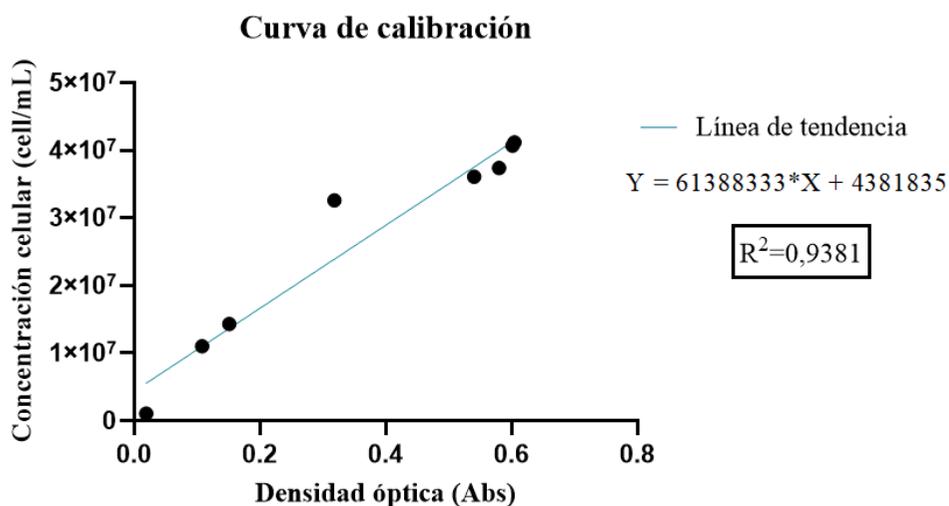


Gráfico 1. Curva de calibración obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento a partir de la serie de 9 viales de 100 mL, en donde se grafía la concentración celular en función de la densidad óptica.

Si se analiza el error asociado a las curvas de calibración, se puede evidenciar que la segunda, en donde se utiliza un único vial (B10), tiene un error asociado mayor con $R = 0,885$ (gráfico 3 del anexo), en comparación a la primera en donde se utilizan nueve viales diferentes (B1-9) con un $R = 0,938$. La relación entre D.O. y concentración celular graficada en ambas curvas de calibración, cada una asociada a una curva de crecimiento diferente, se mantiene similar en ambos set-ups planteados, existiendo un pequeño aumento en la pendiente de la curva formada a partir de un único vial B10 ($Y=6,93 \times 10^7 * X + 1,1 \times 10^6$), en comparación a la curva formada por 9 viales

diferentes ($Y=6,14 \times 10^7 * X + 4,38 \times 10^6$).

5.2 Curva de crecimiento

En el caso de las curvas de crecimiento obtenidas, se obtuvieron cuatro gráficas diferentes, dos para cada sistema de cultivo y método.

En el caso de la curva formada a partir de 9 viales diferentes (B1-9) se graficó la concentración celular y la densidad óptica vs el tiempo.

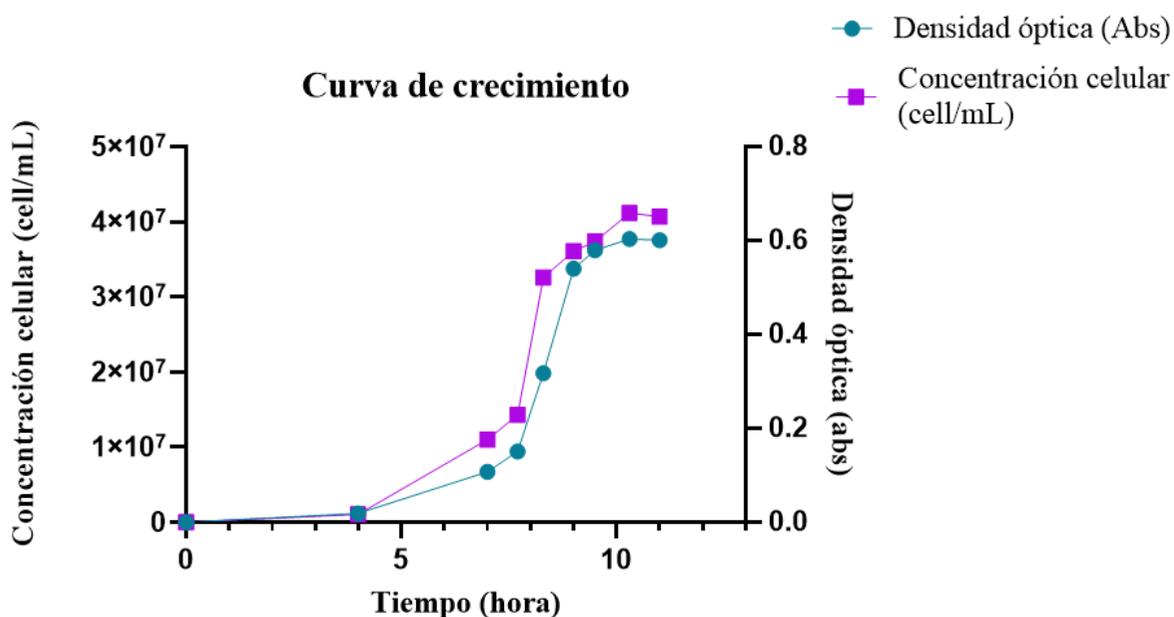


Gráfico 2. Curva de crecimiento obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento a partir de la serie de 9 viales de 100 mL, en donde se grafía la concentración celular en el eje izquierdo y la densidad óptica en el eje derecho en función del tiempo.

En el caso de la curva según la concentración celular, se puede evidenciar un crecimiento que entra a fase exponencial alrededor de las 4 horas desde la inoculación del medio y que entra a una fase estacionaria a partir de las 9 horas desde la inoculación aproximadamente alcanzando una concentración celular máxima de $4,12 \times 10^7$ cel/mL. En el caso de la curva según densidad óptica, se puede evidenciar un comportamiento de crecimiento similar, en donde se marca una fase exponencial y otra estacionaria en los mismos rangos de tiempo mencionados anteriormente,

alcanzando un valor máximo de 0,604.

Cabe mencionar que en el caso del vial B10 el “peak” (gráficos 4 y 5 del anexo) se evidenciaron algunas diferencias en la dinámica de crecimiento de la comunidad microbiana que podría asociarse a los cambios en la relación proporcional líquido/gas, como también la concentración celular presente en la fase líquida del biorreactor, ya que, en cada muestra, se extrae un 1 mL de cultivo, lo que en total significan 9 mL menos que en el tiempo cero (aproximadamente un 6% del volumen total del vial).

De forma general, se logra identificar tanto en la gráfica de D.O. y concentración celular una primera fase adaptativa o lag, que dura hasta las 4 horas, en donde comienza la fase exponencial de crecimiento entre las 4 y 9 horas. Desde ahí en adelante, el crecimiento se va manteniendo cada vez más constante, partiendo entonces una fase estacionaria.

Al graficar el log de la concentración celular vs el tiempo, se ajusta a una relación lineal definida por la ecuación $Y=0,7291*X+11.0$. A partir de esta relación, se obtiene un $\mu = 0,7291 \text{ h}^{-1}$ y se calcula el tiempo de generación $g = 0,95 \text{ h}$ a partir de la fórmula (2), la velocidad de crecimiento $K= 1,05 \text{ h}^{-1}$ a partir de la fórmula (3) y la cosecha máxima $M= 4,12 \times 10^7 - 7,3 \times 10^5 = 4,047 \times 10^7$ cel/mL.

El tiempo de generación represente el tiempo en que la población duplica su tamaño, que para el caso de esta comunidad bacteriana equivale a 58 min aproximadamente, obteniendo en un periodo de 11 horas una población que alcanza las $4,047 \times 10^7$ cel/mL.

