



---

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**OPCIÓN I.- TESIS**

**TRABAJO PROFESIONAL**

“ESTUDIO DE POBLACIONES MICROBIANAS EN  
LA REMOCIÓN DE CARBONO Y NITRÓGENO EN  
UN REACTOR ANAEROBIO DE BIOPELÍCULA  
PARA PRODUCIR BIOGÁS”.

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS  
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

**PRESENTA:**

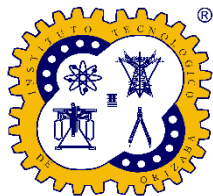
*I.Q. LUZ ANGÉLICA CARIÑO VÁZQUEZ*

**DIRECTOR DE TESIS:**

*DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA*

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

*DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN*



**ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO**

**NOVIEMBRE 2023**



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba  
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 17/noviembre/2023

Dependencia: División de Estudios de  
Posgrado e Investigación

Asunto: Autorización de Impresión  
OPCION: I

**C. LUZ ANGÉLICA CARIÑO VÁZQUEZ**  
Candidato(a) a Grado de Maestro(a) en:  
**CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**  
**P R E S E N T E.-**

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

**"Estudio de poblaciones microbianas en la remoción de carbono y nitrógeno en un reactor anaerobio de biopelícula para producir biogás"**

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

**ATENTAMENTE**

Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

*Cuahtémoc Sánchez R.*

**Dr. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS**  
**DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



OG-13-F06



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz.  
Tel. 01 (272)1105360 e-mail: dir\_orizaba@tecnm.mx tecnm.mx | orizaba.tecnm.mx



**2023**  
**Francisco VILA**  
EL PRIMER GOBIERNO DEL ESTADO



Orizaba, Veracruz, **14/noviembre/2023**  
Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

**LAURA ISABEL HERNÁNDEZ PALAGOT**

La cual lleva el título de:

**“Obtención de un inóculo anaerobio especializado en el consumo de sustratos  
complejos y producción de biogás”**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE  
Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA – TÉCNICA – CULTURA®

PRESIDENTE: DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA  
SECRETARIO: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN  
VOCAL: MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ  
VOCAL SUP.: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

FIRMA  
FIRMA  
FIRMA  
FIRMA

TA-09-18



## Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 21 del mes de Noviembre del año 2023.

El(la) que suscribe

C. Luz Angélica Cariño Vázquez

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 148 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

"Estudio de poblaciones microbianas en la remoción de carbono y nitrógeno en un reactor anaerobio de biopelícula para producir biogás"

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza y el Dr. Alejandro Alvarado Lassman y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [depi\\_orizaba@tecnm.mx](mailto:depi_orizaba@tecnm.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

  
Luz Angélica Cariño Vázquez  
Nombre y firma

## DEDICATORIAS

Gracias Dios mío por ser la luz y el ingeniero de mi vida, por ponerme a las personas indicadas en mi camino para llegar aquí, todo te lo debo a ti Señor. Mis palabras no son suficientes para agradecerte todo lo que me has dado, pero estoy segura de tu infinito amor.

Esta tesis se la dedico: A mi mamá Socorro Vázquez, tú sabes todo el esfuerzo y trabajo que nos ha costado llegar aquí, gracias infinitas por siempre apoyarme en cada paso que doy, por estar siempre junto a mí y amarme. Somos un gran equipo y este logro es de las dos, jamás lo hubiera logrado sin tu ayuda incondicional, te amo mami.

A mi hermanito Jesús Cariño, por ser mi gran compañero, desde que llegaste a nuestras vidas supe que era afortunada de tenerte, eres un gran regalo de Dios, gracias por siempre estar ahí cuando te necesito y por enseñarme tanto de la vida. Te amo enano.

A mi papá Rogelio Cariño, yo sé que a pesar de que no te encuentras físicamente con nosotros has estado siempre presente en cada paso que doy, sé que estás orgulloso de tu niña, un beso y un abrazo hasta el cielo papi.

A mi abuelita Lucía Vázquez y a mi tío el Pbro. Juan Vázquez por estar siempre presentes en mi vida, apoyándome y guiándome, gracias por todo.

A mi amiga y compañera Laura Palagot, fuiste una pieza clave en este camino, todo el proceso se volvió más alegre y liviano con tu compañía y apoyo, te admiro y te quiero. Por más amistad y ciencia.

A Daniel Orduña y Ariana Valdiviezo, gracias por estar siempre presentes, por su amistad, apoyo y consejos. Este tiempo no hubiese sido el mismo sin ustedes, por más años de aventuras y amistad, los quiero infinito.

A mis compañeros de laboratorio por siempre estar dispuestos a orientarme y explicarme y por hacer la experimentación más alegre con sus risas y pláticas.

## **RECONOCIMIENTOS ACADEMICOS**

Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted y brindarme la confianza de desarrollar esta investigación, es un excelente asesor de tesis, siempre pendiente y dispuesto a orientar. Así mismo, agradezco todo el apoyo, no sólo es un gran profesor, sino un gran ser humano. Atesoro todo el conocimiento que me ha transmitido tanto como su amistad, de corazón gracias por todo.

Dr. Alejandro Alvarado Lassman y Mtra. Alejandra Vallejo Cantú gracias por facilitarme el acceso y la estancia en su laboratorio, de igual forma les agradezco sus observaciones, aportaciones y correcciones para el desarrollo de la presente investigación.

Dra. Ofelia Landeta Escamilla gracias por todo el conocimiento compartido, por estar siempre al pendiente y dispuesta a solucionar, no sólo como coordinadora sino como mi tutora, así mismo agradezco sus comentarios, asesorías y correcciones para llevar a cabo esta tesis.

Dr. Raul Snell Castro gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme de la mejor manera, gracias por compartir su conocimiento conmigo, orientarme y dedicar el tiempo para asesorarme.

MCIQ. Luis Alfredo Hernández Vasquez gracias por el apoyo que me brindaste, por confiar en mí y estar siempre dispuesto a ayudar.

A Carolina Andrea López Báez y María del Rosario Hernández Xocúa, ustedes fueron partícipes de este logro, las quiero y les agradezco su trabajo, tiempo y amistad.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías por la beca No.1150695.

## RESUMEN

### **Estudio de poblaciones microbianas en la remoción de carbono y nitrógeno en un reactor anaerobio de biopelícula para producir biogás**

**Elaborada por:** I.Q Luz Angélica Cariño Vázquez

**Dirigida por:** Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

La remoción carbono-nitrógeno es una opción atractiva para la remoción de nitrógeno en presencia de una fuente rica en carbono orgánico, siendo una alternativa viable para la reducción de la carga orgánica y la recuperación de energía a través de la producción de biogás rico en metano. Sin embargo, la dinámica de poblaciones microbianas se podría ver afectada debido a la competencia por sustratos entre las bacterias desnitrificantes y arqueas metanógenas, provocando un bajo rendimiento de metano. Debido a esto la presente investigación tiene como objetivo estudiar las poblaciones microbianas que intervienen en la remoción combinada de carbono y nitrógeno dentro de un reactor anaerobio de biopelícula para producir biogás.

Se empleó un Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) con un volumen útil de 2.19 L el cual fue inoculado con Extendsphere™ colonizado. El RAH fue operado bajo condiciones mesofílicas manteniendo la temperatura en un rango de  $35 \pm 2$  °C y un pH de  $7 \pm 2$ . La vida operativa del reactor se dividió en cuatro etapas, dos de remoción de carbono (Etapa 1 y 4), sirviendo la Etapa 4 para evaluar la reversibilidad del sistema y dos de remoción carbono-nitrógeno (Etapa 2 y 3). En todas las etapas se empleó la fracción líquida de los residuos sólidos orgánicos como fuente de carbono, la cual fue suministrada con una carga volumétrica aplicada de 5 gDQO/L·d. En las Etapas 2 y 3 se empleó NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno, con una relación C/N (gDQO/gN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) de 30 y 15, respectivamente. El RAH fue monitoreado por medio del análisis del afluente y efluente determinando pH, alcalinidad, DQO<sub>T</sub>, DQO<sub>S</sub>, SST, SSV. Así mismo, en las Etapas 2 y 3 se monitoreó la remoción de nitratos mediante un método fotométrico. La captación del biogás producido se recolectó mediante un sistema de

desplazamiento gas-líquido. La caracterización de la composición microbiana se realizó mediante la extracción de ADN genómico de muestras de biopelícula adherida a los soportes, determinando las poblaciones presentes en el RAH por medio de secuenciación metagenómica shotgun de baja profundidad. Finalmente, se correlacionaron las variables operativas y microbianas mediante análisis de componentes principales.

En las Etapas de remoción de carbono se obtuvieron remociones de DQO de hasta el 99 % con una producción de biogás superior a los 5.5 L (0.64 Lbiogás/gDQO<sub>removidos</sub>). Por su parte en las etapas de remoción carbono-nitrógeno se obtuvieron remociones del 100 % N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> con una remoción de DQO superior al 97 %, sin embargo, la producción de biogás disminuyó considerablemente a 2.5 L (0.281 Lbiogás/gDQO<sub>removidos</sub>). Se obtuvieron en total de 7,992 OTUs, 199 correspondientes para el dominio *Archaea* y 7,793 para el dominio bacteria. La producción de metano se llevó a cabo por principalmente por la vía acetótrofa, a cargo de la especie *Methanothrix soehngenii*, así mismo se observó que esta especie competía por la fuente de carbono (acetato) con bacterias desnitrificantes, lo que provocó un bajo desempeño del reactor en función a la producción y rendimiento de biogás en las etapas de remoción combinada carbono-nitrógeno. El análisis permitió conocer las competencias por sustrato presentes dentro del reactor y observar la relación existente entre las especies.

## ABSTRACT

### **Study of microbial populations in the removal of carbon and nitrogen in an anaerobic biofilm reactor to produce biogas**

**By:** I.Q. Luz Angélica Cariño Vázquez

**Advisor(s):** Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Carbon-nitrogen removal is an attractive option for nitrogen removal in the presence of a source rich in organic carbon, being a viable alternative for reducing the organic load and recovering energy through the production of biogas rich in methane. However, microbial population dynamics could be affected due to competition for substrates between denitrifying bacteria and methanogenic *Archaea*, causing low methane yield. Due to this, the present research aims to study the microbial populations involved in the combined removal of carbon and nitrogen within an anaerobic biofilm reactor to produce biogas.

An Anaerobic Hybrid Reactor (AHR) was used with a useful volume of 2.19 L which was inoculated with colonized Extendsphere™. The HAR was operated under mesophilic conditions, maintaining the temperature in a range of  $35 \pm 2$  °C and a pH of  $7 \pm 2$ . The operational life of the reactor was divided into four stages, two for carbon removal (Stage 1 and 4), with Stage 4 serving to evaluate the reversibility of the system, and two for carbon-nitrogen removal (Stage 2 and 3). In all stages, the liquid fraction of the organic solid waste was used as a carbon source, which was supplied with an applied volumetric load of 5 gCOD/L·d. In Stages 2 and 3, NaNO<sub>3</sub> was used as a nitrogen source, with a C/N ratio (gDQO/gN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) of 30 and 15, respectively. The AHR was monitored by analyzing the influent and effluent, determining pH, alkalinity, COD<sub>T</sub>, COD<sub>S</sub>, TSS, VSS. Likewise, in Stages 2 and 3, the removal of nitrates was monitored using a photometric method. The biogas produced was collected using a gas-liquid displacement system. The characterization of the microbial composition was carried out by extracting genomic DNA from biofilm samples attached to the supports,

determining the populations present in the RAH by means of low-depth shotgun metagenomic sequencing. Finally, the operational and microbial variables were correlated using principal component analysis.

In the carbon removal stages, COD removals of up to 99 % were obtained with a biogas production greater than 5.5 L (0.64 Lbiogas/gCOD<sub>removed</sub>). For its part, in the carbon-nitrogen removal stages, 100% N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> removals were obtained with a COD removal greater than 97 %, however, biogas production decreased considerably to 2.5 L (0.281 Lbiogas/gCOD<sub>removed</sub>). A total of 7,992 OTUs were obtained, 199 corresponding to the *Archaea* domain and 7,793 to the *Bacteria* domain. The production of methane was carried out mainly by the acetotrophic route, by the species *Methanothrix soehngenii*. It was also observed that this species competed for the carbon source (acetate) with denitrifying bacteria, which caused poor performance of the reactor based on the production and performance of biogas in the combined carbon-nitrogen removal stages. The analysis allowed us to know the substrate competitions present within the reactor and to observe the relationship between the species.

## ÍNDICE

|                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS.....                                                  | xii  |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                  | xiii |
| NOMENCLATURA.....                                                      | xiv  |
| INTRODUCCIÓN .....                                                     | 1    |
| OBJETIVOS .....                                                        | 3    |
| CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....                                  | 5    |
| 1.1 Clasificación de los residuos .....                                | 5    |
| 1.1.1 Residuos sólidos urbanos .....                                   | 5    |
| 1.1.2 Residuos inorgánicos.....                                        | 5    |
| 1.1.3 Residuos Sólidos orgánicos.....                                  | 6    |
| 1.2 Residuos orgánicos como sustrato para la digestión anaerobia ..... | 6    |
| 1.3 Aguas residuales.....                                              | 7    |
| 1.3.1 Aguas residuales con alto contenido de nitrógeno.....            | 7    |
| 1.4 Ciclo del nitrógeno.....                                           | 9    |
| 1.4.1 Amonificación.....                                               | 10   |
| 1.4.2 Nitrificación .....                                              | 10   |
| 1.4.3 Desnitrificación.....                                            | 11   |
| 1.4.4 Anammox.....                                                     | 12   |
| 1.5 Procesos de remoción de nitrógeno .....                            | 12   |
| 1.5.1 Desnitrificación heterótrofa .....                               | 13   |
| 1.6 Digestión anaerobia .....                                          | 14   |
| 1.6.1 Hidrólisis .....                                                 | 16   |
| 1.6.2 Acidogénesis.....                                                | 16   |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| 1.6.3 Acetogénesis .....                                   | 17 |
| 1.6.4 Metanogénesis.....                                   | 17 |
| 1.6.5 Reactores anaerobios.....                            | 18 |
| 1.6.6 Reactores anaerobios híbridos .....                  | 19 |
| 1.6.7 Ventajas del tratamiento anaerobio .....             | 20 |
| 1.6.8 Factores operativos en la digestión anaerobia.....   | 20 |
| 1.7 Biogás .....                                           | 22 |
| 1.8 Inhibición en la digestión anaerobia .....             | 23 |
| 1.9 Biología molecular en la digestión anaerobia .....     | 24 |
| 1.10 Secuenciación de nueva generación (NGS).....          | 25 |
| 1.11 Secuenciación metagenómica shotgun.....               | 25 |
| 1.12 Secuenciación mediante Illumina .....                 | 26 |
| 1.13 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) .....       | 27 |
| 1.14 ARN ribosomal 16S .....                               | 29 |
| 1.15 Antecedentes de la investigación .....                | 30 |
| CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS .....                      | 36 |
| 2.1 Metodología.....                                       | 36 |
| 2.2 Acondicionamiento del RAH.....                         | 37 |
| 2.3 Recolección de RSO para la obtención de sustrato ..... | 39 |
| 2.4 Recolección de inóculo.....                            | 40 |
| 2.5 Etapas experimentales .....                            | 40 |
| 2.6 Determinaciones analíticas.....                        | 41 |
| 2.6.1 Potencial de hidrógeno (pH).....                     | 42 |
| 2.6.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO) .....               | 42 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.3 Sólido suspendidos totales y volátiles (SST y SSV).....                | 42 |
| 2.6.4 Alcalinidad.....                                                       | 43 |
| 2.6.5 Producción de biogás.....                                              | 44 |
| 2.7 Determinaciones de remoción de nitratos .....                            | 44 |
| 2.8 Análisis de la biopelícula .....                                         | 45 |
| 2.8.1 Materia Volátil Adherida (MVA) .....                                   | 45 |
| 2.8.2 Análisis de las poblaciones microbianas .....                          | 45 |
| 2.9 Evaluación de variables operativas y microbianas .....                   | 52 |
| CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                      | 54 |
| 3.1 Montaje del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH).....                         | 54 |
| 3.2 Caracterización del sustrato .....                                       | 56 |
| 3.3 Caracterización del inóculo.....                                         | 56 |
| 3.4 Operación y monitoreo del RAH .....                                      | 57 |
| 3.4.1 Monitoreo del potencial de hidrógeno .....                             | 57 |
| 3.4.2 Monitoreo de remoción de DQO total y soluble .....                     | 60 |
| 3.4.3 Monitoreo de remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles ..... | 62 |
| 3.4.4 Monitoreo de alcalinidad .....                                         | 63 |
| 3.4.5 Monitoreo de producción de biogás .....                                | 65 |
| 3.4.6 Determinaciones de remoción carbono-nitrógeno.....                     | 67 |
| 3.5 Biopelícula en el RAH.....                                               | 69 |
| 3.6 Extracción y cuantificación de ADN genómico .....                        | 71 |
| 3.6.1 Electroforesis de ADN genómico .....                                   | 71 |
| 3.7 Caracterización de la comunidad microbiana mediante shotgun .....        | 73 |
| 3.7.1 Dinámica poblacional del dominio <i>Archaea</i> .....                  | 78 |

|                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.7.2 Dinámica poblacional de dominio bacteria .....                                                                                                   | 73  |
| 3.7.3 Correlación de variables operativas y microbianas de la digestión anaerobia en el reactor anaerobio de biopelícula .....                         | 80  |
| CONCLUSIONES.....                                                                                                                                      | 93  |
| RECOMENDACIONES .....                                                                                                                                  | 96  |
| ANEXO A. Protocolo para la colecta y conservación de muestras destinadas a la extracción de ácidos nucleicos (BIOMOL-1 Conservación de muestras) ..... | 94  |
| ANEXO B. Protocolo para la extracción, purificación, visualización y cuantificación de ADN (BIOMOL-1.1 Lodos anaerobios granulares.....)               | 101 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                       | 124 |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> | <b>Descripción</b>                                                                                                       | <b>Página</b> |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1.1           | Tendencia de la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) y residuos sólidos orgánicos (RSO) anuales a nivel nacional | 6             |
| 1.2           | Microorganismos del ciclo del nitrógeno                                                                                  | 10            |
| 1.3           | Proceso de nitrificación-desnitrificación                                                                                | 13            |
| 1.4           | Esquema de las etapas, microorganismos, productos en la digestión anaerobia de la materia orgánica compleja.             | 15            |
| 1.5           | Metodología de la secuenciación shotgun                                                                                  | 26            |
| 1.6           | Fases de la reacción en cadena de la polimerasa                                                                          | 28            |
| 1.7           | Temperatura de las fases de la PCR                                                                                       | 28            |
| 2.1           | Metodología empleada en la presente investigación.                                                                       | 36            |
| 2.2           | Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)                                                                                          | 37            |
| 2.3           | Soportes empleados en el RAH                                                                                             | 38            |
| 2.4           | Obtención de la FL-RSO                                                                                                   | 40            |
| 2.5           | Muestras de biopelícula recolectadas al término de una etapa operativa                                                   | 46            |
| 2.6           | Muestras de biopelícula anaerobia conservadas en microtubos                                                              | 49            |
| 2.7           | Fotodocumentador Bio-RAD Gel DocTM EZ Imager                                                                             | 51            |
| 2.8           | Determinación de concentración y pureza de ADN                                                                           | 51            |
| 3.1           | Lecho fijo del RAH                                                                                                       | 54            |
| 3.2           | Lecho fluidizado inverso del RAH                                                                                         | 54            |
| 3.3           | Monitoreo de pH del afluente, efluente e interno en el arranque del RAH                                                  | 59            |
| 3.4           | Monitoreo de remoción de DQO total y soluble                                                                             | 61            |
| 3.5           | Monitoreo de remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles                                                         | 63            |
| 3.6           | Monitoreo de alcalinidad del RAH                                                                                         | 64            |
| 3.7           | Monitoreo de producción y rendimiento de biogás                                                                          | 67            |
| 3.8           | Monitoreo de remoción carbono-nitrógeno                                                                                  | 68            |
| 3.9           | Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de muestras del RAH                                                            | 71            |
| 3.10          | Abundancia relativa de bacterias en el lecho fijo del RAH                                                                | 74            |

| <b>Figura</b> | <b>Descripción</b>                                                                  | <b>Página</b> |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 3.11          | Abundancia relativa de bacterias por grupos tróficos en el lecho fijo del RAH       | 75            |
| 3.12          | Abundancia relativa de bacterias en el lecho fluidizado inverso del RAH             | 76            |
| 3.13          | Abundancia relativa de bacterias por grupos tróficos en el lecho fluidizado del RAH | 77            |
| 3.14          | Abundancia relativa de arqueas en el lecho fijo del RAH                             | 79            |
| 3.15          | Abundancia relativa de arqueas en el lecho fluidizado inverso del RAH               | 79            |
| 3.16          | Gráfica de sedimentación del ACP del LF                                             | 83            |
| 3.17          | Correlaciones de las variables operativas y microbianas en el LF                    | 85            |
| 3.18          | Gráfica de sedimentación del ACP del LFI                                            | 89            |
| 3.19          | Correlaciones de las variables operativas y microbianas en el LFI                   | 90            |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b> | <b>Descripción</b>                                                                                  | <b>Página</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1.1          | Aguas residuales industriales ricas en materia orgánica y nitrógeno                                 | 8             |
| 1.2          | Composición del biogás                                                                              | 22            |
| 1.3          | Comparación de las características del biogás frente al gas natural                                 | 23            |
| 1.4          | Características de diferentes secuenciadores de la plataforma Illumina                              | 27            |
|              | Evolución del estado del arte en el análisis de poblaciones                                         |               |
| 1.5a         | microbianas en el proceso de remoción de nitrógeno con adición de una fuente de carbono             | 33            |
|              | Continuación de la evolución del estado del arte en el análisis de                                  |               |
| 1.5b         | poblaciones microbianas en el proceso de remoción de nitrógeno con adición de una fuente de carbono | 34            |
| 2.1          | Etapas operativas del RAH                                                                           | 41            |
| 2.2          | Clasificación de la conservación de muestras de biomasa                                             | 48            |
| 3.1          | Dimensiones del lecho fijo (LF) del RAH                                                             | 55            |
| 3.2          | Dimensiones del lecho fluidizado inverso (LFI) del RAH                                              | 55            |
| 3.3          | Caracterización de la FL-RSO en comparación con otros autores                                       | 56            |
| 3.4          | Materia Volátil Adherida al Soporte                                                                 | 57            |
| 3.5          | Materia volátil Adherida al soporte en el LFI                                                       | 69            |
| 3.6          | Micrografías de la colonización del soporte fluidizado del RAH                                      | 70            |
| 3.7          | Concentración y pureza del ADN extraído                                                             | 72            |
| 3.8          | Variables fisicoquímicas del RAH para el ACP                                                        | 80            |
| 3.9          | Abundancia relativa de las especies microbianas del LF para el ACP                                  | 81            |
| 3.10         | Abundancia relativa de las especies microbianas del LFI para el ACP                                 | 82            |
| 3.11         | Varianza de los componentes en el ACP del LF                                                        | 84            |
| 3.12         | Peso de los componentes para cada variable en el LF                                                 | 86            |
| 3.13         | Varianza de los componentes en el ACP del LFI                                                       | 89            |
| 3.14         | Peso de los componentes para cada variable en el LFI                                                | 91            |