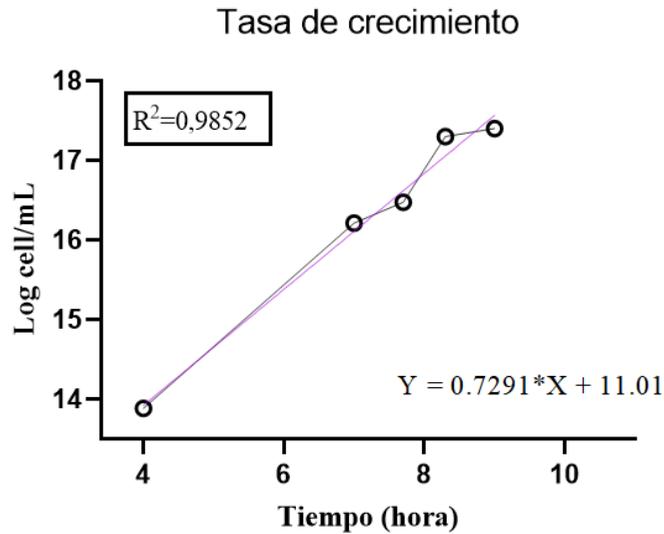


Gráfico 3. Relación entre el log del de la concentración celular y el tiempo.

5.3 Producción de Hidrógeno

Con respecto a la producción de biogás e hidrógeno, en primera instancia se obtuvo el volumen de gas generado en la curva formada por nueve viales de 50 mL, que al momento de graficar, se puede evidenciar una tendencia exponencial alcanzando un valor máximo de 5,5 mL a las 11 h. Si se analiza la línea de tendencia, se obtiene un $R = 0,9422$.

Se puede evidenciar que el cultivo comienza a aumentar su producción a las 7 horas desde el inóculo de los viales de 50 mL, aumento de producción que coincide con el comienzo de la fase exponencial del cultivo microbiano. Además, el “peak” de producción coincide con el “peak” de crecimiento, vinculando ambas variables (gráfico 5).

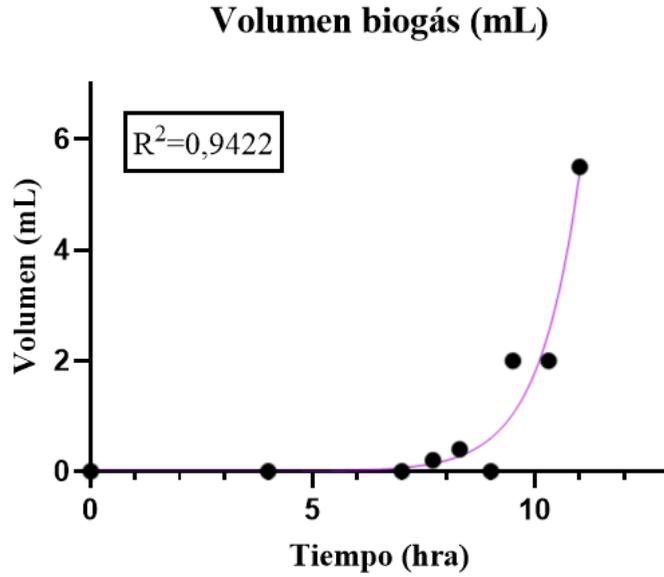


Gráfico 4. Volumen de biogás en serie de viales de 50 mL en función del tiempo.

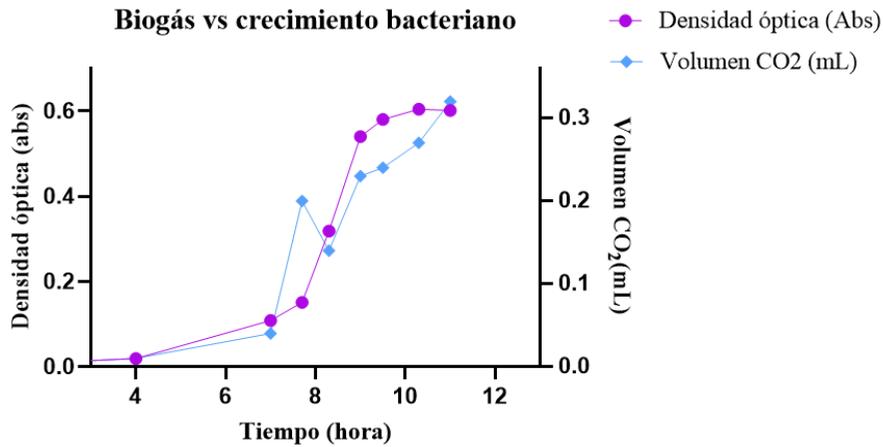


Gráfico 5. Volumen de CO₂ generado y densidad óptica en serie de viales de 100 mL en función del tiempo.

Por otro lado, al analizar las muestras de gas provenientes de la serie de viales de 100 mL en el cromatógrafo, se puede evidenciar presencia de 2 gases principalmente; CO₂ y O₂, graficándose un aumento de CO₂ en el tiempo logrando alcanzar un máximo de 0,32 mL a las 11 horas. Se pudo registrar presencia de O₂ que aumentó entre las 8-10 horas, disminuyendo posteriormente y

variando entre 0,04-0,16 mL. Con respecto al hidrógeno, no fue posible evidenciar presencia de H₂ en ninguna de las muestras, menos en el vial n°9 (a las 98 horas, datos no graficados), en donde se registró una cantidad de 0,18 mL (además de 0,08 mL de O₂ y 1,23 mL de CO₂).

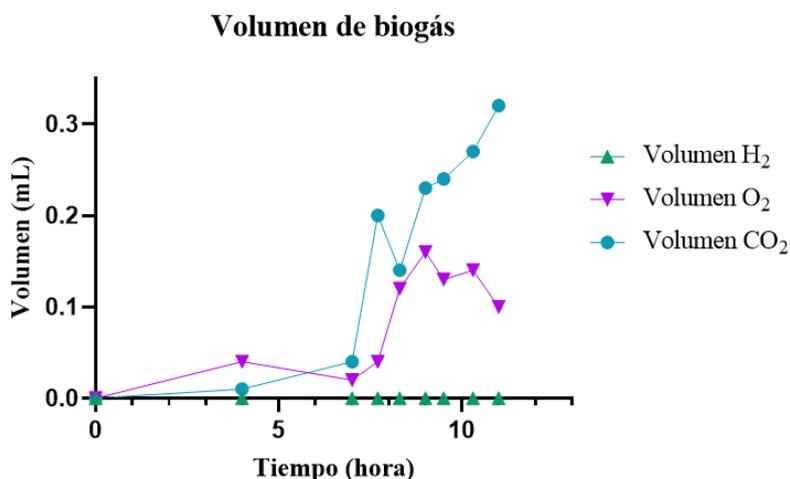


Gráfico 6. Volumen de H₂, CO₂ y O₂ en serie de viales de 100 mL en función del tiempo.

Para el caso de la muestra gaseosa, se evidencia la presencia de una pequeña cantidad de O₂ (asociado al aire presente en la punta de la jeringa de inyección en el cromatógrafo), un aumento progresivo de CO₂ en la muestra, gas previamente vinculado con el metabolismo tanto de acidófilos productores de H₂ (Mohan, 2009b).

Por otro lado, no se registra presencia de H₂ en ninguno de las muestras enfrascadas de un día para el otro, y sólo se pudo registrar para la muestra obtenida a las 98 horas a partir del vial N°9. Si bien se hicieron pruebas para comprobar la efectividad de la extracción y encapsulación de la muestra gaseosa dentro del vial de 10 mL para poder transportar la misma hasta el cromatógrafo, en las cuales se logró medir el H₂ presente, el método ha demostrado ser deficiente, ya que no ha sido posible encapsular la muestra en el interior del vial por un periodo más largo de tiempo. Esto podría trabajarse buscando un sistema más hermético, especialmente diseñado para obtener muestras gaseosas.