## NOMENCLATURA

| Abreviatura                    | Descripción                                        |
|--------------------------------|----------------------------------------------------|
| ADN                            | Ácido Desoxirribonucleico                          |
| ADNg                           | Ácido Desoxirribonucleico genómico                 |
| AI                             | Alcalinidad Intermedia                             |
| AP                             | Alcalinidad Parcial                                |
| AT                             | Alcalinidad Total                                  |
| Cva                            | Carga Volumétrica Aplicada                         |
| DA                             | Digestión Anaerobia                                |
| DQO <sub>s</sub>               | Demanda Química de Oxígeno Soluble                 |
| DQO <sub>T</sub>               | Demanda Química de Oxígeno Total                   |
| FL-RSO                         | Fracción Líquida de los Residuos Sólidos Orgánicos |
| LF                             | Lecho Fijo                                         |
| LFI                            | Lecho Fluidizado Inverso                           |
| MVA                            | Materia Volátil Adherida                           |
| N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Nitrógeno como nitratos                            |
| N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Nitrógeno como nitritos                            |
| NT                             | Nitrógeno Total                                    |
| PCR                            | Reacción en cadena de la polimerasa                |
| RAH                            | Reactor Anaerobio Híbrido                          |
| RSO                            | Residuos Sólidos Orgánicos                         |
| NGS                            | Secuenciación de Próxima Generación                |
| SST                            | Sólidos Suspendidos Totales                        |
| SSV                            | Sólidos Suspendidos Volátiles                      |
| TRH                            | Tiempo de Residencia Hidráulico                    |

## INTRODUCCIÓN

En México se generan poco más de 44.6 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos al año, de las cuales alrededor del 51.6 % pertenecen a Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) (SEMARNAT, 2019). En casi todas las regiones del mundo la acumulación de residuos sólidos está alcanzando niveles críticos. Una problemática medio ambiental surge al disponer inadecuadamente estos residuos, ya que sus lixiviados y emisiones de gases provocan desequilibrio físico, químico y microbiológico en suelos, aire y cuerpos de agua. Debido a lo anterior, deben gestionarse de manera sostenible para mantener un equilibrio general en el ecosistema y evitar así el agotamiento de los recursos naturales, reducir las cargas ambientales y reducir el riesgo para la salud (Khalid *et al.*, 2011).

Por otro lado, dentro de los sistemas acuáticos, el exceso de nitrógeno de aguas residuales sin tratamiento tales como las porcinas (600-2100 mgNT/L), las domésticas (50-89 mgNT/L) y las de la industria del queso (897-1200 mgNT/L) pueden causar hipoxia, eutrofización y disminución de la diversidad acuática, pudiendo afectar incluso la salud humana debido a esto es fundamental la remoción de especies de nitrógeno antes de su disposición final, siendo una alternativa la desnitrificación heterótrofa (Roeckel-von-Bennewitz, 2017).

Para llevar a cabo la desnitrificación heterótrofa, es necesario emplear y evaluar una fuente rica en carbono orgánico como la fracción líquida de los RSO con la adición de una fuente de nitratos como el  $\text{NaNO}_3$ , en donde la materia orgánica actuará como donador de electrones y las especies oxidadas de nitrógeno como aceptores finales de electrones. La eliminación biológica del nitrógeno en forma de nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ ) es una opción atractiva para la remoción de nitrógeno en presencia de materia orgánica. Dicho proceso de eliminación combinada carbono-nitrógeno se lleva a cabo bajo condiciones anaerobias, siendo una alternativa viable para la reducción de la carga

orgánica y la recuperación de energía verde a través de la producción de biogás rico en metano.

Los tratamientos biológicos juegan un papel fundamental en el aprovechamiento de residuos orgánicos en estos días. Entre ellos, la Digestión Anaerobia (DA) se considera una excelente opción para dar tratamiento biológico a este tipo de fuentes de carbono y al mismo tiempo disminuir las concentraciones de nitrógeno para minimizar los impactos ambientales provocados por este nutriente obteniendo como principales productos de dicha remoción: biogás, el cual es un bioenergético capaz de generar energía y sustituir a los combustible fósiles y nitrógeno gaseoso con la principal característica de ser un gas inerte.

Dentro del proceso de DA la dinámica de poblaciones microbianas se ve afectada debido a la competencia por la fuente de carbono entre los dominios *Bacteria* (específicamente bacterias desnitrificantes) y *Archaea*, provocando un bajo rendimiento de metano. Debido a esto, el presente trabajo tiene por objeto realizar el estudio de las poblaciones microbianas que intervienen en la remoción combinada de carbono-nitrógeno dentro de un reactor anaerobio de biopelícula a nivel laboratorio. Se llevará a cabo el estudio de la dinámica de poblaciones microbianas involucradas en la remoción combinada, empleando como fuente de carbono un sustrato a base de residuos sólidos orgánicos y como fuente de nitrógeno, nitrato de sodio. A través del incremento de la concentración de nitrógeno en el sustrato, los rendimientos de metano se verán afectados por la competencia de carbono entre las poblaciones microbianas que están involucradas en el proceso de digestión anaerobia.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar las poblaciones microbianas que intervienen en la remoción combinada de carbono y nitrógeno dentro de un reactor anaerobio de biopelícula para producir biogás.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Operar y estabilizar un reactor anaerobio empleando como fuente de carbono un sustrato a base de residuos sólidos orgánicos.
2. Suministrar una fuente de nitrógeno para llevar a cabo la remoción combinada carbono-nitrógeno.
3. Analizar la composición de las poblaciones microbianas metanogénicas y desnitrificantes que interviene en la remoción combinada.
4. Evaluar las variables operativas y microbianas para interpretar el desempeño del reactor anaerobio de biopelícula.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## **CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **1.1 Clasificación de los residuos**

De acuerdo a lo establecido en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos se define como residuo a cualquier producto o material el cual su propietario desecha, pudiéndose encontrar en estado líquido, sólido, semisólido o gas en depósitos, los cuales puede ser susceptibles de ser valorizados o requieren sujetarse a tratamiento o disposición final conforme lo establecido en dicha Ley (SEMARNAT, 2019).

#### **1.1.1 Residuos sólidos urbanos**

Los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) son aquellos producidos en las viviendas, como producto de la eliminación de los materiales que se emplean en actividades domésticas y de los productos que se consumen como sus envases o empaques. Así mismo aquellos residuos que provengan de cualquier otra actividad como la limpieza de la vías y lugares públicos o de cualquier establecimiento que genere residuos con características domiciliarias serán considerados como RSU, siempre que no sean considerados de otra índole por esta Ley (SEMARNAT, 2019). Estos residuos se pueden subclasificar en inorgánicos y orgánicos.

#### **1.1.2 Residuos inorgánicos**

Los residuos inorgánicos son provenientes de los recursos naturales no vivos o inertes como algunos minerales o el petróleo. Gran parte de éstos pueden volver a utilizarse como materia prima, algunos ejemplos de estos son: plásticos, vidrio y materiales de construcción. La naturaleza puede tardar varios años en degradar este tipo residuos. (Hernández-Castelán, 2017).

### 1.1.3 Residuos Sólidos orgánicos

Se categoriza como residuo sólido orgánico a todo aquel material proveniente de diversas especies de fauna o flora y que es propenso a la degradación por microorganismos, o bien consiste en restos o productos de desecho de cualquier organismo (CCA, 2017). Los residuos sólidos orgánicos conforman poco más del 38 % del total de residuos sólidos urbanos que se generan en México (SEMARNAT, 2019). En la Figura 1.1 se puede apreciar la generación de residuos sólidos urbanos en relación con los residuos sólidos orgánicos anuales durante diez años.

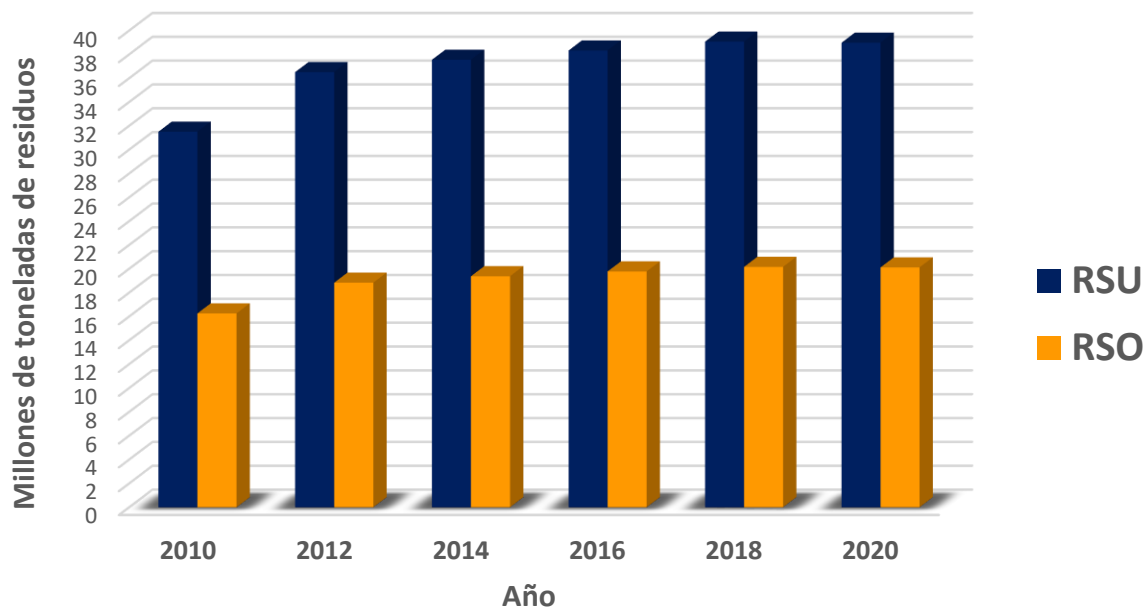


Figura 1.1 Tendencia de la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) y residuos sólidos orgánicos (RSO) anuales a nivel nacional (INEGI,2022)

### 1.2 Residuos orgánicos como sustrato para la digestión anaerobia

Los residuos orgánicos ofrecen importantes beneficios ambientales y económicos al ser empleados en la digestión anaerobia incluyendo la producción de biogás con 50–80 % de metano v/v, retención de gases de efecto invernadero, reducción de espacio

requerido para su disposición final, eliminación de microorganismos patógenos, reducción de olores y atracción de vectores (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017).

Los compuestos principales en los residuos de frutas son polisacáridos y celulosa, estos al ser ricos en carbono se convierten en azúcares reductores y ácidos grasos volátiles (AGV). Al ser tratados en condiciones anaerobias aproximadamente el 43 % de la demanda química de oxígeno total (DQO<sub>T</sub>) es convertida en DQO soluble durante la fermentación acidogénica de residuos de frutas y verduras. La materia orgánica en la fase líquida está completamente compuesta por AGV, lactato y alcohol etílico, sirviendo como un excelente sustituto para la eliminación de nutrientes biológicos (Zhu *et al.*, 2021).

### **1.3 Aguas residuales**

La contaminación del agua está relacionada con la presencia de factores biológicos, químicos y/o físicos que traen como consecuencia el deterioro de un cuerpo de agua. Para determinar el nivel de contaminación para deteriorar un cuerpo de agua influyen varios aspectos como la ubicación, el tipo, así como los usos que se le puede dar. Entre las causas principales de contaminación de las aguas se encuentran: los vertidos de aguas residuales urbanas, vertido de explotaciones ganaderas, vertido de aguas residuales agrícolas y vertidos industriales. El agua contaminada puede ser tratada a distintos niveles de pureza, sin embargo, entre mayor sea la pureza el costo operativo será mayor, por lo que es fundamental encontrar tratamientos de remoción de contaminantes que sea económicamente rentables (Bucci, 2021).

#### **1.3.1 Aguas residuales con alto contenido de nitrógeno**

Diversas actividades industriales generan aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica expresada como demanda química de oxígeno (DQO) y/o aguas residuales ricas en nitrógeno como los efluentes que se muestran en la Tabla 1.1. En

el agua residual, el nitrógeno puede estar presente en múltiples formas como amoníaco, nitratos y nitritos, y son numerosas las transformaciones que puede sufrir en los diferentes procesos de tratamiento (Roeckel-von-Bennwitz, 2017).

El nitrato emitido por los procesos industriales se considera en la actualidad uno de los contaminantes de aguas residuales más frecuentes del mundo, debido a esto el tratamiento para la eliminación de este compuesto se reconoce como un gran desafío. La acumulación de nitrato y fosfatos en las aguas residuales pueden provocar daños graves en los ecosistemas acuáticos pues la proliferación de cianobacterias y algas que limitan el oxígeno disuelto de grandes volúmenes de aguas lo que provoca las llamadas zonas muertas en muchas de las principales masas de agua del mundo (Lehnert *et al.*, 2021). Además, el consumo de agua contaminada puede afectar a la salud humana, pudiendo provocar enfermedades reproductivas, metahemoglobinemia y cáncer. Debido a esto, la normativa medio ambiental establece valores máximos permitidos para su descarga.

Tabla 1.1 Aguas residuales industriales ricas en materia orgánica y nitrógeno (Roeckel-von-Bennwitz, 2017)

| <b>Aguas residuales</b> | <b>DQO<br/>(mg/L)</b> | <b>NT<br/>(mg/L)</b> |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| Industria cervecera     | 5 000 – 6 300         | 30 - 37              |
| Porcinas                | 3 000 – 15 000        | 600 – 2 100          |
| Suero de queso          | 73 000 – 86 000       | 897 – 1 200          |
| Domesticas              | 160 - 320             | 50 - 89              |
| Alzamara                | 40 300 ± 1 000        | 240 ± 50             |

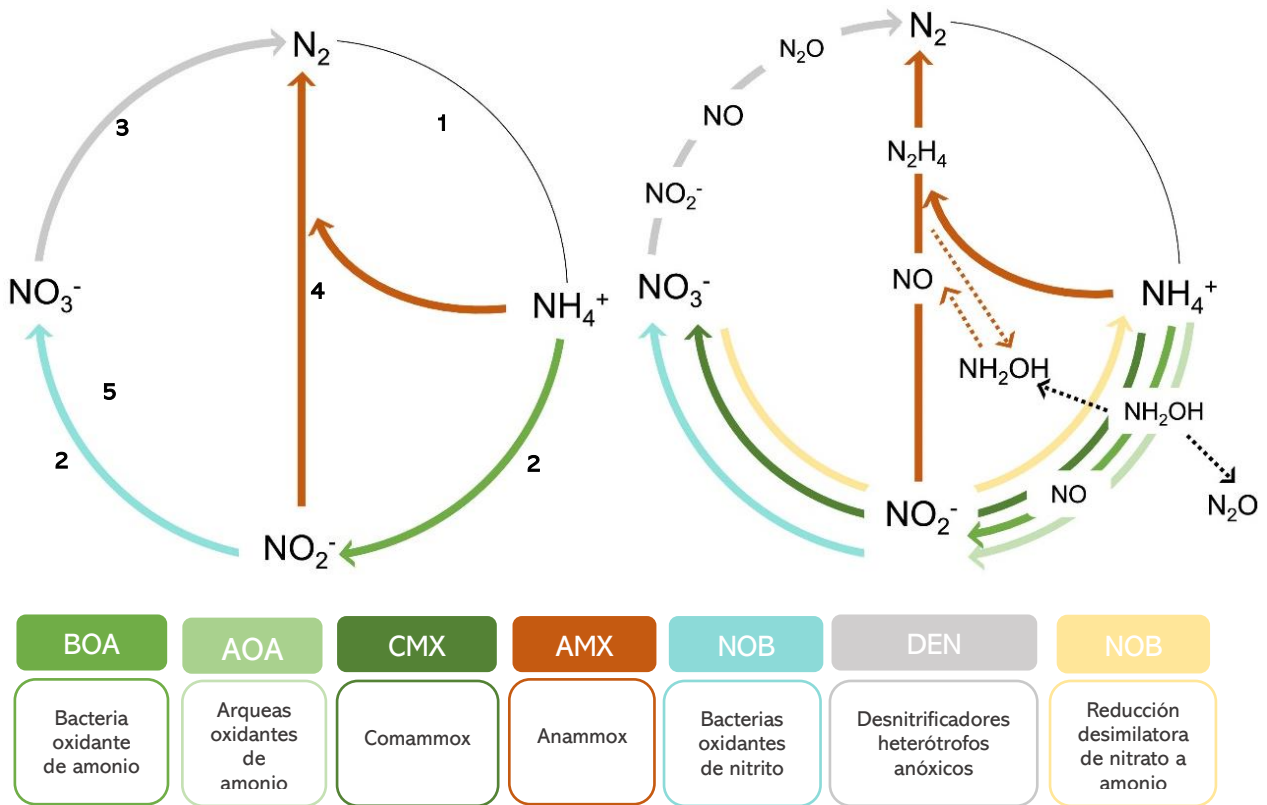
### 1.4 Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes en la tierra al ser uno de los elementos esenciales para los organismos vivos comprendiendo la mayor parte de la atmosfera terrestre, siendo el cuarto elemento más abundante en la biomasa celular. El nitrógeno es abundante en la atmosfera en forma gaseosa, sin embargo, en esta forma las plantas no pueden absorberlo de manera fácil, para que esto suceda el nitrógeno debe fijarse, es decir convertirse en amoniaco para que se encuentre biodisponible.

La intervención del hombre ha generado un flujo antropogénico de nitrógeno en la tierra, lo que ha dificultado el equilibrio natural, algunos problemas provocados por este hecho son la eutrofización de aguas así como la formación de zonas hipóxicas y el aumento de emisiones de óxido nitroso, un gas de efecto invernadero, debido a esto es fundamental comprender los flujos de nitrógeno antropogénicos y naturales así como los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno para prevenir problemas ambientales (Soler-Jofra *et al.*, 2021; Xia *et al.*, 2018).

El ciclo de nitrógeno está constituido por cinco conversiones las cuales se pueden apreciar en la Figura 1.2 la primera conversión es la amonificación la cual incluye la fijación de nitrógeno y la reducción disimilatoria de nitrato a amonio, la segunda conversión es la nitrificación, la tercera es la desnitrificación, la cuarta es anammox como un sistema acoplado de nitrificación y desnitrificación y la quinta y última es la interconversión nitrito-nitrato (Stein y Klotz, 2016).

Los microorganismos involucrados en las conversiones se pueden apreciar en la Figura 1.2 a continuación, se describen las conversiones, así como el tipo de microorganismo involucrado.

Figura 1.2 Microorganismos del ciclo del nitrógeno (Soler-Jofra *et al.*, 2021)

### 1.4.1 Amonificación

La amonificación se puede lograr mediante dos procesos: la fijación de nitrógeno y la reducción disimilatoria de nitrato. La fijación de nitrógeno consiste en la reducción de nitrógeno gaseoso a amonio mediante bacterias y arqueas que tienen la capacidad de codificar los complejos enzimáticos. La reducción disimilatoria de nitrato a amonio se lleva a cabo mediante bacterias y hongos (Soler-Jofra *et al.*, 2021; Stein y Klotz, 2016).

### 1.4.2 Nitrificación

La nitrificación involucra tres tipos de microorganismos: los oxidantes de amonio, los oxidantes de nitrito y los oxidantes de amonio.

**Bacterias oxidantes de amonio (BOA):** Las BOA transforman el amonio a nitrito empleando al oxígeno como aceptor de electrones. Estos microorganismos incluyen

miembros aerobios quimiolitotróficos de *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Thaumarchaeota*, de igual forma hay microorganismos metanotróficos y heterótrofos que son capaces oxidar el amonio a nitrito pero la energía para apoyar el crecimiento no proviene de estos (Stein y Klotz, 2016).

**Bacterias oxidantes de amonio completo (Comammox):** Las bacterias commammox son capaces de efectuar la oxidación completa de amonio a nitrato, oxidando primero el amonio a nitrito y luego a nitrato. Estos microorganismos son quimiolitotróficos es decir emplean el amonio como su única fuente de energía para el crecimiento celular, estas son representantes del segundo linaje del género *Nitrospira* (Stein y Klotz, 2016).

**Bacterias oxidantes de nitrito (BON):** Estas bacterias al igual que las Comammox son quimiolitotróficos, sin embargo, estas emplean el nitrito como su fuente de energía y se clasifican dentro de algunas clases de Proteobacteria y el filo Nitrospirae (Stein y Klotz, 2016). Las BON son las encargadas de catalizar el segundo paso de la nitrificación, es decir la conversión de nitrito a nitrato empleando como aceptor de electrones al oxígeno, este proceso es catalizado mediante la enzima nitrito oxidorreductasa (Soler-Jofra *et al.*, 2021).

### 1.4.3 Desnitrificación

La desnitrificación describe el proceso de conversión anaerobia de nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso a nitrógeno gaseoso (Stein y Klotz, 2016). En las reacciones de desnitrificación están involucrados una gran variedad de microorganismos, debido a que gran parte de especies de microorganismos desnitrificantes son facultativas, es decir con la capacidad de utilizar nitrato, nitrito u oxígeno como aceptor final de electrones (Claros-Bedoya, 2012).

#### 1.4.4 Anammox

La ruta anammox permite la conversión anóxica del amonio, las bacterias anaerobias oxidantes de amonio son las encargadas de esta conversión siendo capaces de transformar tanto el amonio como el nitrito en nitrógeno gaseoso de forma autotrófica y en ausencia de oxígeno. La obtención de la energía celular es realizada por la bacteria *Brocadiaceae* en el orden *Planctomycetales* en el orgánulo *anammoxoma* (Stein y Klotz, 2016).

#### 1.5 Procesos de remoción de nitrógeno

Existen diversas alternativas para la remoción de especies de nitrógeno, dentro de estas se puede apreciar dos categorías. Los procesos biológicos y los procesos fisicoquímicos. A pesar de que los fisicoquímicos tienen un gran porcentaje de efectividad, suelen ser costosos y requerir un mayor consumo de energía que el proceso biológico (Roeckel-von-Bennwitz, 2017).

A lo largo del tiempo el proceso biológico convencional para la remoción de especies de nitrógeno ha sido el proceso combinado nitrificación/desnitrificación, el cual es utilizado para el tratamiento de aguas residuales ricas en amonio. Este proceso consta de dos pasos, el primero es la nitrificación dentro de la cual existen dos reacciones la primera es la nitratación, en donde el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es oxidado a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por bacterias amonio oxidantes (BAO), la segunda es la nitratación en donde el nitrito obtenido en el paso anterior se oxida a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por bacterias oxidantes de nitrito (BON) empleando oxígeno como aceptor de electrones (Zhao *et al.*, 2018).

En el proceso de desnitrificación las bacterias heterotróficas (BH) convierten el nitrato a nitrógeno gaseoso bajo condiciones anaerobias o anóxicas, pasando por tres compuestos intermedios: nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nitroso (NO) y óxido nítrico ( $\text{N}_2\text{O}$ ), para

así finalmente, y en presencia de materia orgánica producir nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Jaramillo-Montoya, 2018). En la Figura 1.3 se presenta un esquema de este proceso.

Como se puede observar, se requiere de una nitrificación en condiciones aerobias para poder continuar con la etapa de desnitrificación, esto debido a la naturaleza de las especies de nitrógeno contenidas en las aguas residuales, las cuales contienen en mayor proporción nitrógeno amoniacal. Sin embargo, si existe una mayor proporción de nitratos en la muestra a tratar, el proceso de remoción adecuado será la desnitrificación, pues la conversión a nitrógeno gaseoso inicia en esta forma de nitrógeno.

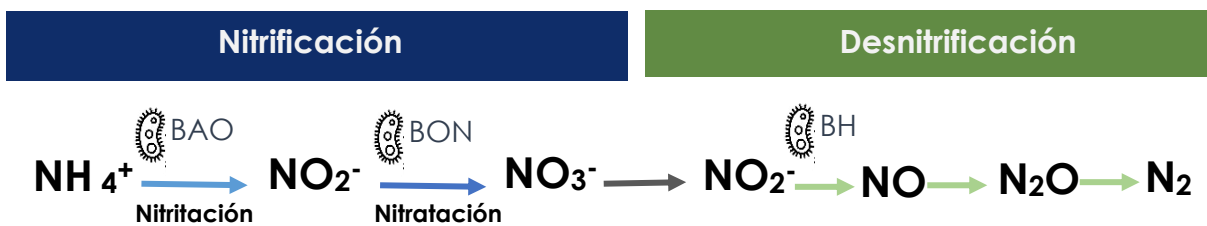


Figura 1.3 Proceso de nitrificación-desnitrificación

### 1.5.1 Desnitrificación heterótrofa

La desnitrificación se fundamenta en la reducción de nitrato, nitrito, óxido nitroso, óxido nítrico para obtener finalmente nitrógeno gaseoso. Este proceso requiere de carbono orgánico que funja como donador de electrones, siendo los aceptores finales en la cadena de transporte de electrones las especies oxidadas de nitrógeno (Carballo-Costa, 2016).

El rendimiento de la desnitrificación está vinculado íntimamente con la relación C/N (gDQO/gN), es decir, la relación existente entre la concentración de materia orgánica biodegradable y nitrógeno en el afluente (Carballo-Costa, 2016). Es necesaria la adición de una fuente externa de materia orgánica si la relación C:N es inferior a 2.5

es mientras que la tasa de desnitrificación aumenta en un factor de 1.5 a 1.7 con una relación C:N superior a 4 (Helmer-Madhok *et al.*, 2002). Existen diversas fuentes de carbono las cuales se pueden emplear como sustrato en el proceso de desnitrificación heterótrofa incluyendo los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales tanto urbanas como industriales, así como compuestos que se puedan adicionar durante la etapa anóxica como, el ácido acético ( $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ), etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) y metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) por mencionar algunos. La elección de la fuente de carbono estará relacionada principalmente a la disponibilidad local, así como al bajo costo.

En las reacciones de desnitrificación existe una amplia variedad de microorganismos involucrados, esto debido a que gran parte de las especies de organismos desnitrificantes son facultativas, lo que conduce a la posibilidad de emplear como aceptor final de electrones oxígeno, nitrato o nitrito (Claros-Bedoya, 2012). Los grupos de bacterias que forman parte de la desnitrificación se conforman esencialmente de los géneros: *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Lactobaccillus*, *Pseudomonas* y *Spirillum* así como organismos del dominio Arquea (Metcalf y Eddy, 1995; Thorndycroft *et al.*, 2007). La desnitrificación es catalizada por cuatro diferentes tipos de enzimas, las nitrógeno reductasas en secuencia: nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos).

## 1.6 Digestión anaerobia

La Digestión Anaerobia (DA) es el proceso de degradación biológica de sustratos orgánicos en ausencia de oxígeno, es un proceso en etapas en el que cada grupo microbiano está relacionado tróficamente debido a que en cada etapa se emplea como sustrato los productos generados en la etapa anterior, esto gracias al metabolismo de los microorganismos. En la Figura 1.4 se muestra el esquema general del proceso.

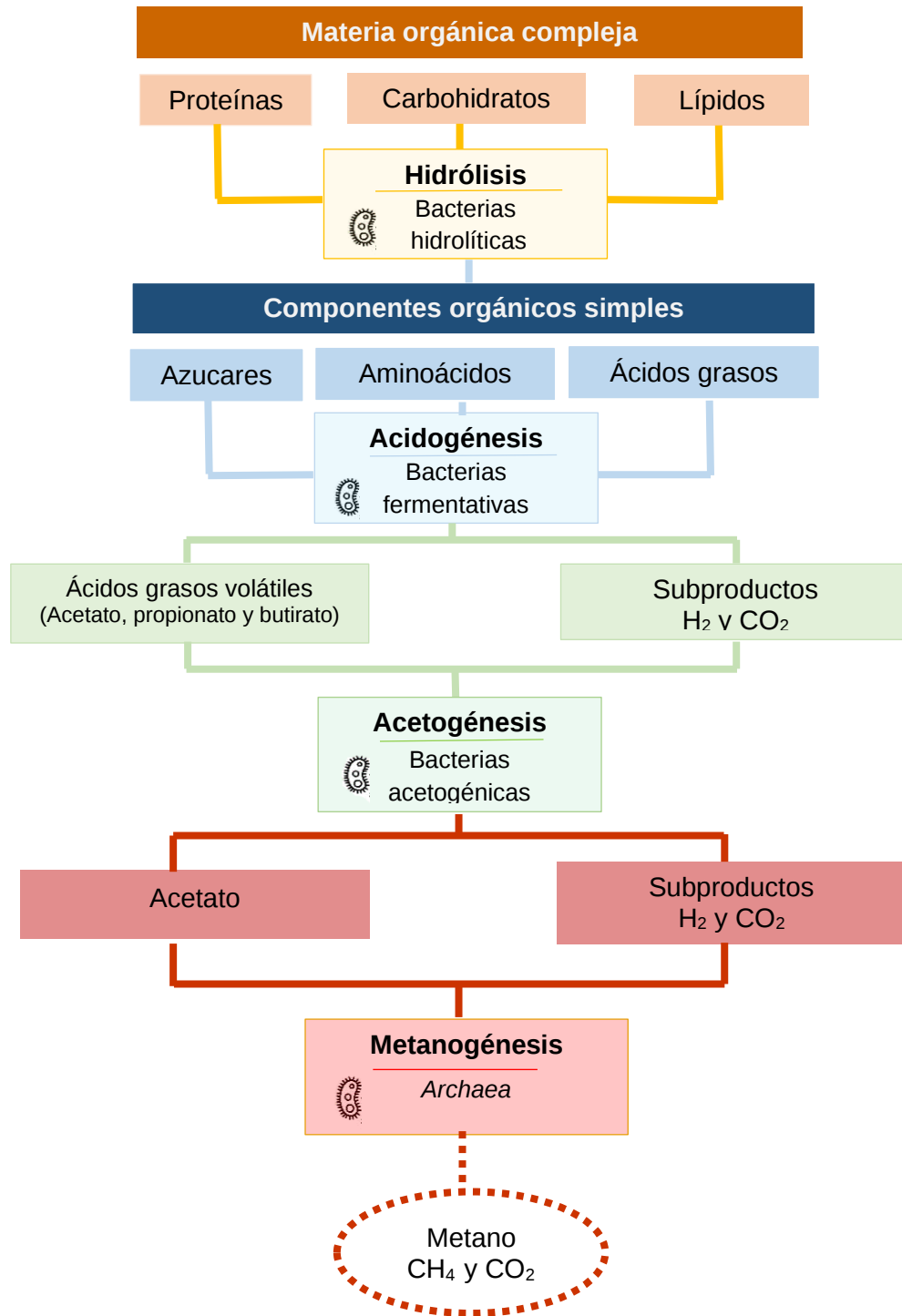


Figura 1.4 Esquema de las etapas, microorganismos, productos en la digestión anaerobia de la materia orgánica compleja

Uno de los principales productos de este proceso es el biogás, el cual está compuesto de una mezcla gaseosa que contiene principalmente metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) generados a través de la degradación de Ácidos Grasos Volátiles (AGV's). Un proceso de DA bien equilibrado ocurre cuando todos los productos obtenidos en una etapa metabólica se convierten en la siguiente etapa sin acumulación de productos intermedios, lo que resulta en una descomposición completa de la materia orgánica en productos finales de interés (Zhang *et al.*, 2017).

### **1.6.1 Hidrólisis**

Es la primera etapa y consiste en la degradación de compuestos orgánicos complejos de alto peso molecular como carbohidratos, lípidos o grasas y proteínas en moléculas más sencillas, las cuales son solubles y rápidamente sus enlaces químicos se rompen, estas pueden utilizarse como fuente de carbono y energía para las células de los microorganismos. Dentro de esta etapa los lípidos se descomponen en ácidos grasos de cadena larga como ácido oleico o palmítico, las proteínas en aminoácidos y los carbohidratos en azúcares (Sáez-Rico, 2017; Shao, 2015).

Este proceso de conversión está dado por la actividad de microorganismos hidrolíticos como *Clostridia*, *Micrococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Selemomonas*, *Streptococcus* estos actúan sobre las macromoléculas orgánicas despolimerizándolas enzimáticamente en sus correspondientes monómeros, estas requieren la producción de exo-enzimas (celulasa, celobiasa, xilanasas, amilasa, proteasa, lipasa) excretadas por bacterias fermentativas (Náthia-Neves *et al.*, 2018).

### **1.6.2 Acidogénesis**

En la etapa de la acidogénesis los compuestos solubles como los azúcares, ácidos grasos de cadena larga y aminoácidos obtenidos en la hidrólisis son fermentados por la acción de microorganismos fermentadores acidogénicos como los *Streptococcus*,

*Lacto bacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* hasta la generación de dióxido de carbono, hidrogeno gaseoso, alcoholes, ácidos grasos volátiles ( acetato, butirato, propionato, valerato) siendo el ácido más importante el acetato debido a que es usado como sustrato por las bacterias metanogénicas, también se generan pequeñas cantidades de compuestos orgánicos de nitrógeno y azufre debido a la degradación de aminoácidos y proteínas. (Náthia-Neves *et al.*, 2018).

### **1.6.3 Acetogénesis**

La fermentación de compuestos orgánicos solubles no es la única ruta para la producción de acetato, este se puede generar en la acetogénesis en dónde los ácidos grasos volátiles y alcoholes como el butirato y el etanol, producidos en la etapa anterior pueden ser degradados a través de las bacterias acetogénicas en hidrógeno y acetato el cual puede emplearse como sustrato de las bacterias metanogénicas (Shao, 2015).

### **1.6.4 Metanogénesis**

La última etapa del proceso de DA se llama metanogénesis en donde se lleva a cabo la remoción de materia orgánica y la recuperación de energía en forma de biogás rico en metano el cual se forma principalmente de acetato,  $H_2$  y  $CO_2$ , también se puede formar de algunos compuestos orgánicos aparte del acetato, debido a esto, todos los productos fermentados deben ser convertidos a compuestos que directamente o indirectamente puedan usarse por las bacterias metanogénicas.

La velocidad activa de bacterias metanogénicas y acidogénicas es aproximadamente la misma si la actividad metabólica de la metanogénesis se mantiene, si esto sucede los ácidos se rompen y el medio se alcaliniza debido a la formación de amoniaco y de los grupos amino los cuales provienen de los aminoácidos y las proteínas. El amoniaco que es liberado reacciona con el  $CO_2$ , y agua produciendo carbonato de amonio que

proporciona la alcalinidad en el sistema, el cual se encuentra disponible para reaccionar con los ácidos grasos volátiles que están presentes.

En esta fase, el dominio *Archaea* promueve la descomposición de los compuestos orgánicos derivados de la fase acetogénica. Son microorganismos anaerobios estrictos obligados los responsables de la producción de metano. Este dominio se divide en dos grupos principales: hidrogenotróficas, las cuales utilizan dióxido de carbono e hidrogeno para producir metano y las acetoclásticas, que degradan ácido acético o metanol para producir metano, siendo esta es la vía principal de producción pues aproximadamente el 70 % del metano es generado por esta vía. Este es un proceso lento y constituye la etapa limitante del proceso de degradación anaerobia (Náthia-Neves *et al.*, 2018).

#### **1.6.5 Reactores anaerobios**

Los requisitos básicos del diseño de un reactor anaerobio son: permitir una carga orgánica aplicada continuamente alta y sostenible, un tiempo de retención hidráulica corto esto para minimizar el volumen del reactor y producir el volumen máximo de metano. Hay varios tipos de reactores en uso hoy en día, y el diseño está relacionado con el material a digerir. Hay tres grupos principales, el primero de ellos son los reactores discontinuos y 0 son los más simples. Estos se llenan con la materia prima y se dejan durante un período que se puede considerar como el tiempo de retención hidráulica, después del cual se vacían. El segundo tipo son los sistemas de alimentación continua de una etapa, en los que todas las reacciones bioquímicas tienen lugar en un reactor y, por último, los sistemas de alimentación continua de dos etapas (o incluso de varias etapas) en los que los procesos de hidrólisis/acidificación y la acetogénesis /metanogénesis están separados (Kiyasudeen *et al.*, 2016).

Los reactores de residuos sólidos se dividen en húmedos y secos. Los reactores húmedos son aquellos con un valor igual o menor de sólidos totales de 16 % , mientras

que los reactores secos tienen entre 22-40 % de sólidos totales, aquellos que se encuentran entre húmedos y secos se consideran semisecos. La DA seca se usa típicamente para tratar materia orgánica con alto contenido de sólidos, el tratamiento de la fracción orgánica como los residuos sólidos municipales y los residuos agrícolas con rendimientos de metano que oscilan entre 0.2 y 0.6 m<sup>3</sup>/kg de sólidos volátiles según la materia prima y la configuración (Rocamora *et al.*, 2020).

### **1.6.6 Reactores anaerobios híbridos**

Los reactores híbridos tienen la característica de permitir la combinación y adaptación de dos reactores en uno mismo equipo permitiendo combinar la biomasa adherida con la biomasa en suspensión por lo que ajustando el diseño adecuadamente las ventajas de ambos reactores se puede combinar. Una clase de reactor híbrido es la que consta de lecho fijo (LF) y un lecho fluidizado inverso (LFI), ambas dispuestas en una misma unidad (Cruz-Ramos, 2019).

Configurar el reactor de esta forma permite tratar altos contenidos de carga orgánica presentes en diversos efluentes. El lecho fijo tiene como principales beneficios lograr una mejor distribución del flujo, así como retener una mayor cantidad de sólidos, generando así una biopelícula resistente tanto en el lecho fijo como en el lecho fluidizado inverso. El lecho fluidizado inverso es una tecnología que permite la fluidización debido a la introducción de líquido por la parte superior, la circulación descendente del líquido provoca la expansión del lecho. El LFI presenta una alta eficiencia de remoción la cual depende de las condiciones hidrodinámicas del mezclado, siendo capaz de retener una gran cantidad de biomasa en el soporte (Rosas-Mendoza, 2018).

Los soportes empleados en estos sistemas pueden ser sintéticos como el polietileno o el poliestireno, así como naturales como la arcilla y el carbón, estos pueden encontrarse fijos o en suspensión. Estos sistemas híbridos son especialmente

utilizados para el tratamiento de aguas residuales que presentan una alta carga de materia orgánica y de contaminantes nitrogenados (González-García, 2016).

#### **1.6.7 Ventajas del tratamiento anaerobio**

Algunas ventajas que presenta el tratamiento anaerobio frente al aerobio se mencionan a continuación:

1. Se genera menos biomasa por unidad de reducción de sustrato (20-150 kg biomasa/kg DQO). Así mismo el requerimiento de nutrientes (nitrógeno y fósforo) es menor.
2. Debido a que no requiere aireación, se produce ahorro de consumo energético.
3. Es posible operar con cargas orgánicas altas, superiores a la de procesos aerobios.
4. En los procesos anaerobio la producción de metano se considera una ventaja debido a su valor como combustible. Una parte sustancial del requerimiento energético en los procesos anaerobios puede obtenerse de los gases emitidos (Rosas-Mendoza, 2018).

#### **1.6.8 Factores operativos en la digestión anaerobia**

La velocidad limitante de reacción en la digestión anaerobia normalmente es la conversión de ácidos grasos volátiles a metano. Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y son sumamente sensible a variaciones de pH, alcalinidad y temperatura, debido a esto las condiciones operativas del reactor deben monitorearse periódicamente y ser mantenidas en los intervalos óptimos.