El H₂ es un gas altamente volátil de pequeño tamaño, que al ser introducido en un vial con una gran cantidad de N₂ es altamente diluido, lo cual podría dificultar su detección en el cromatógrafo. Para futuros experimentos, podría probarse sustituir el N₂ por un lavado de He, gas de menor tamaño que cumple la función de estándar para estudios de H₂ por cromatografía de gas.

5.4 Cambios de pH

En relación con los cambios de pH y temperatura asociados a la dinámica de crecimiento de la comunidad microbiana, se midieron estos parámetros en los 9 viales de 50 mL utilizados para formar curva de crecimiento.

Al graficar el pH vs tiempo, se puede evidenciar una disminución del pH progresiva en relación con el tiempo, definida por una relación lineal cuya ecuación de la regla otorga un R = 0,5801.

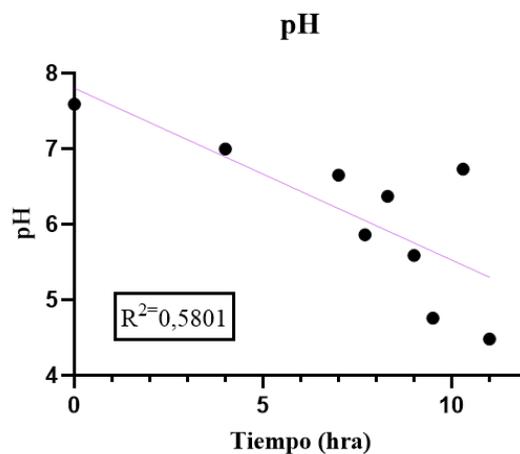


Gráfico 7. Variación de pH en función del tiempo asociado a la curva de crecimiento conformada por series de viales de 50 mL.

Se puede evidenciar que a medida que crece y se desarrolla el cultivo, el pH disminuyendo, condiciones que dan cuenta de una acidificación del medio. Revisando en la literatura, la producción de biogás por acidófilos se ha vinculado principalmente con la especie *Clostridium* (Kapdan & Kargi, 2006), condiciones que suele inhibir la actividad de microorganismos metanógenos que consumen parte del H₂ generado en este proceso.

Al analizar los valores de DQO inicial obtenido de los botellines en cuestión tabla 4 en anexo, se

puede evidenciar una variación en los datos obtenidos, lo cual puede asociarse a que la mezcla de reactivos del RIL no se encontraban totalmente disueltos al momento de repartirlo en los diferentes viales. De todas maneras, esta variabilidad no es significativa para efectos del crecimiento de la comunidad microbiana, permitiendo obtener un crecimiento equivalente en los diferentes viales, manteniendo la temporalidad entre los mismos, a diferencia de los resultados obtenidos en ensayos previos, donde no se agitaba y calentaba la muestra antes de repartir en los viales. Por otro lado, la DQO experimental promedio (9.600 g/L) resultó mayor por 3.600 g/L a la DQO teórica calculada (6.000 g/L), por lo que se propone re-ajuste y revisión de las conversiones utilizadas para modificar el protocolo original.

6 Análisis de la formación de biopelícula sobre la membrana de PES

6.1 Formación de biopelícula sobre la membrana PES por DAPI

Al analizar las membranas control para ambas condiciones (PES sola y PES+PVA+PDA), no se evidencian marcas fluorescentes, lo cual era de esperarse ya que estas membranas fueron preparadas en condición estéril y no fueron inoculadas.

Para el caso de las membranas analizadas luego del 4to día de cultivo, no se logra evidenciar fluorescencia asociada a la membrana. Desde el 8vo día se pudo registrar tinción fluorescente sobre las fibras, tanto en la membrana sin como en la con polímeros, la cual se vio aumentada al 12vo día en ambos casos. Comparando ambas condiciones a un mismo tiempo de cultivo, no se evidencian diferencias significativas con respecto a la adhesión sobre la membrana. En ninguno de los casos se evidencia formación de biopelícula como tal, pero sí un aumento progresivo de células adheridas a la membrana en el tiempo.

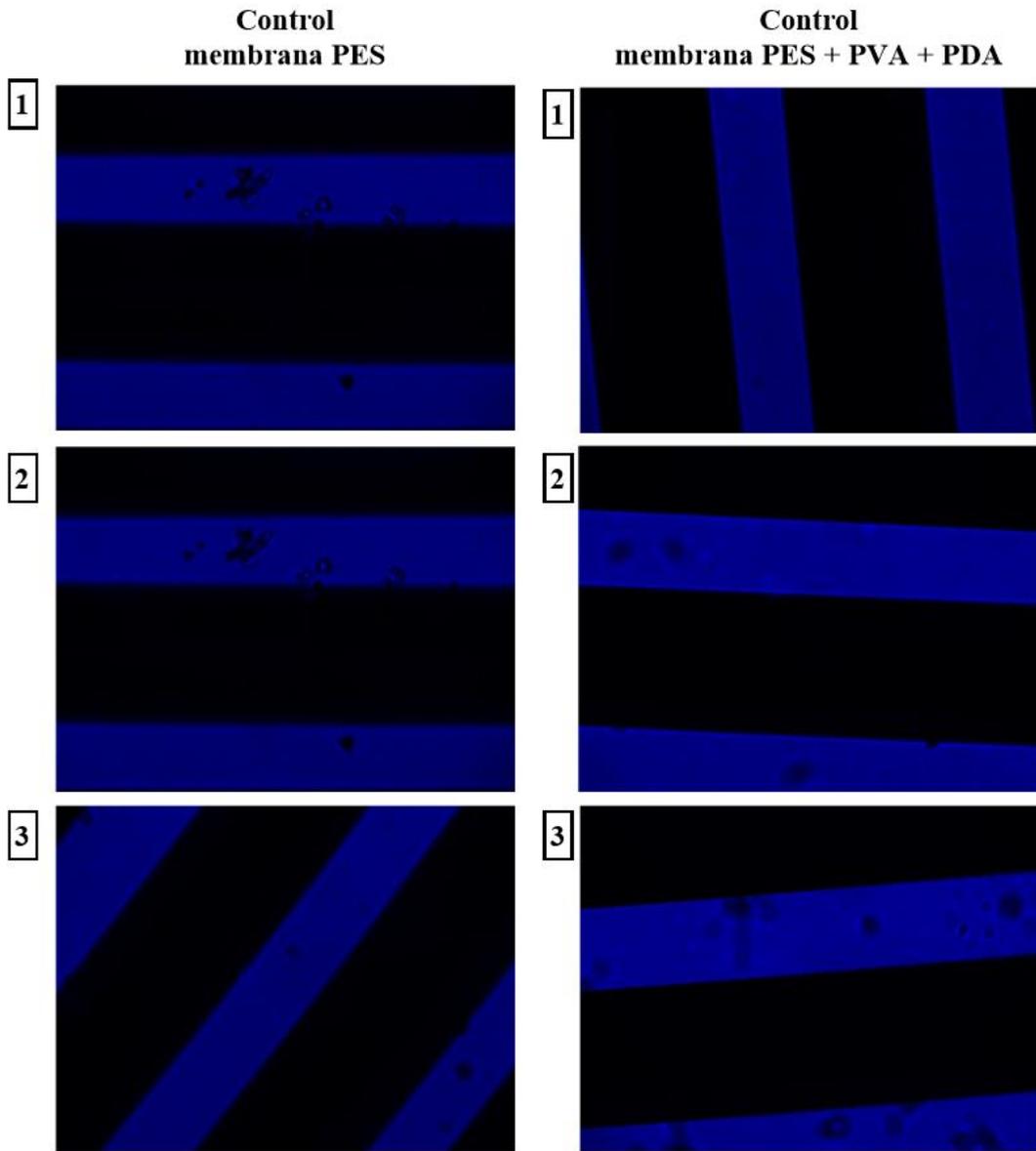


Figura 5. Imágenes en microscopio de fluorescencia de membranas control teñidas con DAPI.