**Temperatura:** Gran parte de las bacterias metanogénicas están activas en dos intervalos de temperatura que son los mesofílicos que va de 30 a 35 °C, siendo 32 °C

la temperatura mínima para los organismos mesofílicos y el termofílico que va de 50 a 60 °C. A temperaturas entre los 40 °C y 50 °C estas bacterias son inhibidas.

**Alcalinidad:** Es esencial para el control apropiado del pH, esta sirve como efecto buffer pues previene el cambio repentino en el pH.

**pH:** Una degradación óptima de sustratos orgánicos en ambientes anaerobios ocurre a valores de pH neutros. Cuando el pH del medio es superior a 8.5, la actividad de las bacterias metanogénicas se ve influida negativamente. La mayoría de las bacterias desarrollan un buen metabolismo a pH de 6.8 y 7.2.

**Agitación:** Es fundamental pues mejora el contacto y la transferencia de sustrato a cada población microbiana.

**Tiempo de Retención Hidráulico (TRH):** Los sistemas anaerobios son diseñados para mantener el residuo por un determinado tiempo. El tiempo que el residuo o el influente debe permanecer dentro del reactor, sometido a la acción de los microorganismos se le conoce como TRH. Este parámetro de control es importante debido a que determina la cantidad de tiempo disponible para el crecimiento bacteriano y posterior a esto la conversión de la materia orgánica a gas (González-García, 2016).

**Carga Volumétrica Aplicada (Cva):** Se refiere a la proporción de materia orgánica que es suministrada por unidad de volumen y tiempo. Este parámetro tiene una relación inversa con el TRH, debido a que al aumentar la carga volumétrica el tiempo de retención disminuye, es decir son inversamente proporcionales. El TRH, así como la Cva son determinados por las características del sustrato. La Cva, así como TRH se consideran los principales parámetros de diseño (González-García, 2016).

**Relación C/N:** Es la relación entre la cantidad de carbono y nitrógeno contenida en la materia orgánica. Si esta relación es alta, la metanogénesis consume rápidamente el

nitrógeno, lo que resulta en un bajo rendimiento de gas, pero si la relación es baja, se produce una acumulación de amoníaco.

## 1.7 Biogás

El biogás es una mezcla de gases producto de la Digestión Anaerobia (DA) compuesto principalmente de metano  $\text{CH}_4$  el cual aporta la energía al biogás, los gases así como sus proporciones se observan en la Tabla 1.2. Se puede clasificar como combustibles de fuentes renovables debido a que puede ser obtenido a partir de residuos orgánicos con alta demanda química de oxígeno. Se puede emplear directamente para la producción de electricidad, vapor, productos químicos y como combustible para vehículos, siendo un medio prometedor para contribuir a las necesidades de energía mundiales, pues no solo proporciona beneficios naturales sino puede ser un método viable para la generación de energía continua (Villaraldo Falfán, 2018).

Tabla 1.2 Composición del biogás (Deng *et al.*, 2020)

| Componente           | Formula              | Volumen (%) |
|----------------------|----------------------|-------------|
| Metano               | $\text{CH}_4$        | 50-75       |
| Dioxido de carbono   | $\text{CO}_2$        | 25-50       |
| Nitrógeno            | $\text{N}_2$         | 0.4         |
| Oxígeno              | $\text{O}_2$         | 0.3         |
| Sulfuro de hidrógeno | $\text{H}_2\text{S}$ | 0.03-0.5    |
| Hidrógeno            | $\text{H}_2$         | 2-7         |

De acuerdo con la Secretaria de Energía en México el biogás es un bioenergético capaz de generar energía y sustituir a los combustible fósiles, se considera que tiene un potencial de 3000 MW para la generación de energía eléctrica a partir del aprovechamiento y recuperación del metano contenido en el biogás, siendo este un producto de la degradación de residuos sólidos urbanos, residuos de animales y aguas

residuales. Los principales usos del biogás en México de acuerdo con su poder calorífico de 23 MJ/kg, están relacionadas con la generación de calor y electricidad. En comparación con el valor calorífico del gas natural el biogás es menor debido a sus impurezas, en la Tabla 1.3 se muestra una comparación entre diversas características entre ambos combustibles.

Tabla 1.3 Comparación de las características del biogás frente al gas natural (Hosseini y Wahid, 2015)

| Parámetro                         | Unidad                                        | Gas natural | Biogás: 60 %                                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------------|
|                                   |                                               |             | CH <sub>4</sub> , 38 % CO <sub>2</sub> , 2 % impurezas |
| Valor calórico                    | MJ/m <sup>3</sup>                             | 36.14       | 21.48                                                  |
| Densidad                          | MJ/m <sup>3</sup>                             | 0.82        | 1.21                                                   |
| Max. velocidad de ignición        | m/s                                           | 0.39        | 0.25                                                   |
| Requerimiento de aire teórico     | m <sup>3</sup> de aire/ m <sup>3</sup> de gas | 9.53        | 5.71                                                   |
| Max. formación de CO <sub>2</sub> | Vol %                                         | 11.9        | 17.8                                                   |
| Punto de rocío                    | °C                                            | 59          | 60.160                                                 |

## 1.8 Inhibición en la digestión anaerobia

La complejidad existente dentro del microbioma de la digestión anaerobia hace al proceso vulnerable a alteraciones debido a distintas inhibiciones como la acumulación de amoníaco, ácidos grasos volátiles y otros compuestos. Así mismo, algunas condiciones de operación desfavorables como la temperatura y el pH pueden provocar alteraciones en el sistema, debido a eso se requiere una mejor comprensión de los microorganismos presentes para predecir y prevenir la inhibición. Por otra parte, el impacto de los inhibidores depende en gran parte de la aclimatación a largo plazo de

la comunidad microbiana lo que puede provocar un funcionamiento estable en presencia de inhibidores, por lo que ha permitido un amplio rango de concentraciones de inhibidores (Amha *et al.*, 2018).

La inhibición en la producción de metano puede actuar como indicador en la reducción de la actividad microbiana causada por un compuesto tóxico. El nitrato, nitrito, óxido nitroso y óxido nítrico suspenden la metanogénesis. La adición de nitratos al proceso de digestión anaerobia resulta en la inhibición de la metanogénesis, sin embargo, no tiene relación con un aumento de potencial oxido-reducción sino a la competencia de sustratos y a la inhibición por los óxidos intermedios, puesto que la inhibición del NO es irreversible mientras que la causada por el N<sub>2</sub>O es parcialmente reversible (Tugtas *et al.*, 2006).

### **1.9 Biología molecular en la digestión anaerobia**

Los avances en los métodos moleculares han hecho posible estudiar la estructura, función e interacción de comunidades microbianas cada vez más complejas a base de ácido nucleico (Amha *et al.*, 2018).

Las técnicas de biología molecular han jugado un papel muy importante para comprender e investigar la estructura, composición y dinámica del microbioma de la digestión anaerobia, así como la relación existente en la producción de biogás, entre las técnicas se encuentra la reacción en cadena polimerasa (PCR), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), hibridación fluorescente in situ (FISH), secuenciación de amplicón (AmpSeq) del gen 16S rRNA y polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (Singh *et al.*, 2021).

Hoy en día se utilizan ampliamente plataformas de alto rendimiento para estudiar sistemas de digestión anaerobia, con enfoques basados en secuenciación de Illumina o la pirosecuenciación (Amha *et al.*, 2018).

### **1.10 Secuenciación de nueva generación (NGS)**

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), también conocida como secuenciación masiva o de segunda generación hace referencia a un conjunto de tecnologías, estrategias y aproximaciones diseñadas para analizar una gran cantidad de segmentos de ADN, teniendo como principal característica la habilidad para llevar a cabo millones de reacciones de secuenciación de forma paralela y simultánea en un tiempo relativamente corto, lo que eleva significativamente el rendimiento a un menor coste en comparación a los sistemas convencionales esto gracias a la previa preparación de librerías etiquetadas que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional. Adicional a esto permite secuenciar todo el genoma completo, un panel de genes específicos o la porción genética codificante completa (exomas) (Mansilla *et al.*, 2021).

Todas las técnicas de NGS comparten las características antes mencionadas y siguen un sistema metodológico semejante el cual se puede dividir en cinco pasos: 1) Fragmentación del ADN, 2) Marcaje del ADN para indicar el punto de partida para la replicación esto se genera por medio de primers o adaptadores, 3) Amplificación de ADN mediante métodos basados en la reacción en la PCR, 4) Secuenciación del material genético, 5) Reconstrucción de la secuencia mediante las secuencias de referencia y almacenamiento de datos (Rubio *et al.*, 2020).

### **1.11 Secuenciación metagenómica shotgun**

La secuenciación shotgun se emplea para determinar el ADN genómico de un organismo. Esta consiste inicialmente en la fragmentación al azar del genoma, cada fragmento resultante se secuencia individualmente. Las secuencias obtenidas de cada sección son leídas y analizadas mediante software, en búsqueda de secuencias de segmentos idénticos entre sí. Al identificar regiones idénticas que se solapan entre sí, se sutura la secuencia de dos lecturas. Dicho proceso informático se repite hasta

obtener reconstruir el genoma y obtener la secuencia completa del mismo (NHGRI, 2023).

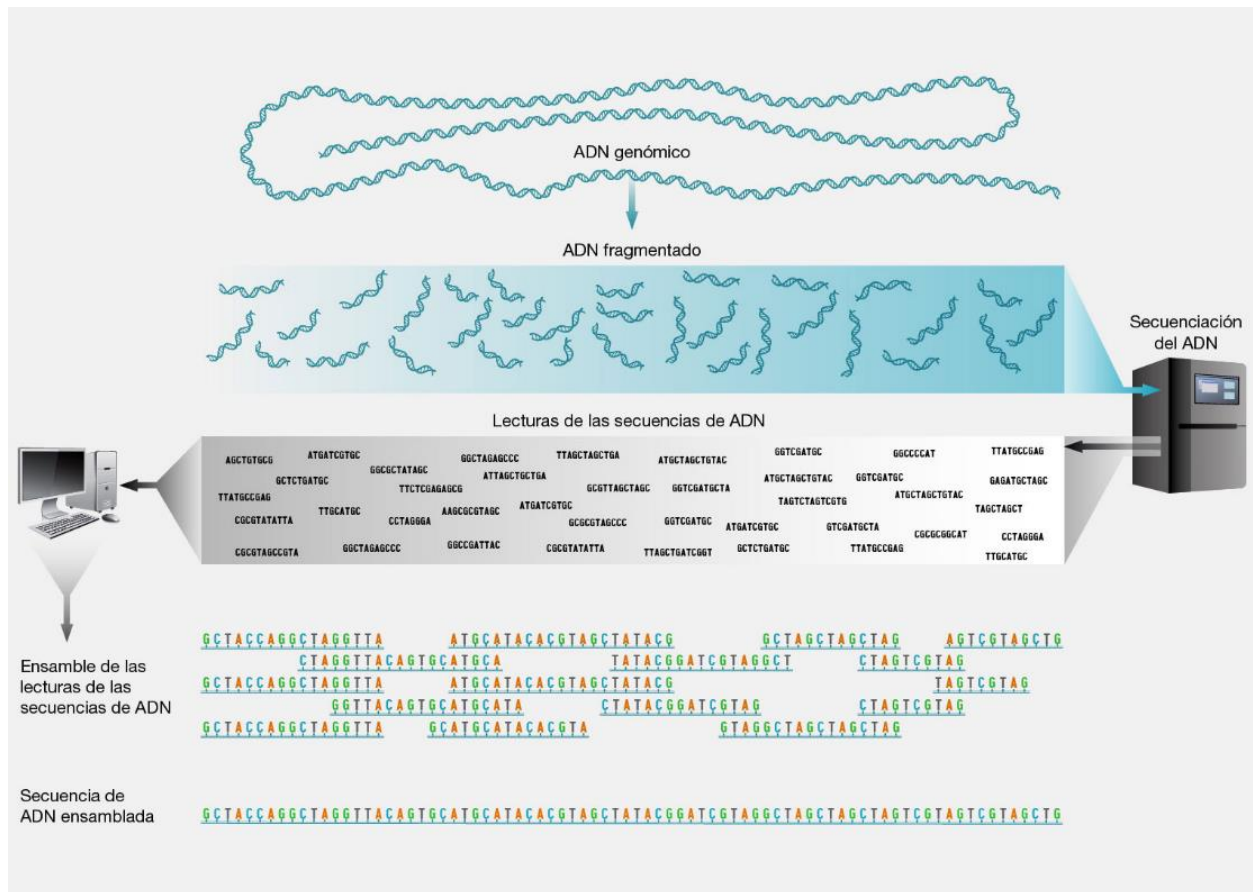


Figura 1.5 Metodología de la secuenciación shotgun (NHGRI, 2023)

## 1.12 Secuenciación mediante Illumina

Lo que caracteriza a la secuenciación mediante Illumina es la ejecución de dos procesos, el primero es el empleo del método de PCR en puente para la generación de colonias del mismo fragmento o también llamado clúster y el segundo es la detección de bases en la secuenciación a través de etiquetas fluorescentes. La exactitud de esta secuenciación está determinada por la longitud de las lecturas, así como la intensidad de la señal. En la actualidad la longitud por lectura alcanza hasta

300 pares de bases (Rubio *et al.*, 2020). En la Tabla 1.4 se puede apreciar algunas características de la plataforma Illumina en función a diferentes secuenciadores.

Tabla 1.4 Características de diferentes secuenciadores de la plataforma Illumina (Mansilla *et al.*, 2021)

| Secuenciador       | Lecturas Max. por carrera (/día) | Longitud máxima de las lecturas | Tiempo carrera | Output Max. Por carrera (/día) | Precisión por base | Error más común              |
|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|--------------------|------------------------------|
| <b>MiSeq</b>       | 50 M                             | 300x2 pb                        | 4–56h          | 15 Gb                          | 0.1 -1 %           | Sustituciones de nucleótidos |
| <b>NextSeq</b>     | 800 M                            | 150x2 pb                        | 11-29          | 120 Gb                         | 0.1 – 1 %          |                              |
| <b>HiSeq 4 000</b> | 2.5 B                            | 150x2 pb                        | 1-5 días       | 750 Gb                         | 0.1 – 1 %          |                              |

### 1.13 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Dentro de la biología molecular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles), es la técnica más importante, debido a que tiene la capacidad de obtener de manera *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN partiendo de solo una molécula. La PCR tiene su fundamento en la replicación celular, pues varias proteínas llevan a cabo la síntesis de nuevas hebras de ADN a partir de una que actúa como un molde, siendo la enzima más importante la ADN polimerasa, debido a que esta es la encargada durante la síntesis de las nuevas cadenas de ADN incorporar nucleótidos (Díaz *et al.*, 2008). Los ciclos de la PCR se llevan a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación o expansión como se puede apreciar en la Figura 1.6.

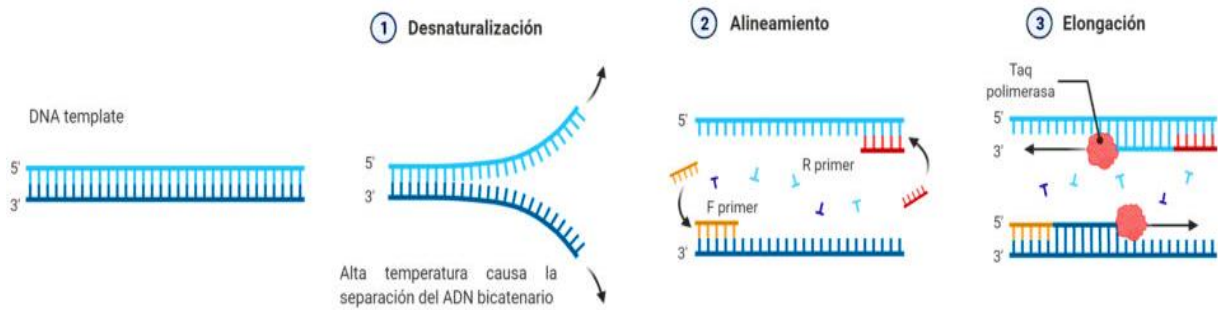


Figura 1.6 Fases de la reacción en cadena de la polimerasa (Labox, 2022)

El nombre de la reacción se dará de acuerdo al sustrato utilizado, cuando se habla de una PCR es porque se empleó como sustrato ADN genómico, si por el contrario se utilizó ADN complementario, a la reacción se le conoce como RT-PCR por sus siglas en inglés (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Las temperaturas a las que se desarrollan estas fases se pueden observar de manera gráfica en la Figura 1.7.

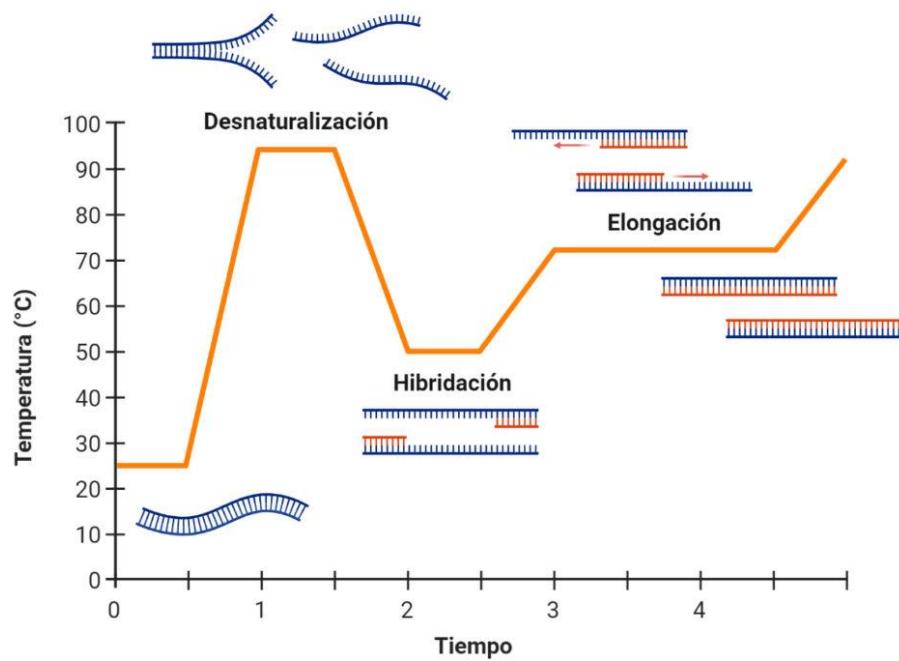


Figura 1.7 Temperatura de las fases de la PCR (Labox, 2022)

**Desnaturalización:** En esta fase las cadenas de ADN son separadas, debido a que los puentes de hidrógeno que unen las hebras del ADN se rompen mediante calentamiento a 95 °C durante un tiempo 20-30 segundos, sin embargo, este dependerá de la secuencia del templado, así como la rapidez de cambio en temperatura en el termociclador, una vez concluida esta etapa se obtendrán las cadenas separadas las cuales servirán como templado en la fase siguiente (Mellado, 2020; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

**Hibridación:** Dentro de esta fase los primers se unen a la secuencia concreta que ha quedado separada en la anterior fase. La temperatura es mucho menor entre los 45-55 °C a la etapa anterior, y esta dependerá en gran medida de los primers empleados (Mellado, 2020).

**Elongación:** Una vez unido el primer con su respectiva cadena complementaria de ADN, la función de la ADN polimerasa inicia, esta consiste en añadir nucleótidos complementarios nuevos a la hebra molde obteniendo de esta manera una molécula de ADN de doble cadena, debido a que la temperatura funcional de la Taq polimerasa es de 72 °C esta es la temperatura óptima de la reacción. Cada copia que se genera en un ciclo es el molde para los siguientes, por lo que resulta en la amplificación exponencial, teniendo como resultados millones de copias de un fragmento concreto. Al término del ciclo los amplicones se habrán formado con un tamaño dictado mediante el número total de pares bases (pb) (Mellado, 2020; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

#### **1.14 ARN ribosomal 16S**

Los estudios metagenómicos tienen por objetivo la determinación de la composición bacteriana de una muestra, pudiéndose realizar mediante el análisis de secuenciación masiva de librerías que provienen de la amplificación por PCR del gen ARNr 16S. Este gen es el biomarcador más empleado ya que proporciona datos filogenéticos detallados, información sobre arqueas y bacterias de comunidades microbianas

mixtas. Este gen tiene una longitud de 1542 pares de bases y se encuentra conformado por nueve regiones hipervariables (V1-V9) en las cuales se intercalan regiones conservadas. Los cebadores de la PCR están diseñados dentro de regiones conservadas específicas para la obtención de una amplificación que contenga una o más regiones hipervariables (Shahi *et al.*, 2017; Laserna-Mendieta y Claesson, 2016).

La secuenciación de próxima generación mediante Illumina permite la secuenciación de solo 500 de los 1500 nucleótidos de largo del gen 16S rRNA. Los cebadores son elegidos para los productos de amplificación los cuales consisten en ciertas regiones que muestran un sesgo para taxones particulares. La región V1-V2,3 muestra un sesgo mayor por *Clostridium* y una disminución por algunas especies de *Bacteroides* mientras que las regiones V4, V3-V4 y V3-V5 muestran una clasificación menos sesgada de taxones bacterianos (Shahi *et al.*, 2017).

### **1.15 Antecedentes de la investigación**

Actualmente, se han desarrollado diversas investigaciones relacionadas con la desnitrificación en el tratamiento de aguas residuales, así mismo, se han realizado diversos estudios de poblaciones microbianas que intervienen en la remoción. A continuación, se presenta una revisión detallada del estado del arte.

Zhu *et al.* (2021), utilizaron cuatro tipos de frutas descompuestas (plátano, manzana, pera y uva) como fuente de carbono adicional para mejorar la eliminación de nitrógeno de los lixiviados maduros de los vertederos con una relación óptima carbono-nitrógeno de 6.5 y un tiempo de operación de 2 días. El proceso se llevó a cabo en matraces con un volumen de 500 mL sellándolos con parafilm y banda elástica para garantizar condiciones anaerobias. Se agregaron 300 mL de lixiviado y un cierto porcentaje de fruta podrida previamente molida. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 125 rpm. La abundancia de bacterias desnitrificantes y orgánicas degradantes aumentó después de la adición de plátano

podrido, lo que contribuyó a la eliminación de nitrógeno de 99.36 % y orgánicos de 94.60.

Lucero y Guerrero (2021), estudiaron el proceso de nitrificación-desnitrificación en conjunto con el tratamiento de residuos agrícolas mediante digestión anaerobia. Analizaron la generación de biogás empleando inicialmente de estiércol de gallina y Opuntia Ficus Indica en una relación 90-10 % respectivamente a una temperatura de operación de 30 °C en un reactor tipo batch. En la digestión anaerobia la generación de metano, así como la eliminación de materia orgánica fueron de 15.8 L CH<sub>4</sub>/kg y 43 % respectivamente y ST con una tasa de detención (TD) de 90 días. Con un tiempo de operación de 46 días la tasa de eliminación de nitrógeno amoniacal en el proceso de nitrificación–desnitrificación fue de 54.7 %, a pesar de que en la etapa de nitrificación obtuvieron el 81 % de conversión de nitrógeno amoniacal a otras especies de nitrógeno; la reducción en la eficiencia de eliminación se debió a que un porcentaje de nitrato sufrió amonificación y regresando nuevamente a nitrógeno amoniacal esto provocado por la alta relación de C/N de 52. Esto provocó que parte del carbono presente se sometiese al proceso de metanogénesis potenciando a su vez el proceso de amonificación.

Wang *et al.* (2020), investigaron el rendimiento, el comportamiento microbiano y la evolución de materia orgánica disuelta en un sistema eficiente de desnitrificación utilizando residuos de cáscara de plátano como fuente de carbono en reactores SBR. Evaluaron los factores que influyen en la eliminación de nitrógeno como el tamaño de partícula, el pH y la presencia o ausencia de fósforo empleando agua residual sintética con lodo anaerobio como inóculo y nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) como fuente de nitrógeno. Reportaron una correlación positiva entre el tamaño de partícula y la remoción, así una ligera variación en la eficiencia de reducción de nitrato con el pH, favoreciendo un pH alcalino o neutro frente a uno ácido. Así mismo lograron una reducción completa de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> después de 3 días con y sin fósforo adicional, lo que sugiere que el fósforo liberado por la cáscara de plátano podría satisfacer por completo el requisito de las

bacterias desnitrificantes. Obtuvieron una eliminación total de  $822.08 \pm 19.54$  mg  $\text{NO}_3^-$  con una fuente de carbono de 5g. El análisis de materia orgánica y la secuenciación 16S rRNA y genes funcionales, las principales bacterias funcionales fueron *Anaerolineaceae* y *Lentimicrobium*, las primeras fueron bacterias desnitrificantes y las últimas bacterias de hidrólisis orgánica.

Sánchez-Balseca *et al.* (2019), evaluaron dos sistemas para la desnitrificación en aguas residuales empleando una fuente de energía externa en reactores anaerobios de biopelícula. El sistema uno empleó como fuente de carbono metanol y sustrato de cáscara de arroz. Los dos sistemas operaron con tiempos de retención hidráulicos de entre las 2.38 - 8.33 horas alimentados con 40 mg  $\text{NO}_3^-/\text{L}$  de nitratos, utilizaron preferentemente  $\text{NaNO}_3$  como fuente de nitrógeno. El sistema con el que se obtuvo una mayor eficiencia en la remoción de nitrato fue el sistema que empleaba cascara de arroz como sustrato con una eficiencia del 97.58 %, con el sistema que empleó metanol como sustrato alcanzó con el mismo tiempo de retención una eficiencia del 93.46 %. Ambos sistemas tuvieron un comportamiento similar en la remoción de carga orgánica alcanzando una eficiencia del 94 %. El coeficiente de producción de biomasa 0.0045 y 0.007 para el reactor con cáscara de arroz y metanol respectivamente indicando una baja generación de lodo.

Zhang *et al.* (2018), analizaron las variaciones en la comunidad microbiana desnitrificante y genes funcionales durante la digestión anaerobia mesofílica y termofílica del estiércol de ganado. El estudio se llevó a cabo en seis tanques de digestión idénticos de 5 L, cada uno con un volumen de trabajo de 4 L, se colocaron en incubadoras bioquímicas a temperaturas de 35 °C (DA mesofílica) o 55 °C (DA termofílica). Detectaron 39 géneros abundantes encargadas en el metabolismo del nitrógeno pertenecientes principalmente a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, entre estos los géneros las principales fueron *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Petrimonas* y *Bacillus*.

He *et al.* (2018) , estudiaron las características de la materia orgánica disuelta y la estructura de la comunidad bacteriana en sistemas de desnitrificación de agua subterránea basados en drenaje de lavado de arroz (DLA) inoculando con y sin lodo de siembra. Los experimentos se realizaron en matraces cónicos de 500 mL con sellos de goma, que contenían 50 mL de DLA y 350 ml de agua subterránea sintética preparada con 0.304 g de  $\text{NaNO}_3$  y 0.044 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1 L de agua desionizada con una concentración de 50 mg  $\text{NO}_3^-$ -N/L, y una concentración de  $44.3 \pm 0.2$  mg  $\text{NO}_3^-$ -N/L después de la dilución con DLA. Se cultivaron a 115 rpm y  $25 \pm 0.5$  °C. La comparación específica hasta el nivel de género mostró las bacterias desnitrificantes dominantes de *Thiobacillus*, *Anaerolineaceae* y *Methylophilaceae* en el lodo de siembra. *Ideonella*, *Cloacibacterium* y *Enterobacter* fueron dominantes después de la adición de DLA en el sistema inoculado, mientras que *Stenotrophomonas* y *Enterobacter* fueron los géneros dominantes cuando DLA fue la única fuente de bacterias en el sistema no inoculado. Finalmente, las eficiencias de reducción de nitrato en los sistemas inoculados y no inoculados fueron  $99.1 \% \pm 0.1 \%$  y  $99.0 \% \pm 0.2 \%$ , respectivamente. En la Tabla 1.5 se puede apreciar el resumen del estado del arte.

Tabla 1.5a Evolución del estado del arte en el análisis de poblaciones microbianas en el proceso de remoción de nitrógeno con adición de una fuente de carbono

|                  | Monitoreo del proceso de DA        |                        | Estudio de poblaciones microbianas |                       |                         |                        | Presente investigación 2022 |
|------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
|                  | Sánchez-Balseca <i>et al.</i> 2019 | Lucero y Guerrero 2021 | Zhang <i>et al.</i> 2018           | He <i>et al.</i> 2018 | Wang <i>et al.</i> 2020 | Zhu <i>et al.</i> 2021 |                             |
| Tipo de reactor  | RAB                                | SBR                    | SBR                                | SBR                   | SBR                     | SBR                    | RAH                         |
| Volumen (L)      | 1                                  | 0.25                   | 4                                  | 0.5                   | 1                       | 0.5                    | 2.92                        |
| Temperatura (°C) | NE                                 | 30                     | 35-55                              | $25 \pm 0.5$          | $30 \pm 2$              | 30                     | $35 \pm 2$                  |

Tabla 1.5b Evolución del estado del arte en el análisis de poblaciones microbianas en el proceso de remoción de nitrógeno con adición de una fuente de carbono. Continuación

|                                                | Monitoreo del proceso de DA        |                                             | Estudio de poblaciones microbianas                                                        |                                                                   |                                                 |                        | Presente investigación 2022                     |
|------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|
|                                                | Sánchez-Balseca <i>et al.</i> 2019 | Lucero y Guerrero 2021                      | Zhang <i>et al.</i> 2018                                                                  | He <i>et al.</i> 2018                                             | Wang <i>et al.</i> 2020                         | Zhu <i>et al.</i> 2021 |                                                 |
| pH                                             | NE                                 | 7-7.5                                       | NE                                                                                        | 7.35 ± 0.13                                                       | NE                                              | NE                     | 6.8-7.2                                         |
| Reactor de biopelícula                         | Si                                 | No                                          | No                                                                                        | No                                                                | No                                              | No                     | Sí                                              |
| TRH (d)                                        | >1                                 | NE                                          | NE                                                                                        | 8 y 12                                                            | NE                                              | 2                      | 1                                               |
| Sustrato empleado                              | Metanol<br>Cáscara de arroz        | Estiércol de gallina y Opuntia Ficus Indica | Estiércol de ganado                                                                       | Agua residual sintética                                           | Agua residual Sintética                         | Frutas (Plátano)       | FL-RSO                                          |
| Fuente de nitrógeno                            | NaNO <sub>3</sub>                  | NE                                          | NE                                                                                        | NaNO <sub>3</sub>                                                 | NaNO <sub>3</sub>                               | Lixiviado              | NaNO <sub>3</sub>                               |
| Cva (mg/L)                                     | NE                                 | NE                                          | NE                                                                                        | NE                                                                | NE                                              | NE                     | 10                                              |
| Remoción DQO (%)                               | 94                                 | 43                                          | NE                                                                                        | NE                                                                | NE                                              | 94.60                  | >95 %                                           |
| Remoción de N (%)                              | 93.46<br>97.58                     | 54.7                                        | NE                                                                                        | 99.1 ± 0.1<br>99.0 ± 0.2                                          | 99.99 ± 0.1 %                                   | 99.36                  | 100 %                                           |
| Rendimiento de metano (LCH <sub>4</sub> /kgST) | 97.58                              | 15.8                                        | NE                                                                                        | 99.0 ± 0.2                                                        | NE                                              | NE                     | 0.267<br>Lbiogás/gDQO <sub>rem</sub>            |
| Población microbiana dominante                 | NE                                 | NE                                          | <i>Pseudomonas</i> ,<br><i>Enterococcus</i> ,<br><i>Petrimonas</i> y<br><i>Bacillus</i> . | <i>Ideonella</i><br><i>Cloacibacterium</i><br><i>Enterobacter</i> | <i>Anaerolineaceae</i><br><i>Lentimicrobium</i> | <i>Proteobacteria</i>  | Scar, Aher, Minf,<br>Flim, Aden, Scar<br>y Msoe |

NE: No especificado

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Metodología

La metodología utilizada en esta investigación se observa en la Figura 2.1.

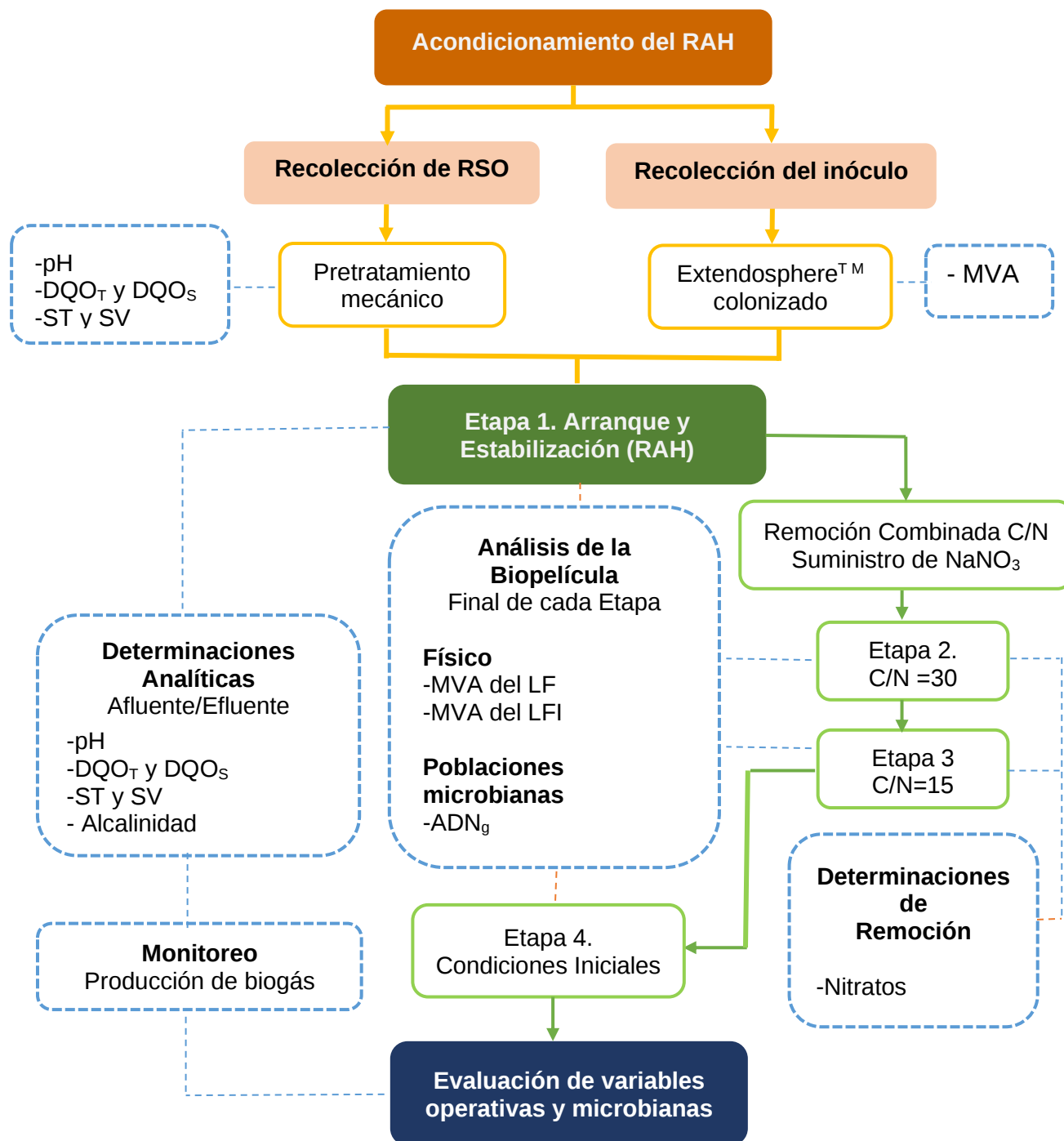


Figura 2.1 Metodología empleada en la presente investigación

## 2.2 Acondicionamiento del RAH

El reactor de biopelícula empleado en esta investigación fue un Reactor Anaerobio Híbrido (RAH), el cual se puede observar en la Figura 2.2. Está constituido por dos secciones, en la parte superior se encuentra un Lecho Fijo (LF) el cual consta de un tubo de acrílico de 23 cm de longitud con un diámetro nominal de 7.62 cm y un espesor de 0.3 cm, esta sección emplea como medio de soporte anillos poliméricos recubiertos por esmalte acrílico para mejorar la adherencia de la biomasa (Figura 2.3). En la parte inferior se encuentra el Lecho Fluidizado Inverso (LFI), esta sección tiene una longitud de 80 cm y presenta las mismas especificaciones de diámetro nominal y espesor que el LF, emplea como soporte arena sílice llamada Extendsphere™ (Figura 2.3), un área de superficie específica de  $20,000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , densidad de  $0.69 \text{ kg/m}^3$  y con un diámetro de  $170 \text{ }\mu\text{m}$  (Rosas Mendoza, 2018).

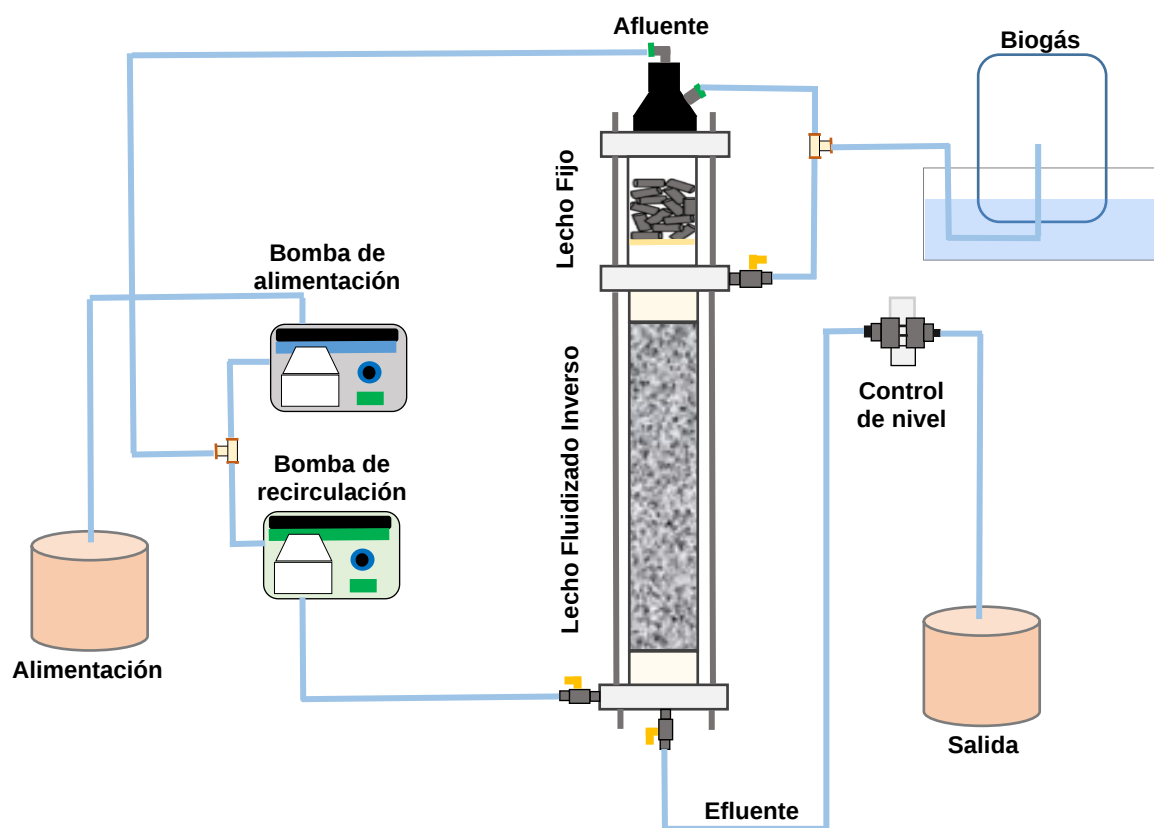
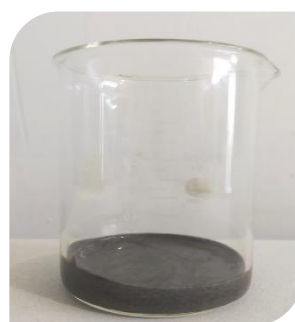


Figura 2.2. Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

Ambos tubos de acrílico están unidos mediante tres piezas de naylamid blanco, la primera pieza se encuentra en la parte superior del reactor y está unida a una pieza de naylamid negro en donde se encuentra los conectores de alimentación-recirculación y la salida del biogás. La segunda pieza se encuentra en el medio del reactor separando ambos lechos, aquí se localiza una válvula para la salida del biogás. La tercera pieza se encuentra en la parte inferior, aquí se hallan dos válvulas para la recirculación y la salida. Todas las piezas se encuentran ensambladas a presión mediante seis espárragos de acero al carbón, tres en la parte superior y tres en la inferior. Las válvulas, accesorios y mangueras utilizadas tienen un diámetro de 0.635 cm (1/4 in).



*Anillos poliméricos  
recubiertos con esmalte*



*Extendsphere™  
colonizado*

Figura 2.3 Soportes empleados en el RAH

El biogás producido se captó mediante un sistema de desplazamiento gas-líquido. Para la estabilización del nivel del lecho se instaló un sistema de control para impedir que este aumentara o disminuyera debido a la presión generada dentro del reactor. Durante la etapa experimental el reactor permaneció en un cuarto a temperatura controlada en un rango mesofílico entre los  $35 \pm 2$  °C.