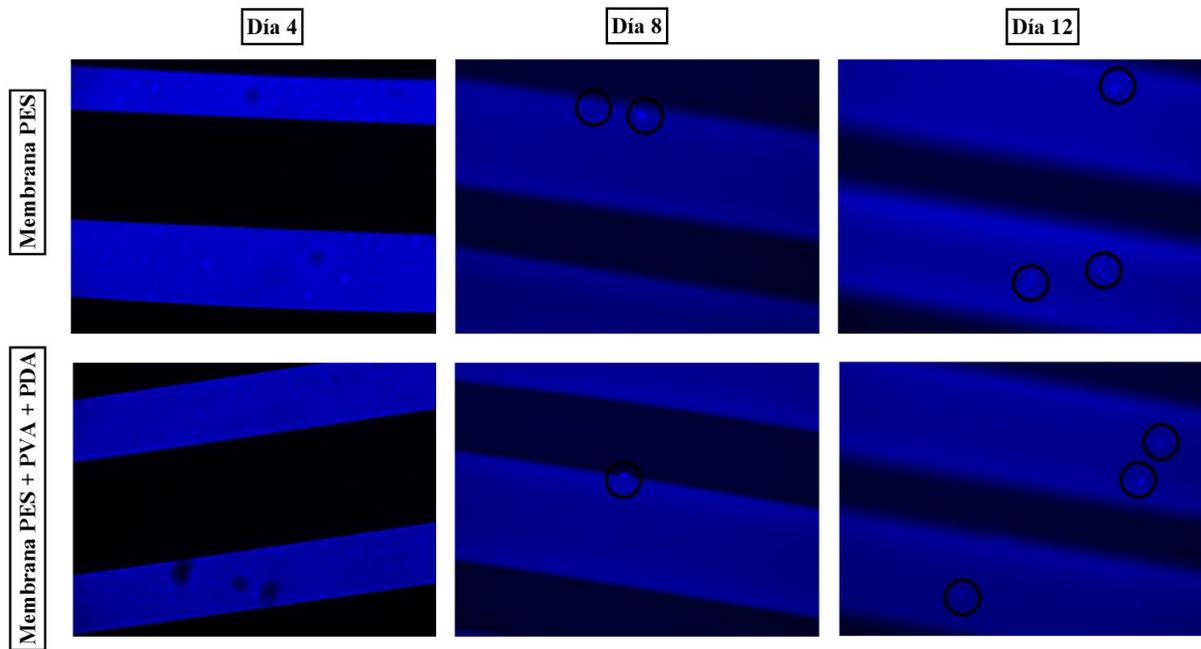


Figura 6. Imágenes en microscopio de fluorescencia de membranas cultivadas durante 4, 8 y 12 días teñidas con DAPI. Círculos negros encierran células marcadas con DAPI.

6.2 Formación de biopelícula sobre la membrana PES por SEM

Las imágenes permiten visualizar la superficie de las fibras de membrana, en donde se evidencia una clara textura más rugosa en el caso de la membrana tratada con polímeros.

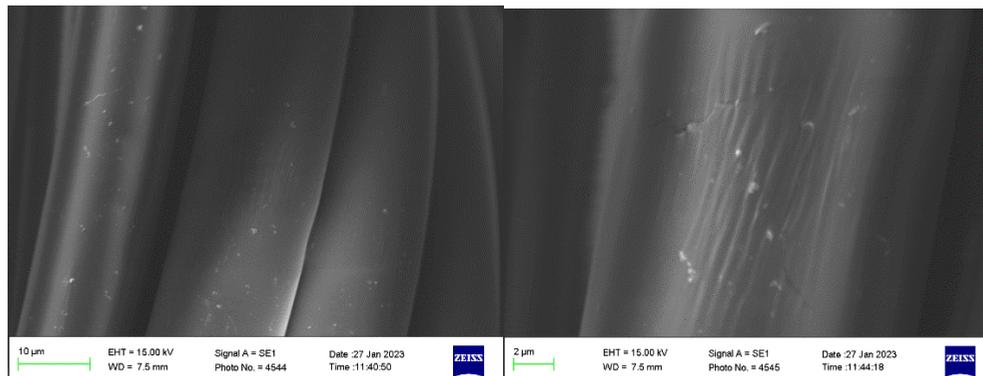


Figura 7. Imágenes de la membrana PES (izquierda) y membrana PES+PVA+PDA (derecha) incubadas durante 8 días en viales de 50 mL.

Un análisis con mayor aumento permite visualizar irregularidades asociadas a esta superficie, tanto en una disposición más homogénea en el caso de la membrana con polímeros, como agrupaciones definidas como se evidencia en el caso de la membrana PES.

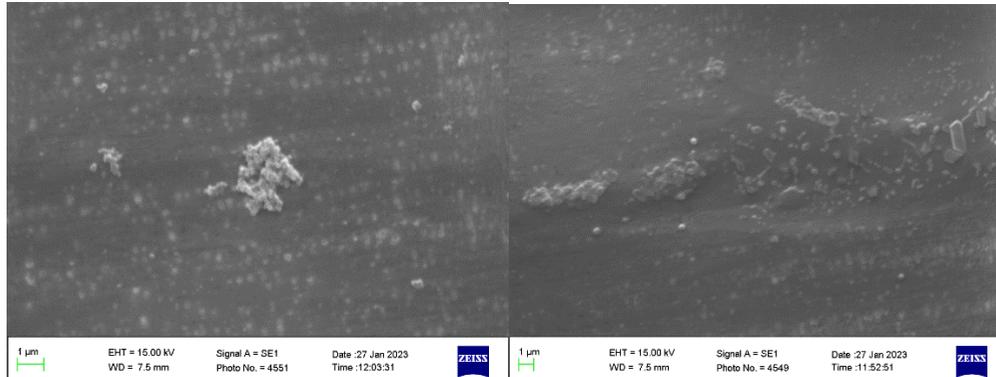


Figura 8. Imágenes de la membrana PES (izquierda) y membrana PES+PVA+PDA (derecha) incubadas durante 8 días en viales de 50 mL.

Si bien esta metodología permite visualizar con lujo de detalle la superficie de la membrana, estas imágenes son preliminares y se requiere de una estandarización del método de secado de las bacterias para poder visualizarlas apropiadamente.

Analizando ambos métodos, se obtuvieron resultados preliminares prometedores ya que permiten evidenciar el desarrollo de la comunidad microbiana sobre la membrana. Sin embargo, se requiere de pruebas a largo plazo y un mayor manejo del programa de imágenes para poder estandarizar un método que permita evidenciar formación de biopelícula sobre la membrana.

7 Caracterización de la composición de la comunidad microbiana presente en el agua residual.

7.1 Extracción y cuantificación de ADN a partir de la muestra microbiológica

Al centrifugar muestras biológicas obtenidas a partir de 2 viales a $t=8$ y $t=9$, se obtiene pellet en donde se concentran las células microbianas presentes en cada muestra. El protocolo estandarizado correspondiente al “kit” utilizado se llevó a cabo con éxito, logrando cuantificar posteriormente la

cantidad de material genético presente en cada muestra. Durante este procedimiento se detuvo rehidratación de la muestra (paso 19 kits), a los 20 min, para disminuir la concentración de DNA presente en la muestra.