El caudal de alimentación, el tiempo de residencia hidráulica, así como la relación sustrato/biomasa fueron los parámetros de operación para el RAH, y se determinan mediante las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3

$$Q = \frac{(Cva)(Vu)}{DQO} \quad (2.1)$$

Donde:

Q: Caudal de alimentación (L/d)

Vu: Volumen útil del RAH (L)

DQO: DQO de alimentación (g DQO/L)

$$TRH = \frac{Vu}{Q} (24) \quad (2.2)$$

Donde:

TRH: Tiempo de residencia hidráulica (h)

Vu: Volumen útil del RAH (L)

Q: Caudal de alimentación (L/d)

24: Factor de conversión

$$\frac{S_0}{X_0} = \frac{DQO \cdot Q}{MVA \cdot Vs} \quad (2.3)$$

Donde:

$S_0/X_0$ : Relación Sustrato/Biomasa

DQO: DQO de alimentación (g DQO/L)

Q: Caudal de alimentación (L/d)

MVA: Materia Volátil Adherida (g SV/L)

Vs: Volumen de soporte colonizado (L)

### 2.3 Recolección de RSO para la obtención de sustrato

El sustrato empleado fue la fracción líquida de residuos sólidos orgánicos (FL-RSO). Los RSO están compuestos de restos de frutas y verduras que varían de acuerdo a la temporada, estos se obtuvieron del mercado municipal Zapata de Orizaba, Ver. Para obtener la FL-RSO, se recolectaron RSO, se separaron y trituraron y el semisólido pastoso resultante se filtró obteniendo una fracción líquida y una sólida. La FL

obtenida, se filtra nuevamente a través de una malla y un filtro de tela para asegurar eliminación completa de partículas sólidas. Dicho proceso se puede observar en la Figura 2.4.



Figura 2.4 Obtención de la FL-RSO

## 2.4 Recolección de inóculo

Se empleó como inóculo 1.09 L de Extendsphere™ previamente colonizado extraído del reactor EGSB ubicado en la Planta Piloto de Tratamiento y Aprovechamiento de Residuos Sólidos del Instituto Tecnológico de Orizaba con un porcentaje de colonización de acuerdo con Rodríguez-García (2015) de aproximadamente 12.39 %.

## 2.5 Etapas experimentales

La puesta en marcha del RAH se dividió en cuatro etapas experimentales hasta alcanzar condiciones estables como se indica en la Tabla 2.1 esto con el fin de evaluar la eficiencia del reactor al variar las condiciones de operación, empleando como sustrato en todas las etapas FL-RSO sin ningún tratamiento previo, ajustando el pH con bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) entre 6.8 y 7.2.

Durante las cuatro etapas operativas la FL-RSO se suministró al reactor manteniendo una Cva de aproximadamente 5 gDQO/L·d. En la Etapa 1 de arranque y estabilización la FL-RSO se alimentó sin la adicción de ningún tipo de inhibidor. En las etapas de remoción carbono-nitrógeno (Etapas 2 y 3) se suministró nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ )

como fuente de nitrógeno. En la Etapa 2 se suministró 121.6 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  con una relación  $\text{C/N}=30$  ( $\text{gDQO/gN-NO}_3^-$ ) y en la Etapa 3 se adicionó 243.3 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  con una relación  $\text{C/N}=15$  ( $\text{gDQO/gN-NO}_3^-$ ), esto con el propósito de observar y monitorear la remoción combinada carbono-nitrógeno. En la Etapa 4 se retiró el suministro de nitrógeno, con el fin de retornar a las condiciones de operación iniciales para observar la reversibilidad del proceso. Durante todo el tiempo de operación del reactor se monitoreó el sustrato en la entrada y la salida para evaluar las remociones del sistema.

Tabla 2.1 Etapas operativas del RAH

| No. de Etapa | Etapa                     | Remoción          | Días de operación | Cva (g DQO/Ld) | Sustrato                   |
|--------------|---------------------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------------------|
| 1            | Arranque y Estabilización | Carbono           | 145               | 5              | FL-RSO                     |
| 2            | Relación $\text{C/N}=30$  | Carbono-nitrógeno | 38                |                | FL-RSO con $\text{NaNO}_3$ |
| 3            | Relación $\text{C/N}=15$  | Carbono-nitrógeno | 18                |                |                            |
| 4            | Condiciones iniciales     | Carbono           | 12                |                | FL-RSO                     |

## 2.6 Determinaciones analíticas

En la presente investigación fueron monitoreados pH, DQO total ( $\text{DQO}_T$ ), DQO soluble ( $\text{DQO}_S$ ), sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) tanto en el afluente como en el efluente para evaluar los porcentajes de remoción en estos parámetros con el objetivo de evaluar el desempeño de RAH durante las cuatro etapas operativas.

### **2.6.1 Potencial de hidrógeno (pH)**

Se determinó por el método Potenciométrico 4500-H<sup>+</sup> B de Standard Methods mediante un potenciómetro Orión 250<sup>a</sup> con una exactitud de  $\pm 0.01$  y una resolución de lectura de pH de 0.01. Se monitoreó el pH interno del reactor, así como el sustrato de entrada y salida.

### **2.6.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

Se determinó la Demanda Química de Oxígeno Total y soluble (DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>) del afluente y del efluente para determinar la remoción de materia orgánica. Para realizar la DQO<sub>S</sub> se tomarán 10 mL de muestra y se colocaron en una centrífuga HERMLE Z383 a 3500 rpm durante 5 minutos, tomando el sobrenadante para realizar el análisis. Ambas determinaciones fueron analizadas mediante el método calorimétrico 5220 D Standard Methods usando como agente oxidante dicromato de potación en medio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en presencia de sulfato mercúrico y sulfato de plata como catalizadores de ebullición, la muestra se digirió durante dos horas a 150 °C en una placa digestora ODYSSEY DR2500 marca HACH. Una vez transcurrido el tiempo, la muestra se leyó en un fotómetro de rango alto marca CHEMETRICS de 0-1500 ppm.

### **2.6.3 Sólido suspendidos totales y volátiles (SST y SSV)**

Estos análisis se determinaron por medio de la técnica gravimétrica descrita en el procedimiento estándar 2540 de APHA (2017). Para la determinación de sólidos suspendidos volátiles se tomaron 5 mL de muestra y se depositaron en un crisol a peso constante dentro de una estufa Riossa a 105 °C durante 24 horas. El aumento en el peso del crisol en comparación con el crisol vacío representa los sólidos totales, los cuales se pueden calcular mediante la Ecuación 2.4.

$$SST = \frac{P_3 - P_1}{V} (1\ 000\ 000) \quad (2.4)$$

Donde:

SST: Sólidos suspendidos totales (mg/L)

P<sub>1</sub>: Peso del crisol a peso constante (g)

P<sub>2</sub>: Peso del crisol con muestra seca (g)

V: Volúmen de la muestra (5 mL)

Para la determinación de SSV se realizó mediante el mismo procedimiento estándar que los SST. La muestra seca se calcinó en una mufla Barnstead/Themolyne a 550 °C por 2 horas. El peso perdido tras la incineración representa el contenido de sólidos volátiles, los cuales mediante la Ecuación 2.5 se pueden cuantificar. Todas las muestras se pesaron en una balanza digital Ohaus Adventurer.

$$SSV = \frac{P_3 - P_5}{V} (1\ 000\ 000) \quad (2.5)$$

Donde:

SSV: Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)

P<sub>3</sub>: Peso del crisol con muestra seca (g)

P<sub>4</sub>: Peso del crisol con muestra calcinada (g)

V: Volúmen de la muestra (5 mL)

#### **2.6.4 Alcalinidad**

La alcalinidad es la capacidad para neutralizar un ácido. Esta se determinó mediante titulación potenciométrica con una solución estándar de un ácido mineral fuerte (ácido sulfúrico) a los puntos sucesivos equivalentes del ácido carbónico (4.5).

Se tomaron 10 mL de muestra en un vaso de precipitados y se adicionó gota a gota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0.02 N hasta alcanzar un pH entre 5.70 - 5.75 la cual corresponde a la

alcalinidad parcial (AP) esta incluye el 80 % del sistema carbonato/bicarbonato. Se continuó adicionando ácido hasta alcanzar un pH entre 4.3 - 4.33 correspondiente a la alcalinidad total (AT) que incluye carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos empleando el potenciómetro Orión 250<sup>a</sup>. La diferencia entre la AT y la AP se denomina alcalinidad intermedia (AI) la cual incluye el 20% del sistema carbonato/bicarbonato y parte de las sales de ácidos grasos. Se registraron los mililitros gastados del ácido mineral y mediante la Formula 2.6 se obtuvo el factor de alcalinidad  $\alpha$ .

$$\alpha = \frac{V_{4.33} - V_{5.75}}{V_{4.33}} = \frac{AI}{AP} \quad (2.6)$$

Donde:

$\alpha$ : Factor de alcalinidad

$V_{4.33}$ : Volumen de  $H_2SO_4$  gastados para alcanzar un pH de 4.33

$V_{5.75}$ : Volumen de  $H_2SO_4$  gastados para alcanzar un pH de 5.75

### **2.6.5 Producción de biogás**

Se monitoreó la producción de biogás diaria mediante un sistema de desplazamiento gas- líquido.

## **2.7 Determinaciones de remoción de nitratos**

En la Etapa 2 y 3 se determinó el porcentaje de remoción de nitrógeno para la obtención de la eficiencia del sistema en la eliminación carbono-nitrógeno. Las muestras fueron tomadas tanto del afluente como del efluente, y mediante la diferencia de concentraciones entre ambas se infirió la remoción de nitratos.

Se empleó un fotómetro portátil de nitratos marca HANNA instruments modelo HI97728 con un rango de detección de 0.0 a 30 mg NO<sub>3</sub>/L.

## **2.8 Análisis de la biopelícula**

Se analizó la biopelícula de manera física con Material Volátil Adherida (MVA) y mediante técnicas de biología molecular analizando el ADN genómico (ADNg).

### **2.8.1 Materia Volátil Adherida (MVA)**

Se determinó la biomasa adherida a los soportes tanto del lecho fijo como del lecho fluidizado inverso, mediante la técnica gravimétrica de sólidos suspendidos volátiles. Se tomó 1 g de muestra de ambos lechos a tres diferentes profundidades, superior, media e inferior, estos se colocaron en papel aluminio a peso constante, dejándolos secar a 105 °C por 24 h , seguido de esto se calcinaron a 550 °C por un tiempo de 2 horas, mediante la diferencia de pesos se obtuvo la MVA la cual es equivalente a la biomasa en g/L.

### **2.8.2 Análisis de las poblaciones microbianas**

Se analizó el ADN genómico (ADNg) para la caracterización de poblaciones microbianas presentes en la biopelícula pertenecientes al dominio *Arquea* y *Bacteria*, esto mediante el siguiente procedimiento.

#### **1) Obtención de muestra**

Las muestras se obtuvieron al finalizar cada una de las cuatro etapas operativas, dichas muestras corresponden a la biopelícula desarrollada en los soportes del RAH, tanto en el lecho fijo como en el lecho fluidizado inverso. La toma de muestra se realizó

en un ambiente estéril para impedir la contaminación de las muestras, desinfectando las áreas con alcohol etílico al 70 % y empleando material estéril.

En el lecho fijo se obtuvieron 10 mL de muestra al final de cada etapa, dicha muestra se obtuvo raspando la biopelícula adherida a los anillos poliméricos empleados como soporte en el LF, con ayuda de una espátula estéril. La biopelícula recolectada fue depositada en un tubo falcon de 50 mL previamente esterilizado (Figura 2.5). En el lecho fluidizado inverso se tomaron 10 mL de soporte colonizado en tres diferentes secciones: superior, media e inferior, colocándola en tubos falcon esterilizados. Así mismo se obtuvieron 20 mL de muestra del sustrato interno del reactor para analizar la biomasa suspendida, esta se obtuvo de la válvula de salida del reactor ubicado en la parte inferior, la cual se obtuvo al final de cada etapa operativa. Las muestras obtenidas de biopelícula del LF, LFI y la biomasa suspendida estuvieron destinadas para la determinación de la dinámica de poblaciones microbianas.

Una vez obtenidas las muestras se refrigeraron a una temperatura de 4 °C, para ser trasladadas posteriormente a la Universidad de Guadalajara al Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI).



Figura 2.5 Muestras de biopelícula recolectadas al término de una etapa operativa

Al finalizar la operación del reactor se obtuvieron 20 muestras, 5 muestras por cada etapa. Sin embargo, solo se seleccionaron las muestras más representativas del sistema para su conservación, extracción y purificación. Seleccionando así las muestras de cada etapa de lecho fijo y las muestras de cada etapa de lecho fluidizado inverso de la sección media, lo que dio como resultado 8 muestras. Las muestras de biomasa suspendida no fueron analizadas, debido a la poca cantidad de biomasa suspendida presente en las muestras.

## **2) Conservación de muestra**

La conservación y la extracción del ADN genómico de las muestras de la biopelícula del lecho fijo fueron llevadas a cabo mediante el método propuesto por Godon *et al.* (1997). La conservación de dichas muestras inició con la adición de 10 mL de PBS 1X en los tubos falcon de 50 mL en donde se encontraba la muestra, los cuales luego de la adición del PBS fueron cerrados y agitados ligeramente para lavar la muestra. Acto seguido se centrifugaron las muestras a 6 500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5810R. Se retiró el sobrenadante y la biomasa en el tubo se extrajo con ayuda de una espátula esterilizada y se llevó a un mortero esterilizado y congelado a -20°C. En el mortero se añadieron 4 mL de tiocianato de guanidina 0.1 mol/L de Tris-HCl con un pH de 7.8 , posterior a esto la muestra se maceró y se agregaron 0.6 mL de N-lauroil sarcosina al 10 %. La pasta macerada resultante se repartió en siete alícuotas de 0.5 mL las cuales se llevaron a siete microtubos Bead Bug de 2 mL con anillo de goma y tapa roscada previamente esterilizados etiquetados con la clave correspondiente.

Las muestras de la biopelícula adherida al soporte del lecho fluidizado inverso fueron procesadas para su conservación mediante el protocolo publicado por Cresson *et al.* (2009). Como primer punto las muestras se lavaron, se agregó a los tubos falcon estériles de 50 mL en donde se encontraban las muestras 30 mL de PBS 1X, los tubos se cerraron y se agitaron ligeramente. Inmediatamente después se removió el PBS 1X

de los tubos usando una micropipeta. Posterior a esto, se lavó una vez más agregando la misma cantidad de PBS 1X, agitando ligeramente y removiendo el PBS 1X con una micropipeta.

Una vez concluidos los lavados se tomó una porción de la muestra lavada y se agregó a un mortero previamente esterilizado y congelado, añadiendo 4 mL de Tiocianato de guanidina para proceder a macerar la muestra con el pistilo esterilizado hasta observar la presencia de restos de biomasa en suspensión, esto con el propósito de desprender la biomasa del soporte. Seguido de esto se añadieron 0.6 mL de N-lauroil sarcosina al 10 %, se mezcló suavemente hasta homogenizar para no generar un exceso de burbujas y se repartió en siete alícuotas de 0.5 mL las cuales se llevaron a siete microtubos etiquetados con la clave correspondiente de 2 mL con anillo de goma y tapa roscada previamente esterilizados Bead Bug. La clasificación de las muestras se indica en la Tabla 2.2. Los microtubos con las muestras fueron conservados en un congelador a -20°C dentro de cajas criogénicas previamente etiquetadas como se muestra en la Figura 2.6.

Tabla 2.2 Clasificación de la conservación de muestras de biomasa

| Lecho                    | Descripción                                         | Etapas | Clave |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|--------|-------|
| Lecho Fijo               | Biopelícula adherida a los tubos de PVC             | 1      | D1    |
|                          |                                                     | 2      | D2    |
|                          |                                                     | 3      | D3    |
|                          |                                                     | 4      | D4    |
| Lecho Fluidizado inverso | Biopelícula adherida al Extendsphere™ sección media | 1      | D9    |
|                          |                                                     | 2      | D10   |
|                          |                                                     | 3      | D11   |
|                          |                                                     | 4      | D12   |



Figura 2.6 Muestras de biopelícula anaerobia conservadas en microtubos

### 3) Extracción de ADN

El procedimiento de extracción de ADN empleado fue el mismo para todas las muestras. Se inició añadiendo 0.5 mL de LaurilSarcosina al 5 % a la muestra conservada y se llevó a baño maría durante una hora a 70 °C. Mientras tanto, se trituró hielo para realizar la extracción en un ambiente frío y así evitar así la degradación del ADN. Una vez que el tiempo del baño maria concluyó, la muestra se llevó al hielo en donde se añadieron 0.5 mL de perlas de zirconio esterilizadas, seguido de esto se cierra el tubo y se introduce en un triturador vibratorio marca Bead Bug modelo D1030 para iniciar el lisiado de las células durante 50 segundo y a una velocidad de 400 rpm. Al concluir el tiempo del triturador vibratorio, las muestras se llevaron al hielo y se añadieron 15 mg de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) esto con la finalidad de fijar los ácidos humínicos los cuales actúan como inhibidores de la ADN polimerasa. El tubo se cerró y centrifugó a 12,000 rpm por tres minutos en la centrífuga MiniSpin plus (Eppendorf). Una vez concluido se llevó nuevamente al hielo y se añadieron 0.5 mL de TENP, centrifugando la muestra a 12 000 rpm durante 3 min. El TENP recupera el ADN del sedimento y lo suspende en el sobrenadante. Una vez concluida la centrifugación se recuperó 0.4 mL de sobrenadante en un microtubo de 2 mL. Se repitió este procedimiento dos veces más hasta obtener un microtubo con 1.2 mL de sobrenadante, el cual se dividió en dos microtubos de 2 mL (0.6 mL por tubo) y se le añadió a cada uno 0.6 mL de isopropanol y se agitaron suavemente por tres minutos.

Durante la agitación el isopropanol precipita el ADN, donde se puede observar el cambio de densidad del líquido, este se deja reposar y más tarde se lleva a centrifugación a 14 500 rpm durante 15 minutos en la centrífuga Eppendorf modelo MiniSpin plus. Una vez concluida la centrifugación se desecha el sobrenadante. Se agregó al microtubo 0.2 mL de agua para PCR, para lavar el botón y traspasarlo al siguiente microtubo para de esta manera obtener una suspensión completa de ADN. Para proceder a la eliminación de impurezas del ADN se añadieron 0.01 mL de RNAsa a 2.5 mg/mL, y se incubó en baño seco durante 30 min a una temperatura de 37 °C.

#### **4) Purificación de ADN**

La purificación en el ADN extraído se realizó empleando el Kit QIAamp® DNA acompañado de centrifugaciones a 14 000 rpm durante 3 min. Como primer paso se agregaron 0.2 mL de Buffer AL y se incubó en el baño maría durante 10 min a una temperatura de 70 °C. Una vez finalizado se agregaron 0.2 mL de etanol puro y se realizó la primera centrifugación. Al finalizar se agregaron 0.5 mL de los Buffer AW1 y AW2 centrifugando entre cada uno de ellos. Para finalizar se agregaron 0.05 mL de Buffer AE y se centrifugó a 8 000 rpm durante tres minutos. Se recuperaron aproximadamente 0.04 mL de ADN los cuales se congelaron a -20°C.

#### **5) Visualización del ADN**

La distribución de los fragmentos de ADN, así como la visualización de la talla se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % y se leyó con un fotodocumentador Bio-RAD modelo Gel Doc™ EZ Imager (Figura 2.7).

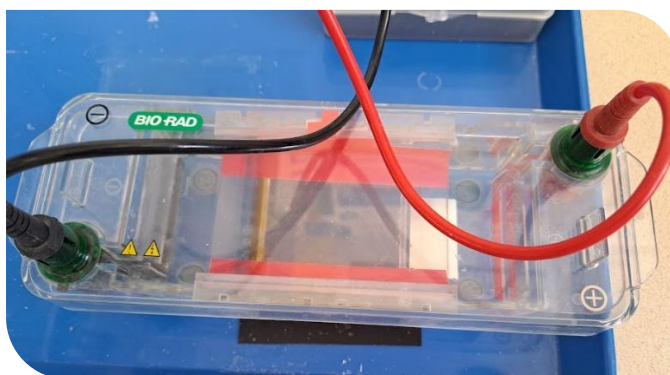


Figura 2.7 Fotodocumentador Bio-RAD Gel Doc™ EZ Imager

## 6) Concentración del ADN y medición de la pureza

La concentración y la pureza del ADN se determinó mediante la absorbancia con un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Nanodrop 2000 a una longitud de onda de 260 nm, colocando 0.002 – 0.0025 mL de muestra de ADN purificado en el paso de la luz para su medición como se muestra en la Figura 2.8.



Figura 2.8 Determinación de concentración y pureza de ADN

## **7) Secuenciación shotgun de baja profundidad**

Las muestras de ADN genómico extraído tanto del LF como del LFI se enviaron al servicio del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Genómica Microbiana del Centro de Investigación en la Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) para su análisis mediante la técnica secuenciación shotgun de baja profundidad. El análisis filogenético se realizó a partir de los genes del ARN ribosomal 16S utilizando el clasificador de taxones mg\_classifier v1.8.5.