Tabla 2. Resultados de cuantificación de DNA microbiano extraído de muestra de agua residual municipal.

Muestra	Concentración DNA (ng/mL)
Muestra 3 (t = 8)	232
Muestra 4 (t = 9)	255

En el caso de las muestras 3 y 4 extraídas, al analizar el gel de electroforesis obtenido, se puede evidenciar en todas las columnas una banda principal con un tamaño aproximado de 10.000 pb.

En relación a la calidad de las bandas, se puede evidenciar mayor calidad para el caso de las muestras más diluídas (3 μ L de muestra, 1 μ L de “buffer” y 2 μ L de agua pura).

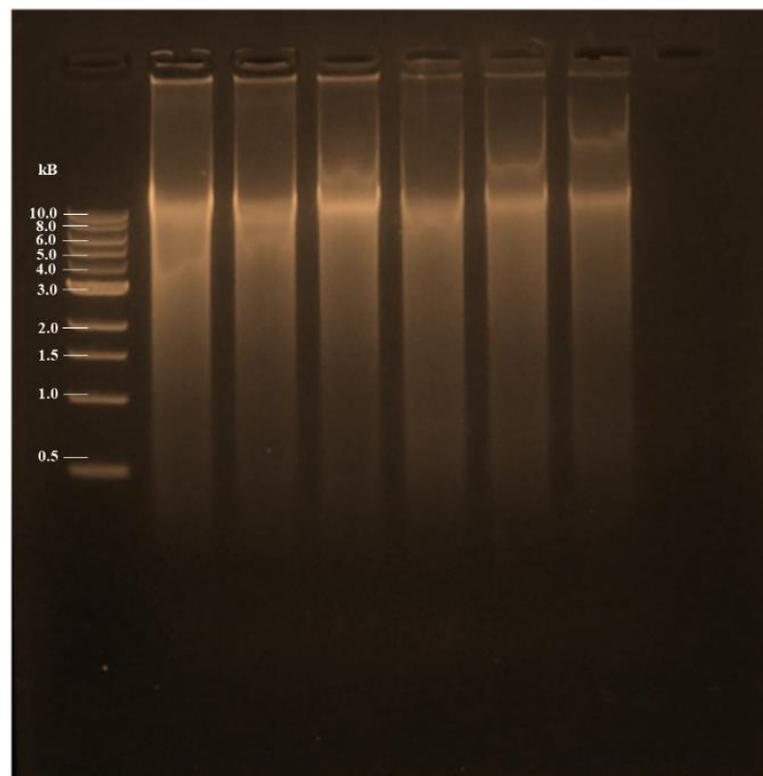


Figura 9. Gel de agarosa con DNA extraído de la muestra con comunidad microbiana de interés.

7.2 PCR con partidores universales

Al correr el gel obtenidos de las muestras de ADN con los partidores universales utilizados, se obtiene un gel con fragmentos de diferentes tamaños. De acuerdo con el tamaño de las bandas, se obtienen fragmentos de 1.500 pb para las reacciones asociadas a los partidores universales para bacterias, fragmentos de 500 pb para los universales para arqueas y fragmentos de 500 pb para los universales de *Clostridium* aproximadamente. En los 3 casos, se puede evidenciar que a medida que aumenta la temperatura, la intensidad de la banda va disminuyendo.

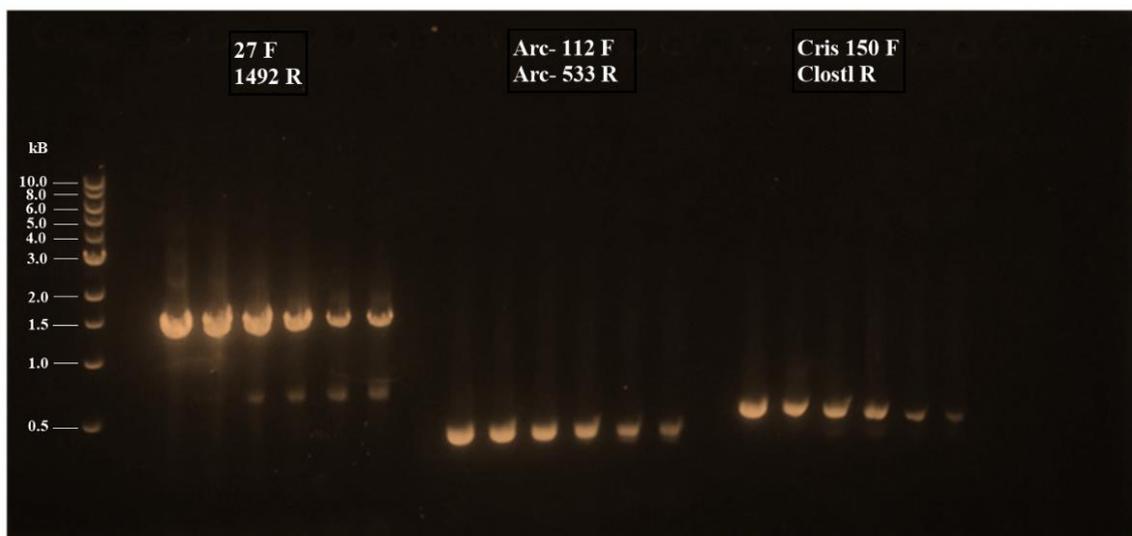


Figura 10. Gel de agarosa con resultados de PCR dispuestos de la siguiente forma: Ladder (2), Bacteria universal en orden A1 – L1 de izquierda a derecha (4 -9), Arquea universal en orden A2 – L2 de izquierda a derecha (11 – 16) y *Clostridium* universal en orden A3 – L3 de izquierda a derecha (18 – 23).

Al analizar los resultados de acuerdo con la gradiente de temperaturas, se puede apreciar que para el caso de las bandas con partidores para bacterias se obtiene una mayor definición de la banda a 64 y 65°C, pero en ambos casos se evidencia una segunda banda de aproximadamente 700 pb. Para el caso de las bandas asociadas a los partidores para arqueas, la calidad de la banda es bastante homogénea en todas las temperaturas testeadas, variando únicamente la intensidad y el grosor de estas. Por último, para el caso de las bandas asociadas a los partidores específicos para *Clostridium*, todas las bandas se encuentran bien definidas, pero varían en grosor. Además, se puede evidenciar

que para las temperaturas 59,6°C, 61,9°C y 64°C (en menor medida) se presenta una segunda banda justo bajo la primera.

En los geles con muestras equivalentes de ADN puro, se expresan bandas con un contenido de material genético equivalente, ya que todas presentan un mismo tamaño, aproximadamente de 10.000 pb, en la figura 9.

Al analizar el resultado de los geles para las muestras de PCR con los distintos partidores moleculares, se puede evidenciar un efecto directo de la temperatura en la cantidad de material genético que forma la banda, ya que a medida que aumenta la temperatura va disminuyendo la intensidad y el grosor de la banda, lo cual significa que va disminuyendo la cantidad de fragmentos de ADN en la muestra.

En el caso de las muestras de PCR para los partidores universales de bacteria, se puede evidenciar una doble banda para las cuatro temperaturas más altas (59,6°C, 61,9°C, 64°C y 65°C), la cual podría asociarse a la presencia de dos tipos de bacterias diferentes, o a un daño en el material genético. Con respecto a las bandas, se obtiene un tamaño de los fragmentos aproximado a 1.500 pb y el grosor e intensidad es mayor al de las bandas obtenidas para los universales de arquea y *Clostridium*.

Tanto en el caso de las muestras de PCR para los partidores universales de arqueas como para los específicos de *Clostridium*, se puede evidenciar una disminución del grosor e intensidad de las bandas a medida que aumenta la temperatura, obteniendo un mismo tamaño para ambos grupos de aproximadamente 500 pb.

Las bandas obtenidas para los tres pares de partidores universales podrían dar luces a cerca de la comunidad microbiana en cuestión, evidenciando una presencia tanto de bacterias como de arqueas, y además determinándose como un grupo importante las bacterias del género *Clostridium*, bacterias anaeróbicas previamente asociadas en diversas instancias a la producción de H₂. Este resultado puede vincularse a los análisis del medio, ya que la actividad metabólica de este género

genera acidificación del medio, como ya antes se había mencionado. Por otro lado, estudios previos han evidenciado un efecto directo de la composición de la comunidad microbiana en la producción de H₂ y el rendimiento productivo de este mismo (Mohan, 2009b).

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

A lo largo de la investigación ejecutada en este seminario de título se logra desarrollar el sistema de cultivo batch cerrado, manteniendo en todos los viales una condición anaeróbica que permite el crecimiento y desarrollo de la comunidad microbiana de interés, que además permite obtener muestras del medio y muestras de gas, necesarias para llevar a cabo los estudios y experimentos planteados.

A partir de estos resultados, se logra la estandarización tanto del sistema de cultivo en batch cerrados como la toma de muestras necesarias para evaluar el crecimiento del cultivo y diferentes parámetros fisicoquímicos asociados a este, cumpliendo de esta manera con el objetivo específico n°1. Sin embargo, queda pendiente corregir y estandarizar método para toma de muestras gaseosas, que son claves para evaluar la producción de bio-hidrógeno y poder comparar/vincular con el crecimiento del cultivo.

Con la metodología implementada se ha logrado determinar la curva de crecimiento de la comunidad microbiana y evidenciar producción de hidrógeno a los 3 días de cultivo aproximadamente.

Para los estudios del cultivo utilizado en la membrana se hicieron pruebas con dos metodologías, en donde a partir de ambas (tinción DAPI y SEM) se lograron resultados preliminares prometedores, que permiten evidenciar el desarrollo de la comunidad microbiana sobre esta. Sin embargo, se requiere de más pruebas a largo plazo para estandarizar el uso de estas técnicas para este estudio y lograr obtener resultados sin ambigüedades que puedan dar luces de la viabilidad sobre la membrana y su productividad en el tiempo.

La obtención de diferentes muestras paralelamente a partir de un solo cultivo, permiten comparar los cambios en las condiciones del medio con el desarrollo de la comunidad microbiana y la composición de esta misma, logrando generar un mapa completo del proceso productivo asociado

a la actividad metabólica de la comunidad microbiana para evaluar puntos clave que afecten la producción de H_2 y poder optimizar el proceso para obtener rendimientos productivos más altos. Por otro lado, el uso de métodos de biología molecular permiten conocer con más profundidad el cultivo utilizado y obtener información crucial para comparar y complementar con los análisis fisicoquímicos. Se logra evidenciar la presencia de una comunidad microbiana diversa mediante la técnica de PCR utilizando tanto partidores universales como específicos del género *Clostridium*. Se requiere de análisis adicionales como la secuenciación del gen 16s ribosomal de estos fragmentos para obtener información de las especies específicas que componen la comunidad. Esta información sería de gran utilidad, ya que existe una gran diversidad de especies productoras de hidrógeno, que lo hacen mediante diferentes procesos metabólicos, por lo que manejar esta información permitiría tener una idea más clara de los parámetros a cuidar y formas de optimizar la producción de H_2 .

Por otro lado, los diferentes microorganismos que componen una comunidad pueden mantener diferentes dinámicas de crecimiento y las interacciones que estos mismos podría implicar cambios en la productividad del biorreactor. Es por esto, que podría evaluarse a futuro un estudio por RTQ-PCR asociados a los diferentes tiempos de la curva de crecimiento, permitiendo analizar los cambios en la comunidad microbiana en el tiempo y evaluar sus efectos en la producción de H_2 .

De todas maneras, se puede evidenciar que existe presencia del género *Clostridium* y que la síntesis de H_2 se produce mediante el proceso de acidificación, asociado al punto de máximo crecimiento microbiano.

En este contexto, el desarrollo de bioprocesos a escala industrial debe contar con conocimientos en el área de microbiología industrial para entender los mecanismos biológicos que subyacen a la producción del producto y poder optimizar el rendimiento a escala industrial.

Conocer con más profundidad los mecanismos que subyacen la producción de H_2 a partir de aguas residuales utilizando el biorreactor de membrana activa compuesta prototipado, podría aportar al

escalamiento de esta tecnología lo cual significaría un gran aporte al desarrollo sostenible del país, en donde la ciencia y la ingeniería convergen para reducir los impactos de nuestra sociedad en el medioambiente con un enfoque más circular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guillermo Donoso & Daniela Rivera (2020) *Desafíos del reúso de aguas residuales tratadas en Chile*. (s. f.). <http://derechoygestionaguas.uc.cl/es/documentos/new/251-2020-desafios-del-reuso-de-aguas-residuales-tratadas-en-chile-guillermo-donoso-y-daniela-rivera>
2. Amin, M., Shah, H. A., Fareed, A. G., Khan, W. S., Chung, E., Zia, A., Farooqi, Z. U. R., & Lee, C. (2022). Hydrogen production through renewable and non-renewable energy processes and their impact on climate change. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(77), 33112-33134. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.07.172>
3. Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUESTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO
4. Bilgen, S. (2014). Structure and environmental impact of global energy consumption. *El servier*, 38, 890-902. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.004>
5. Chen, C., Peng, X., Xiao, Q., Wang, Y., Shumei, L., & Wei, Y. (2019). Data on microbial community composition of sludge from high altitude wastewater treatment plants determined by 16S rRNA gene sequencing. *Data in Brief*. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.103739>
6. Chen, H., Wan, J., Chen, K., Luo, G., Fan, J., Clark, J. H., & Zhang, S. (2016). Biogas production from hydrothermal liquefaction wastewater (HTLWW): focusing on the microbial communities as revealed by high-throughput sequencing of full-length 16s rRNA genes. *Water Research*, 106, 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.052>

7. Del Congreso Nacional, B. (s. f.). *Escasez hídrica en Chile: y las proyecciones del recurso.. Morales Estay, Pablo Andrés | . Biblioteca del Congreso Nacional de Chile.* bcn.cl. https://www.bcn.cl/asesoriasparlamentarias/detalle_documento.html?id=79317
8. Hung, C., Cheng, C., Cheng, L., Liang, C., & Lin, C. (2008). Application of clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1586-1592. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.037>
9. Informe Hidrometeorológico Semanal 20 Marzo 2023. (2023). *Dirección General de Aguas*, www.dga.mop.gob.cl. <https://dga.mop.gob.cl/productosyservicios/informacionhidrologica/Paginas/default.aspx>
10. Kang, J., Wei, Y., Liu, L., Han, R., Yu, B., & Wang, J. (2020). Energy systems for climate change mitigation: A systematic review. *Applied Energy*, 263, 114602. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114602>
11. Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, 38(5), 569-582. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
12. Klatt, C. G., & LaPara, T. M. (2003). Aerobic biological treatment of synthetic municipal wastewater in membrane-coupled bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(3), 313-320. <https://doi.org/10.1002/bit.10572>
13. Laurinavichene, T. V., & Tsygankov, A. A. (2016). Different types of H₂ photoproduction by starch-utilizing co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.117>
14. Macedo, J. (2023a). Climate change: a bioethical emergency and health priority. *Ethics, Medicine and Public Health*, 27, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.jemep.2023.100872>