## **2.9 Evaluación de variables operativas y microbianas**

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) tomando en consideración todas las variables del proceso, es decir tanto datos operativos, biológicos y fisicoquímicos. Se utilizó el software Statgraphics centurion XVI.I (Statpoint Technologies Inc.), ya que este programa está pensado para facilitar el estudio detallado del análisis multivariable. Se realizó el análisis considerando exclusivamente los componentes principales con el objetivo de explicar la variación total de los bioprocesos analizados con valores del parámetro eigenvalores  $>1\%$ .

## **CAPÍTULO 3**

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Montaje del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

El montaje del Reactor Anaerobio Híbrido empleado se realizó teniendo como base los parámetros de diseño del reactor operado por Juárez-García (2022). El RAH estuvo conformado por un lecho fijo (LF) en la parte superior el cual empleó como medio de soporte anillos poliméricos recubiertos con esmalte acrílico para propiciar el desarrollo de la biopelícula como se puede observar en la Figura 3.1, otra función que cumplió el LF fue permitir una distribución de flujo dentro del reactor. El lecho fluidizado inverso (LFI) se ubicó en la parte inferior del reactor como se muestra en la Figura 3.2 y empleó como soporte Extendsphere™ precolonizado, esta sección tuvo una longitud de 80 cm con un volumen total de 3.65 L.



Figura 3.1 Lecho fijo del RAH



Figura 3.2 Lecho fluidizado inverso del RAH

En la Tabla 3.1 se muestran las dimensiones del lecho fijo en donde se puede apreciar su distribución. En el LF fueron empleados un total de 235 anillos poliméricos los

cuales cubrieron el 50 % del volumen total, teniendo el 50 % restante como volumen útil.

Tabla 3.1 Dimensiones del lecho fijo (LF) del RAH

| <b>Dimensión</b>  | <b>Valor</b> | <b>Unidad</b> |
|-------------------|--------------|---------------|
| Longitud          | 23           | cm            |
| Diámetro          | 7.62         | cm            |
| Volumen total     | 1.05         | L             |
| Volumen útil      | 0.525        | L             |
| Volumen utilizado | 0.525        | L             |

El lecho fluidizado inverso tuvo un volumen total de 3.65 L , la distribución porcentual fue la siguiente, el 20 % fue empleado para el soporte pre-colonizado (lecho), un 20 % para la cámara de biogás y el 60 % restante se empleó para el volumen del líquido (volumen útil). Las dimensiones se pueden observar en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Dimensiones del lecho fluidizado inverso (LFI) del RAH

| <b>Dimensión</b>    | <b>Valor</b> | <b>Unidad</b> |
|---------------------|--------------|---------------|
| Longitud            | 80           | cm            |
| Diámetro            | 7.62         | cm            |
| Volumen total       | 3.65         | L             |
| Longitud de lecho   | 23.9         | cm            |
| Volumen del líquido | 2.19         | L             |
| Volumen de lecho    | 0.73         | L             |
| Soporte Colonizado  | 0.73         | L             |

### 3.2 Caracterización del sustrato

El sustrato empleado fue la fracción líquida de los residuos sólidos orgánicos (FL-RSO) en bruto, esta fue caracterizada mediante los parámetros de potencial de hidrógeno (pH) , sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV), demanda química de oxígeno total y soluble (DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>). Los resultados obtenidos en dicha caracterización en comparación con otros autores se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Caracterización de la FL-RSO en comparación con otros autores

| Determinación    | Unidad  | Presente investigación | Juárez-García (2022) | Pérez-Mayet (2017) |
|------------------|---------|------------------------|----------------------|--------------------|
| pH               | ---     | 4.43 ± 0.00            | 5 ± 0.2              | 4.2                |
| SST              | g / L   | 41.31 ± 0.27           | 10.6 ± 0.73          | 17.87              |
| SSV              | g / L   | 32.09 ± 1.37           | 9.48 ± 0.69          | 15.23              |
| DQO <sub>T</sub> | g DQO/L | 70.28 ± 1.38           | 39.57 ± 0.98         | 48.973             |
| DQO <sub>S</sub> | g DQO/L | 66.68 ± 0.18           | 35.48 ± 0.49         | 35.497             |

Los resultados mostraron que el pH de la FLR-RSO es de 4.43 por lo que se requirió regular el pH con NaHCO<sub>3</sub> entre 6.8 y 7.2 rango que favorece la producción de biogás. Las determinaciones de sólidos suspendidos arrojaron que alrededor de 78 % del total de SST pertenece a materia orgánica (SSV) similar al porcentaje reportado por Pérez-Mayet (2017). La demanda DQO<sub>S</sub> representó alrededor del 95 % de la DQO<sub>T</sub>, similar a la reportada por Juárez-García (2022) con un porcentaje del 90 %.

### 3.3 Caracterización del inóculo

La caracterización inicial del soporte del lecho fluidizado inverso previo a la puesta en marcha del reactor se muestra en la Tabla 3.4, en donde se aprecia el análisis de tres

diferentes muestras en tres diferentes secciones del lecho superior, media e inferior, teniendo la referencia el valor de colonización publicado por García-Rodríguez (2015) de 0.385 gBiomasa/gSoporte se obtuvieron los porcentajes de colonización. Los resultados muestran que la sección superior es la que resulta con un mayor porcentaje de colonización del 13.87 %.

Tabla 3.4 Materia Volátil Adherida al Soporte

| Sección LFI | Soporte<br>(g) | Biomasa<br>(g) | Biomasa/Soporte<br>(g/g) | Colonización<br>(%) |
|-------------|----------------|----------------|--------------------------|---------------------|
| Superior    | 0.341 ± 0.152  | 0.018 ± 0.008  | 0.053 ± 0.001            | 13.87 ± 0.368       |
| Media       | 0.465 ± 0.067  | 0.020 ± 0.002  | 0.042 ± 0.003            | 11.01 ± 0.726       |
| Inferior    | 0.659 ± 0.198  | 0.031 ± 0.007  | 0.047 ± 0.003            | 12.32 ± 0.840       |

### 3.4 Operación y monitoreo del RAH

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del monitoreo del RAH luego de 210 días de operación, divididos en 4 etapas operativas descritas en el capítulo 2.

#### 3.4.1 Monitoreo del potencial de hidrógeno

El reactor anaerobio híbrido fue alimentado con fracción líquida de residuos sólidos orgánicos la cual tiene un pH ácido entre 4.2 – 5. De acuerdo con Hussain *et al.* (2021), el rango de pH que favorece la producción de biogás oscila entre 6.4 - 7.6, por lo que la alimentación fue ajustada a un pH neutro de  $7 \pm 2$ , esto para garantizar la existencia continua de una población microbiana activa.

En los primeros 30 días de operación correspondientes al arranque del RAH la alimentación fue ajustada con NaOH 3M para alcanzar un pH neutro. Sin embargo, se

observó una acidificación del medio, obteniendo valores promedio de 5.52 y 5.25 para el pH de salida e interno, respectivamente. De acuerdo con lo reportado por Kothari *et al.* (2014), valores de pH menores a 5 puede generar la acumulación de ácidos orgánicos pues este es el rango dónde la acetogénesis se lleva a cabo, las causas se pueden atribuir a la composición de la fracción líquida de los RSO, el cambio de sustrato y el pH.

Debido a que el NaOH no ajustaba correctamente el pH a partir del día 31 de operación correspondiente al inicio de la estabilización del RAH el pH del afluente fue regulado con bicarbonato de sodio debido a su cualidad amortiguadora, lo que dio como resultado una correcta regulación del pH como se puede observar en la Figura 3.3, obteniendo en la Etapa 1 un pH promedio de 7.1, 7.8 y 6.8 para el afluente, efluente y el interior del reactor, respectivamente. Los datos obtenidos son similares a los reportados por Juárez- García, quien en esta misma etapa obtuvo valores de entre 6.6 y 7.8, alimentando FL-RSO hidrolizada a un RAH. Zamri *et al.* (2021), reportan que el rango óptimo de pH para la etapa de metanogénesis es entre 6.5 y 8.2, sin embargo, para la recuperación de alto contenido de metano en la digestión anaerobia de residuos sólidos orgánicos este varía de acuerdo a las propiedades del residuo, así como la acidez del mismo.

En la Etapa 2, luego de suministrar  $\text{NaNO}_3$  con una relación C/N= 30 se puede apreciar un ligero aumento en los valores de pH interno y del efluente, obteniendo valores promedio en esta etapa de 7.1 y 8.2, respectivamente. Este aumento se puede atribuir al inicio del proceso de desnitrificación que se estaba suscitando dentro del reactor como resultado del suministro de nitratos. La desnitrificación aumenta la alcalinidad del proceso y da como resultado un aumento en el pH del sistema, un rango óptimo de pH para dicho proceso es de entre 7 y 8, debido pH neutros son óptimos para gran parte de los microorganismos ambientales (Lee *et al.*, 2018 ;Martínez, 2004).

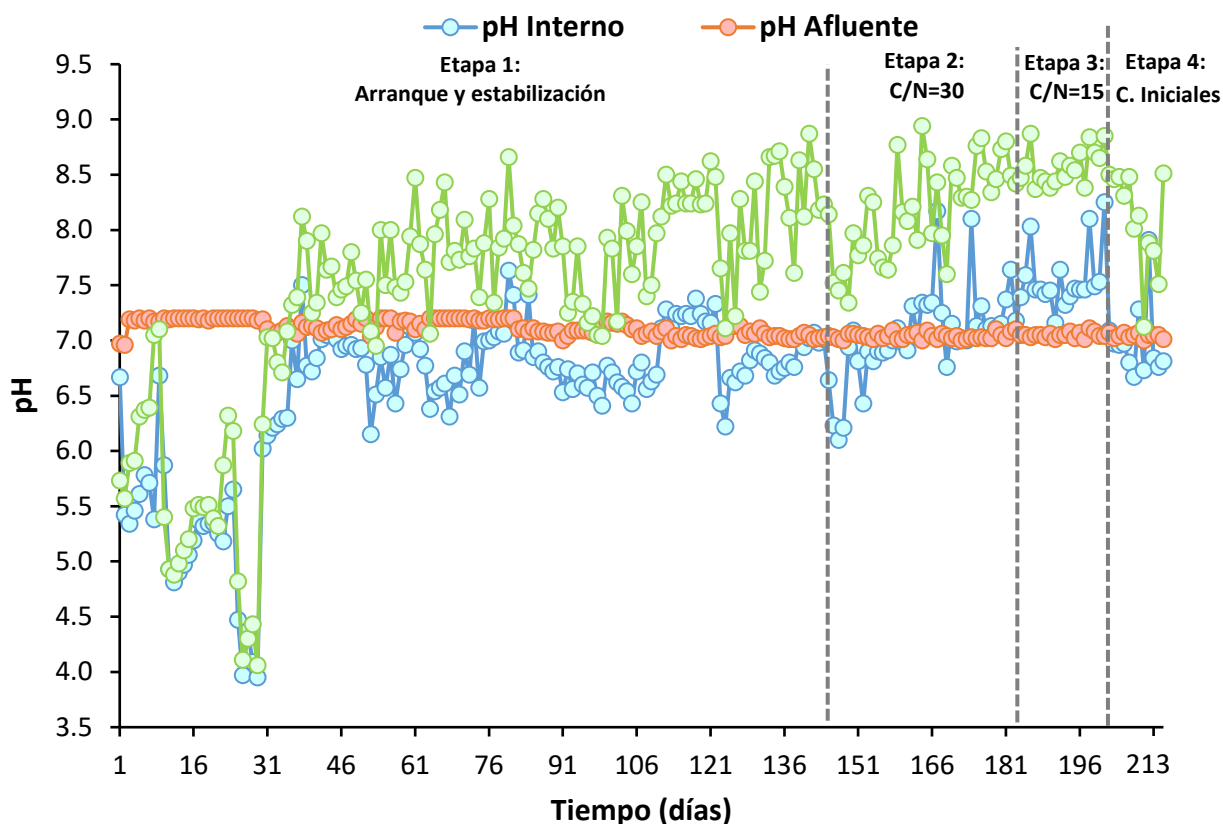


Figura 3.3 Monitoreo de pH del afluente, efluente e interno en el arranque del RAH

Un efecto similar ocurrió en la Etapa 3, en dónde la relación C/N disminuyó, es decir, aumentó la cantidad de nitratos alimentados al RAH, lo que trajo como consecuencia un aumento en los valores promedios de pH obtenidos en esta etapa, de 7.5 para el pH interno y de 8.5 para el efluente. Teniendo en cuenta a Martínez, (2004) quien reporta que un pH superior a 7.3 propicia a que el producto final de la desnitrificación sea nitrógeno molecular, se puede inferir que el pH obtenido en esta etapa se encuentra en un rango adecuado, pues la obtención de nitrógeno molecular como producto en la desnitrificación es conveniente debido a que este gas es inerte en condiciones normales. Por el contrario, en la Etapa 4, al regresar a las condiciones iniciales y suspender la adición de nitratos los valores de pH interno del reactor disminuyeron de 8.3 al final de la Etapa 3 a 6.81 al final de la Etapa 4.

### 3.4.2 Monitoreo de remoción de DQO total y soluble

#### Remoción de carbono

En la etapa de arranque se obtuvieron porcentajes de remoción de DQO total y soluble bajos como se puede apreciar en la Figura 3.4, con un promedio en los primeros 30 días de operación de 37 % y 42 %, respectivamente, esto considerando el alto porcentaje de remoción obtenido en este tipo de reactores, alcanzando remociones superiores al 95 %. El porcentaje bajo de remoción obtenido al inicio del proceso se puede atribuir a que los microorganismos emplearon el carbono para la formación de la biopelícula puesto que el soporte al arranque del reactor se encontraba colonizado sólo en un 13.87 %. A partir de los 41 días de operación, se puede apreciar una tendencia al alza en el porcentaje de remoción, viéndose reflejado en la producción de biogás. Estos resultados sugirieron que la biopelícula aumentó la colonización del soporte alrededor de estos días, permitiendo así que el flujo de carbono se fuera metabolizado hacia la producción de biogás (Fukuri y Tatara, 2010). En la etapa de estabilización se lograron obtener remociones de hasta el 99.5 y 99.7 % de DQO total y DQO soluble, respectivamente. Dichas remociones fueron superiores a lo reportado por Pérez Mayet (2017) , quien obtuvo remociones de DQO del 85 % empleando un reactor del tipo SBR alimentado con la fracción líquida de RSO. El bajo porcentaje de remoción de DQO obtenido en comparación con la presente investigación se puede atribuir a la pérdida de la biomasa microbiana en los recambios de lote. Por otro lado, Juárez- García (2022) obtuvo remociones similares a las de la presente investigación, pues obtuvo remociones superiores al 95 % alimentando un RAH con FL-RSO hidrolizada.

Por otro lado, la remoción de DQO en la Etapa 4 de remoción de carbono, disminuyó ligeramente con respecto a la Etapa 3, obteniendo remociones de 94 % y 93 % de DQO total y soluble, respectivamente. Así mismo, los resultados estuvieron por debajo de lo obtenido en la primera etapa de remoción de carbono (Etapa 1).

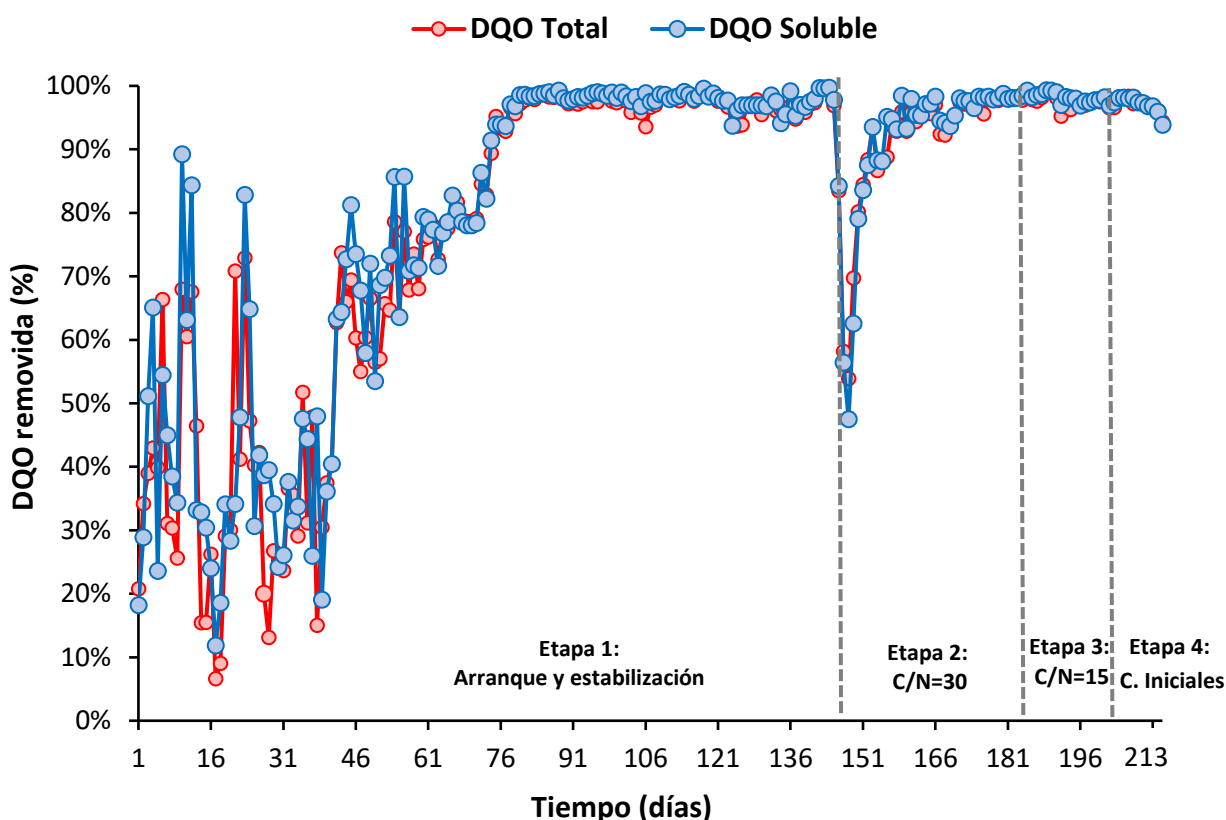


Figura 3.4 Monitoreo de remoción de DQO total y soluble

#### Remoción combinada carbono-nitrógeno

Al inicio de la Etapa 2 se puede apreciar una disminución significativa en la remoción de DQO total y soluble, disminuyendo hasta un 54 y 56 % respectivamente. Esto podría deberse al suministro de nitratos, provocando así el inicio de la remoción combinada de carbono-nitrógeno y como consecuencia la desestabilización del sistema. Sin embargo, en un lapso de tiempo corto la remoción aumentó alcanzando un valor promedio de 91 % para DQO total y soluble, lo que reafirma que el acoplamiento de la desnitrificación y la digestión anaerobia es posible cuando la fuente de carbono es de fácil asimilación y es suministrada a una relación C/N adecuada con el fin de evitar la inhibición de la metanogénesis mencionado por Akunna *et al.*, (1992).

Al suministrar una relación C/N menor en la Etapa 3, no existió una perturbación negativa en la remoción de DQO, contrario a esto, la remoción promedio en la Etapa

3 para DQO total y soluble fue del 97 y 98 %, respectivamente. Similar a lo reportado por García-Rodríguez, quien con una relación C/N= 14.5, obtuvo una remoción de 95.6 % de DQO empleando como sustrato agua residual doméstica. Se obtuvieron remociones mayores que la etapa anterior a pesar de suministrar una cantidad mayor de nitratos. Esto pudiese tener un sentido lógico, pues al tener una mayor cantidad de nitratos en el afluente, se requirió una mayor cantidad de carbono por las bacterias desnitrificantes para la reducción de nitratos a nitrógeno gaseoso. De acuerdo con los datos reportados por Chiu *et al.* (2003) teóricamente se requiere 3.51 g de acetato o 3.74 g DQO para la reducción de 1 g de nitrato.

### **3.4.3 Monitoreo de remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles**

Con respecto a la remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles se puede apreciar en la Figura 3.5 una fluctuación considerablemente en todas las etapas operativas, alcanzando valores de remoción mayores de SSV en comparación con los SST.

En la etapa de arranque y estabilización, en dónde se suministró FL-RSO cruda para la remoción de carbono, la remoción de SST y SSV promedio fue de 30 y 45 % respectivamente. Sin embargo, en algunos días alcanzó remociones de hasta el 80 % de remoción. A diferencia de lo reportado por Juárez-García (2022) quien en la etapa de estabilización obtuvo remociones de sólidos suspendidos superiores al 90 %.

En la Etapa 2 de remoción de carbono-nitrógeno la remoción de SST y SSV aumentó, alcanzando en promedio 33 % y 58 % respectivamente. Es importante mencionar que al afluente se le suministró en la Etapa 2 y 3 nitrato de sodio. Por otra parte, en la Etapa 3 se puede apreciar una disminución en los valores promedios de remoción SST, pues se obtuvo en promedio 24 %, sin embargo, los valores de SSV aumentaron ligeramente con relación a la etapa anterior, alcanzando un valor promedio de 62 %.