15. Macedo, J. (2023b, abril 1). Climate change: a bioethical emergency and health priority. *Ethics, Medicine and Public Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jemep.2023.100872>
16. Mohan, S. V. (2009a). Waste to Renewable Energy: A Sustainable and Green Approach Towards Production of Biohydrogen by Acidogenic Fermentation. En *Springer eBooks* (pp. 129-164). https://doi.org/10.1007/978-90-481-3295-9_7
17. Mohan, S. V., Chandrasekhar, K., Chiranjeevi, P., & Babu, P. (2013a). Biohydrogen Production from Wastewater. En *Elsevier eBooks* (pp. 223-257). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59555-3.00010-6>
18. Mohan, S. V., Chandrasekhar, K., Chiranjeevi, P., & Babu, P. (2013b). Biohydrogen production from wastewater. En *Elsevier eBooks* (pp. 223-257). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59555-3.00010-6>
19. Onu-Agua. (2017). *Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos 2017. Aguas residuales: El recurso desaprovechado*. <https://biblioteca.cehum.org/bitstream/CEHUM2018/1765/1/UN%20Water.%20Informe%20Mundial%20de%20las%20Naciones%20Unidas%20sobre%20el%20Desarrollo%20de%20los%20Recursos%20H%c3%a1dricos%202017.pdf>
20. Park, J. H., Kim, D. H., Baik, J., Park, J. Y., Rene, E. R., Lee, C. Y., & Kim, S. H. (2021). Improvement in H₂ production from *Clostridium butyricum* by co-culture with *Sporolactobacillus vineae*. *Fuel*, 285, 119051. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119051>
21. Saravanan, A., Kumar, P. S., Khoo, K. S., Show, P. L., Carolin, C. F., Jackulin, C. F., Jeevanantham, S., Karishma, S., Show, K., Lee, D., & Chang, J. S. (2021). Biohydrogen from organic wastes as a clean and environment-friendly energy source: Production pathways, feedstock types, and future prospects. *Bioresource Technology*, 342, 126021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126021>

22. Shanmugam, S., Chaganti, S. R., Lalman, J. A., & Heath, D. D. (2014). Statistical optimization of conditions for minimum H₂consumption in mixed anaerobic cultures: effect on homoacetogenesis and methanogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.07.143>
23. Song, Z., Liao, R., Wang, M., Zhang, J., Dong, Z., Wen, Z., Dong, W., & Sun, F. (2022). Biosurfactant-driven synergic roles to accelerate biofilm formation in an anaerobic moving bed biofilm reactor (MBBR): A comprehensive analysis on meso and micro scale. *Journal of Cleaner Production*, 373, 133930. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133930>
24. Vera, L., Ruigómez, I., González, E. V., Bodelón, P., & Rodríguez-Sevilla, J. (2014). BIORREACTORES DE MEMBRANA ANAEROBIOS PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS. ESTUDIO PRELIMINAR ANAEROBIC MEMBRANE BIOREACTORS FOR DOMESTIC WASTEWATER TREATMENT. PRELIMINARY STUDY. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323632812001.pdf>

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Estandarización de metodología para curva de calibración y crecimiento B10

La primera curva de calibración diseñada otorgó valores de densidad óptica negativos asociados a las muestras altamente diluidas que contienen una concentración celular baja, valores que fueron obtenidos a partir de tres replicados, manteniendo una alta similitud entre ellos.

Tabla 1. Densidad óptica y concentración celular obtenida a partir de una dilución seriada del cultivo de interés.

Dilución seriada	Concentración celular (cel/mL)	Densidad Óptica			
		Batch 1	Batch 2	Batch 3	PROM
1	1,84E+07	0,333	0,331	0,331	0,33
0,1	1,84E+06	0,012	0,001	-0,003	0,003
0,01	1,84E+05	-0,11	-0,019	-0,019	-0,05
0,001	1,84E+04	-0,21	-0,024	-0,024	-0,09
0,0001	1,84E+03	-0,2	-0,024	-0,024	-0,08
0,00001	1,84E+02	-0,12	-0,026	-0,018	-0,05
0,000001	1,84E+01	-0,19	-0,022	-0,021	-0,08

Para el diseño de la gráfica, se trabajó con la concentración celular teórica utilizando la concentración inicial experimental de $1,84 \times 10^7$ cel/mL y dividiendo de acuerdo con la dilución con la que se esté trabajando. La línea de tendencia obtenida tiene un $R^2 = 0,985$.

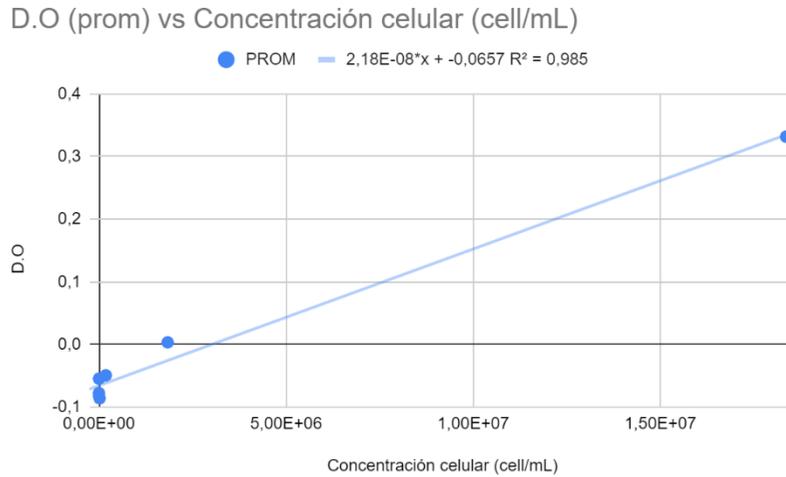


Gráfico 1. Curva de calibración obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento obtenida a partir de los datos en tabla 1.

En el caso de la segunda curva de calibración, se trabajó con concentraciones celulares experimentales y con muestras menos diluidas. En el caso de ambas muestras sin diluir, ya que se encontraban con una alta concentración celular, tuvo que obtenerse utilizando el conteo obtenido de la dilución 0,2.

Tabla 2. Densidad óptica y concentración celular obtenida a partir de diferentes dilución provenientes de dos viales diferentes.

Batch	Dilución	Concentración celular (cel/mL)	D.O.
1		6,34E+07	0,31
2		2,99E+07	0,105
1	0,2	1,27E+07	0,053
2	0,2	5,97E+06	0,014
1	0,1	3,05E+06	0,015
1	0,01	3,80E+05	-0,002

A partir de la línea de tendencia obtenida en la gráfica se pudo extraer un $R^2 = 0,983$, en donde la mayoría de los valores de D.O alcanzaron valores positivos.

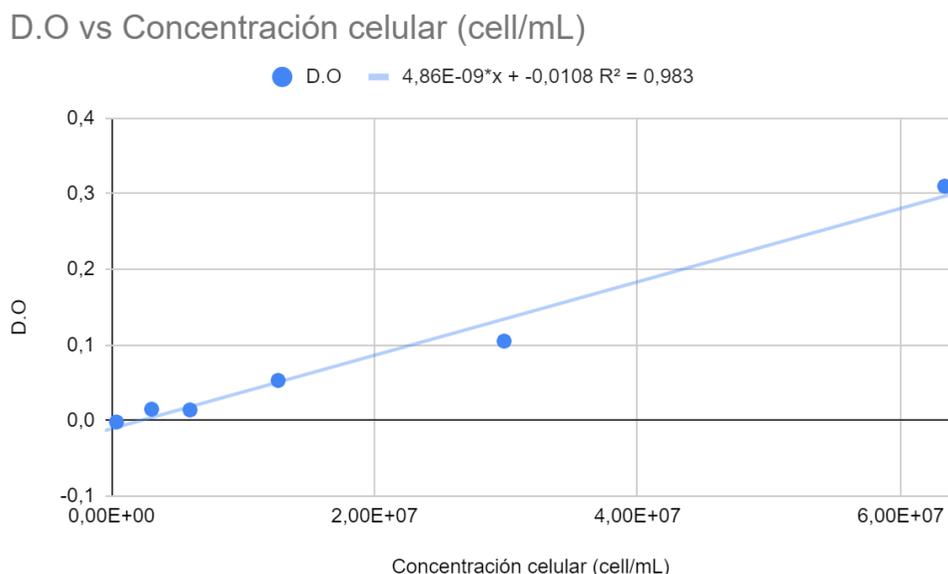


Gráfico 2. Curva de calibración obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento obtenida a partir de los datos en tabla 2.

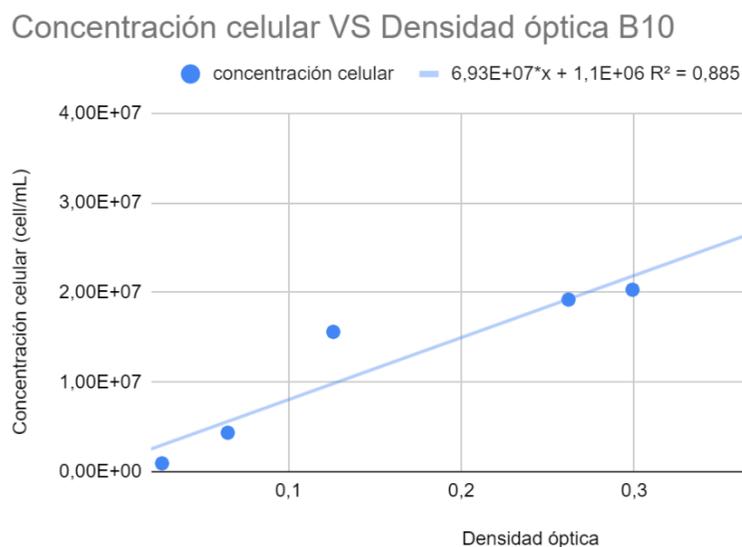


Gráfico 3. Curva de calibración obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento obtenida a partir de curva de crecimiento en vial de 250 mL.

Si se analiza el error asociado a las curvas de calibración, se puede evidenciar que para el vial de 250 mL (B10) tiene un error asociado mayor con $R^2 = 0,885$, en comparación a la primera en

donde se utilizan nueve viales diferentes (B1-9) con un $R = 0,938$.

En el caso de la segunda curva, en donde sólo fue utilizado un vial (B10), al igual que para la primera curva (B1-9), se graficó la concentración vs el tiempo y la densidad óptica vs el tiempo paralelamente.

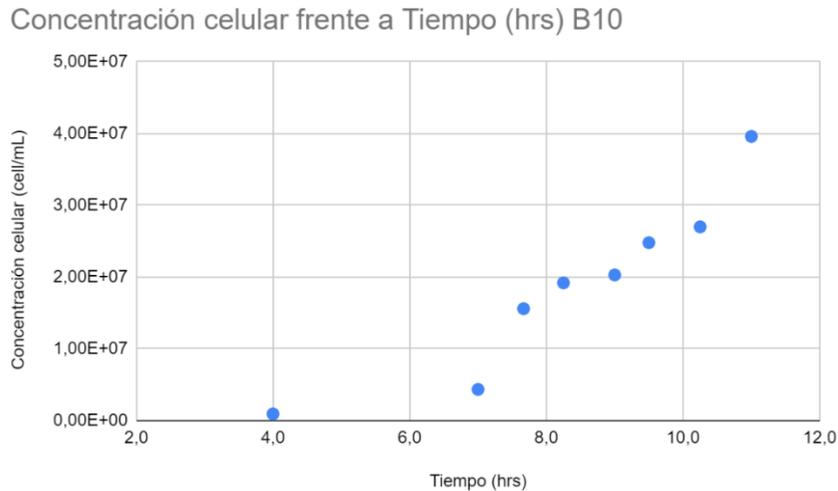


Gráfico 4. Curva de crecimiento de vial de 250 mL expresada en concentración celular vs tiempo.

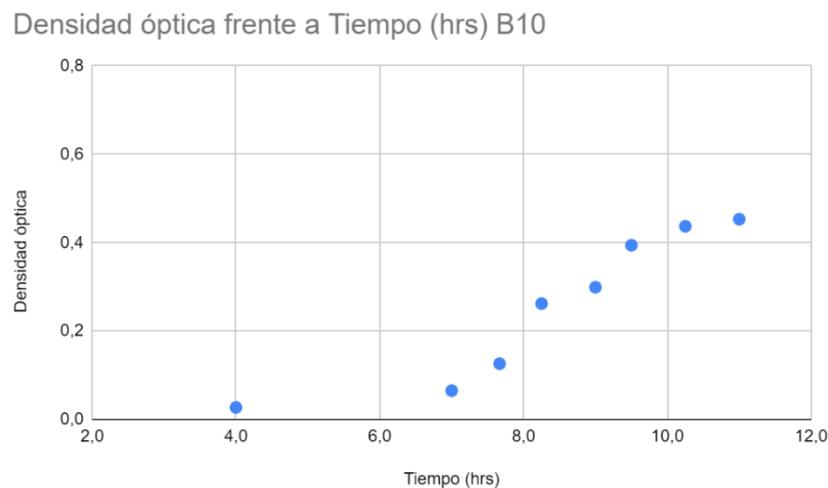


Gráfico 5. Curva de crecimiento de vial de 250 mL expresada en densidad óptica vs tiempo.

Si se comparan ambas curvas, se evidencia un crecimiento más retardado en el viál de 250 mL, probablemente debido a la metodología utilizada para muestreo en este vial, ya que a diferencia de la curva formada por 9 viales, en este caso se va extrayendo volumen del mismo vial para todas

las muestras de la curva. Esto implica una modificación de la concentración celular durante el experimento dada la pérdida progresiva de volumen, además de modificarse la relación líquido/gaseosa. Es por esto que se descarta el uso de este método para analizar las dinámicas de crecimiento del cultivo.

Tabla 3. Datos obtenidos a partir de la serie de 9 viales de 100 mL.

T	Batch	Tiempo (h)	D.O.	Cel/mL	H ₂ (mL)	O ₂ (mL)	CO ₂ (mL)	DQO (g/L)
0		0	0	7,30E+05	0	0	0	10,345
1	B1	4	0,019	1,07E+06	0	0,04	0,01	10,065
2	B2	7	0,108	1,10E+07	0	0,02	0,04	9,83
3	B3	7,7	0,151	1,43E+07	0	0,04	0,20	9,3
4	B4	8,3	0,318	3,26E+07	0	0,12	0,14	9,81
5	B5	9	0,54	3,61E+07	0	0,16	0,23	7,505
6	B6	9,5	0,58	3,74E+07	0	0,13	0,24	9,675
7	B7	10,3	0,604	4,12E+07	0	0,14	0,27	10,17
8	B8	11	0,601	4,07E+07	0	0,10	0,32	9,635
9	B9	98,5	0,28	2,45E+07	0,18	0,08	1,23	9,49

Tabla 4. Datos obtenidos a partir de la serie de 9 viales de 50 mL.

T	Batch	Tiempo (hra)	Volumen biogás (mL)	pH
0		0	0	7,59
1	b1	4	0	7
2	b2	7	0	6,65
3	b3	7,7	0,2	5,86
4	b4	8,3	0,4	6,37
5	b5	9	0	5,59
6	b6	9,5	2	4,76
7	b7	10,3	2	6,73
8	b8	11	5,5	4,48
9	b9	98,5	13,5	4,26

Basado en los datos obtenidos, se puede evidenciar una DQO experimental promedio de 9,6 g/L. Cabe destacar que los datos obtenidos fueron previamente multiplicados por el factor de dilución 1/5 asociado.