Con respecto a la Etapa 4, se obtuvo una remoción promedio de 41 % y 61 % de SST y SSV, respectivamente, obtenido una remoción de SST mayor a la obtenida en la etapa anterior. Al comparar las etapas de remoción de carbono (Etapa 1 y 4) se puede observar un aumento significativo en las remociones promedio de SST y SSV en la Etapa 4.

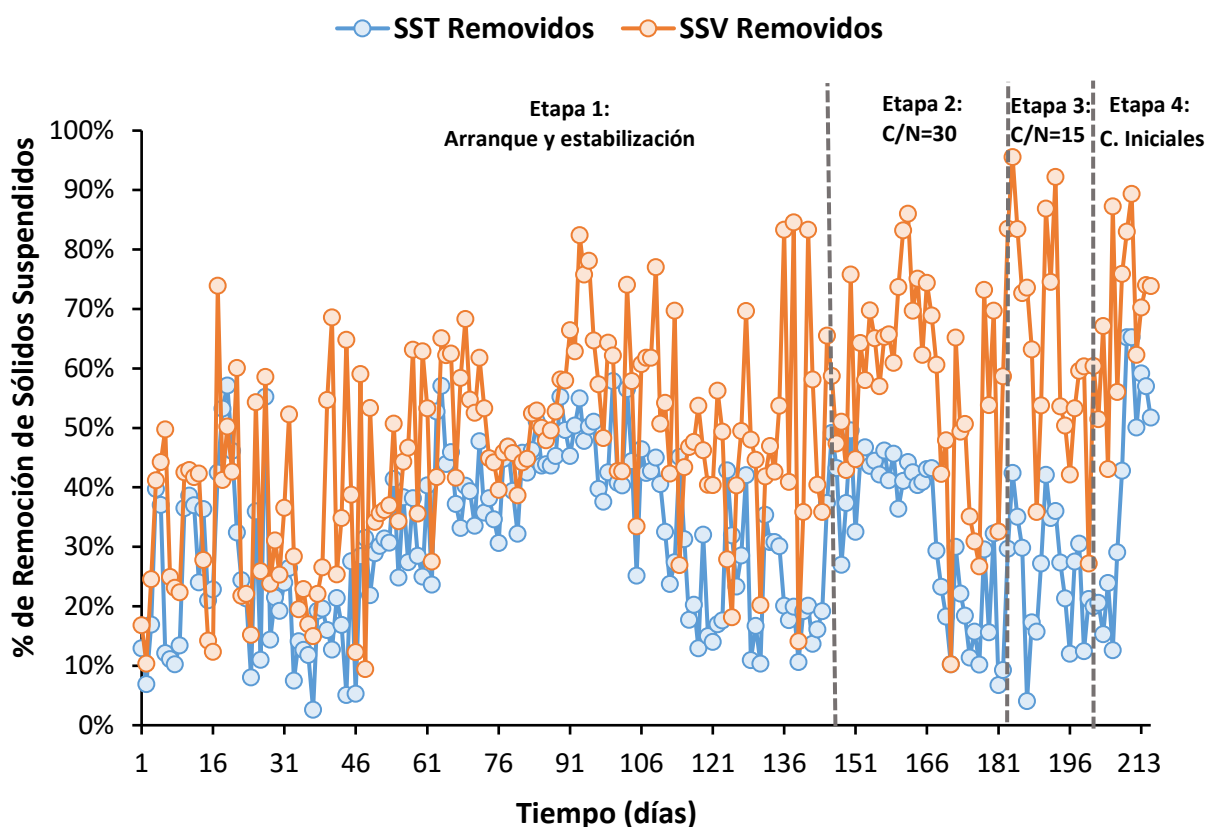


Figura 3.5 Monitoreo de remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles

#### 3.4.4 Monitoreo de alcalinidad

Con respecto a la alcalinidad se puede apreciar que en el arranque del reactor los valores del factor alfa de alcalinidad obtenidos fluctuaban considerablemente entre 0.15 y 0.9. Lo anterior se puede atribuir a la influencia del pH, debido a que hasta este día no se había logrado que el pH se mantuviera en un rango óptimo para favorecer la metanogénesis. En la estabilización del RAH se observó una tendencia a la baja en la alcalinidad, obteniéndose valores por debajo de  $\alpha = 0.3$  durante toda la etapa, que

coincide con el rango óptimo establecido por Bernard *et al.* (2000), de  $\alpha < 0.3$ , siendo este valor un indicador de la estabilidad del reactor. Cabe mencionar, que el monitoreo de este parámetro es fundamental en la operación y estabilización de un reactor pues previene una posible acidificación debido a la presencia ácidos grasos volátiles.

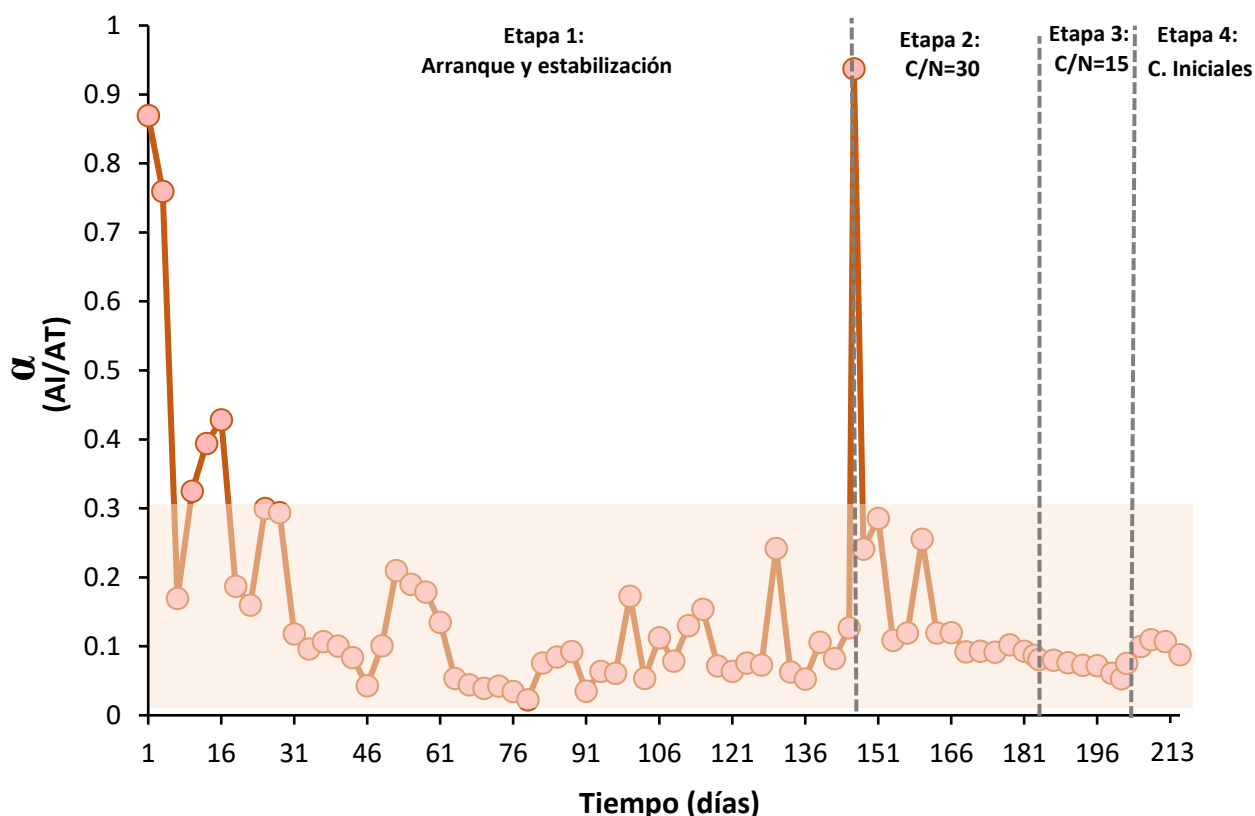


Figura 3.6 Monitoreo de alcalinidad del RAH

Al inicio de la Etapa 2 se puede apreciar un aumento abrupto en el valor del factor alfa de alcalinidad ( $\alpha=0.94$ ), lo cual se puede atribuir al cambio en la composición del sustrato y al inicio del proceso de desnitrificación. Sin embargo, luego de 2 días de operación el valor disminuyó al rango adecuado, y se mantuvo así durante el resto de la etapa, alcanzando un valor de  $\alpha = 0.086$  al finalizar la etapa.

Contrario a lo ocurrido en la Etapa 2, en la Etapa 3 no existió una diferencia significativa en el valor alfa de alcalinidad al cambio de etapa, este se mantuvo en el rango adecuado, pese a suministrar una cantidad mayor de nitratos. Se puede inferir que el sistema ya estaba adaptado al proceso de remoción simultanea de carbono y nitrógeno, por lo que, los valores de  $\alpha$  no fueron afectados. Sin embargo, se puede apreciar en la Figura 3.6 una ligera tendencia a la baja en la Etapa 3, obteniendo al final de dicha etapa un valor de  $\alpha = 0.072$ , esto se pudiera deber a que el proceso de desnitrificación genera un aumento en la alcalinidad, Martínez (2004) reporta que por cada g de  $\text{N-NO}_3^-$  reducido a nitrógeno molecular se generan 3.57 g de alcalinidad como  $\text{CaCO}_3$ . Por lo anterior, al retirar el suministro de nitratos en la Etapa 4 los valores del factor alfa de alcalinidad aumentaron ligeramente con respecto a la etapa anterior, dado que la producción de  $\text{CaCO}_3$  provocada por la desnitrificación fue interrumpida.

### **3.4.5 Monitoreo de producción de biogás**

La producción de biogás está relacionada con el consumo de la materia orgánica por parte de las poblaciones microbianas bacterianas y arqueanas metanogénicas presentes en el digester. En la etapa de arranque, la producción de biogás era baja. Se obtuvo una producción promedio de 1.37 L de biogás con un rendimiento de 0.548 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>, sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 3.7 los rendimientos en esta etapa fluctuaban de manera considerable. Después, la producción de biogás se incrementó al doble a partir del día 31, este incremento quizás ocurrió debido a la correcta regulación del pH con bicarbonato de sodio. La producción promedio de biogás en la etapa de estabilización fue de 3.47 L (0.47 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>), sin embargo, al final de la etapa se alcanzaron producciones de hasta 5.50 L de biogás. Es importante mencionar que, en esta etapa, solo se suministró FL-RSO manteniendo una  $C_{va} = 5 \text{ gDQO/L}\cdot\text{d}$ , por lo que dentro del reactor solo se llevaba a cabo el proceso de digestión anaerobia en donde las bacterias y arqueas metanogénicas empleaban el carbono biodisponible para la producción de metano, deduciendo que el biogás obtenido en esta etapa estaba constituido en su mayoría por

CH<sub>4</sub>, seguido de CO<sub>2</sub> y en bajas cantidades N<sub>2</sub>. La producción de biogás alcanzada en esta etapa se mantuvo por debajo de lo reportado por Juárez-García, (2022) , quien obtuvo una producción de biogás superior a los 10 L empleando fracción líquida de RSO hidrolizada, con una Cva superior a la suministrada en la presente investigación de 10 gDQO/L·d, lo cual explica la alta producción de biogás reportada.

Al inicio de la Etapa 2 se puede apreciar una caída en la producción y el rendimiento de biogás, por el inicio de la desnitrificación, que se logró recuperar rápidamente obteniendo así una producción promedio de biogás de 4.09 L (0.493 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>) , obteniendo incluso más biogás que en la etapa anterior.

Por otro lado, en la Etapa 3 existe una tendencia decreciente, en promedio la producción de biogás fue de 3.23 L (0.364 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>), en comparación con las etapas anteriores, esta fue la etapa con menos producción de biogás. Esto se pudiera atribuir a que el proceso de desnitrificación se estaba llevando en condiciones adecuadas y por lo tanto las bacterias desnitrificantes estaban empleando el carbono disponible como donador de electrones para la reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso, debido al aumento de nitratos en el afluente, por lo que, los consorcios bacterianos de la DA y la desnitrificación competían por la fuente de carbono, dando como resultado un efecto inhibitorio en el proceso.

No obstante, en la Etapa 4 tanto la producción como el rendimiento de biogás aumentaron significativamente con respecto a la etapa anterior, obteniendo 5.5 L (0.64 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>) al final de la etapa. Esta producción coincide con la obtenida al final de la Etapa 1, ambas etapas de remoción de carbono. Es decir, luego de la disminución en la producción y rendimiento de biogás obtenidos en la remoción combinada carbono-nitrógeno (Etapa 2 y 3) los valores lograron restablecerse.

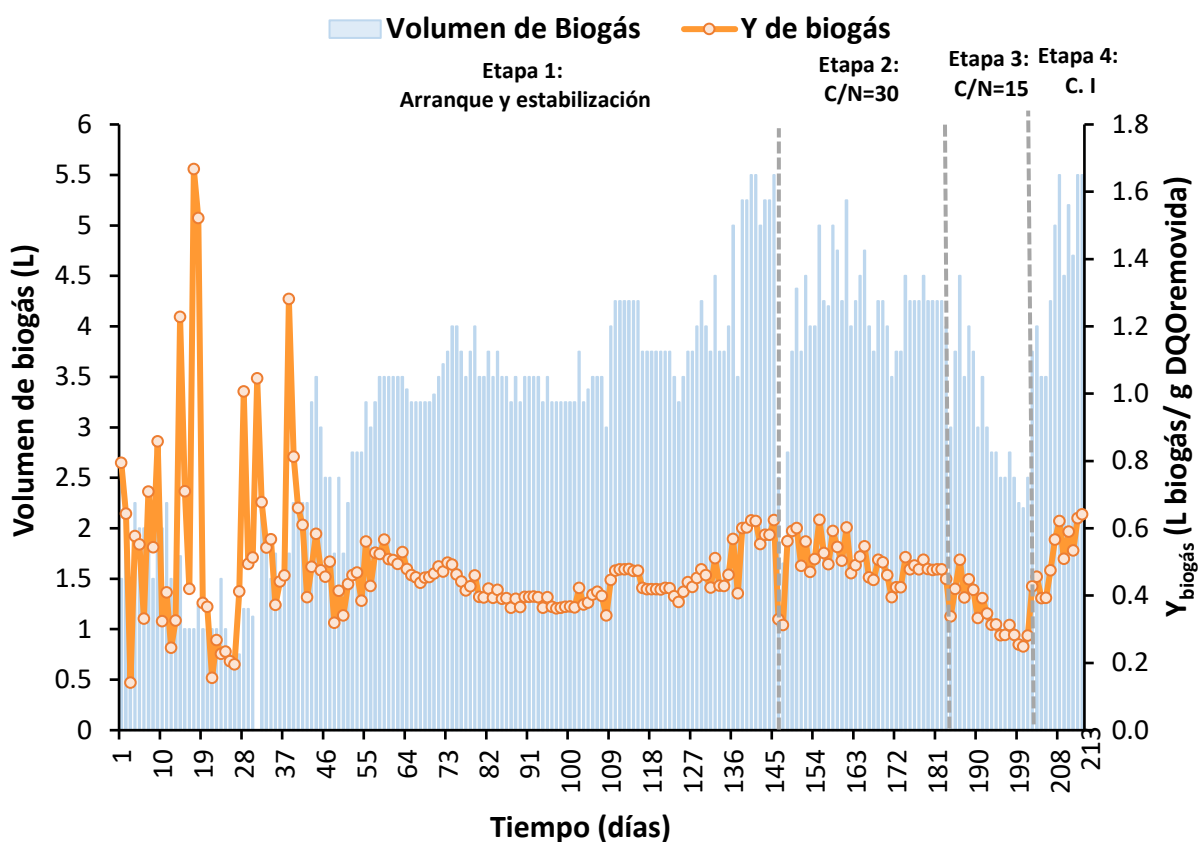


Figura 3.7 Monitoreo de producción y rendimiento de biogás

### 3.4.6 Determinaciones de remoción carbono-nitrógeno

En la Figura 3.8 se pueden observar los resultados obtenidos de remoción de nitratos en las etapas de remoción combinada carbono-nitrógeno, correspondiente a las etapas operativas 2 y 3. Se puede apreciar que desde el día 146 correspondiente al inicio de la Etapa 2, se obtuvieron remociones del 60 % de los 121.6 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  alimentados, obteniendo para el final de esta etapa remociones de hasta el 99.9 %. Por otra parte, al inicio de la Etapa 3 en la cual fueron suministrados 243.3 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  existió un decaimiento del 3 % en la remoción de nitratos respecto al final de la Etapa 2. No obstante, luego de 2 días de operación la remoción se restableció alcanzando el 100 % de remoción y manteniéndose así hasta el término de la etapa. Las remociones obtenidas al final de la Etapa 1 y 2 fueron superiores a las reportadas por Rosas-

Mendoza, 2007, quien obtuvo una remoción del 83 % de  $\text{N-NO}_3^-$ , empleando como fuente de carbono agua de bagazo.

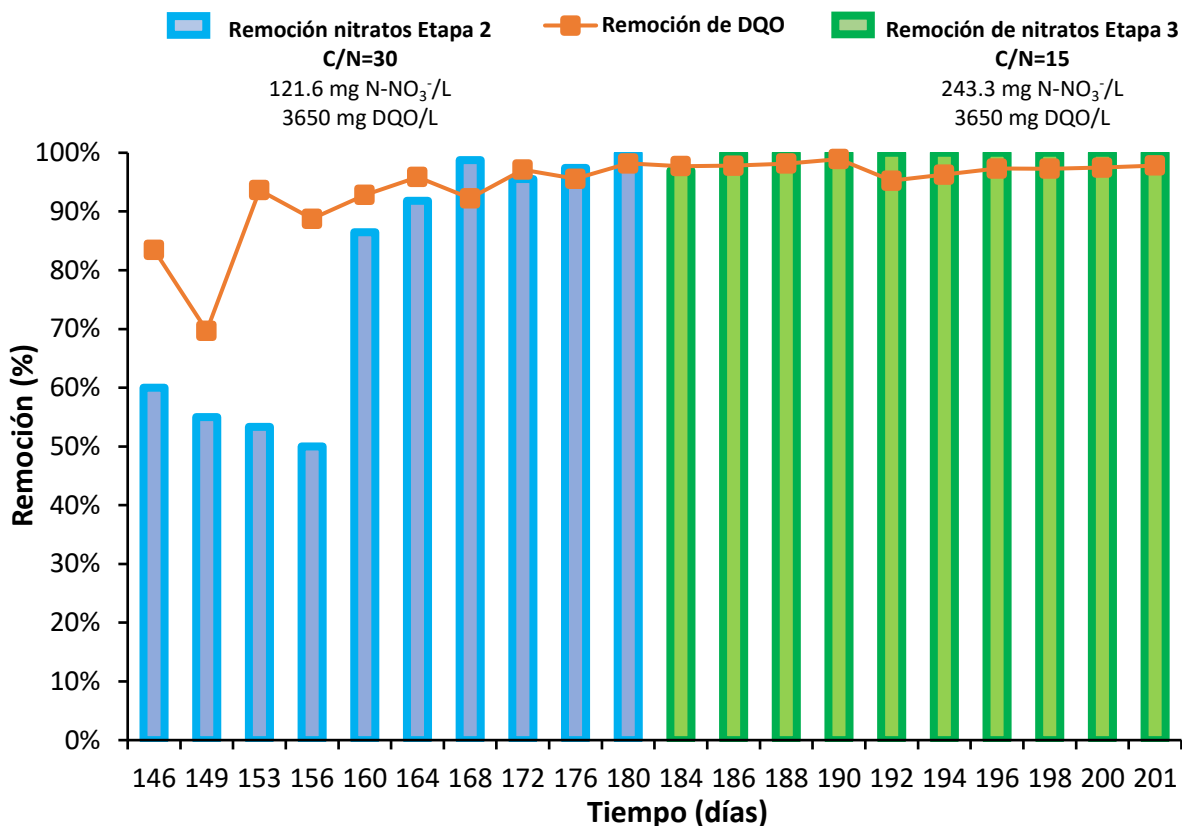


Figura 3.8 Monitoreo de remoción carbono-nitrógeno

Como se puede apreciar en la Figura 3.8 existe una relación directamente proporcional entre la remoción de nitratos y de DQO. Se podría considerar entonces que el carbono disponible fue empleado por las bacterias desnitrificantes para la conversión a nitrógeno gaseoso, explicando así las altas remociones de nitratos y de DQO obtenidas en las etapas de remoción carbono-nitrógeno. De acuerdo con Madigan *et al.*, (2008) se obtiene una mayor cantidad de energía mediante la reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso en comparación con la metanogénesis (hidrogenotrófica o acetotrófica), por lo que, con el suministro de nitratos al sistema, este se orienta al empleo de  $\text{NO}_3^-$  como aceptores de electrones, registrándose así altas remociones.

### 3.5 Biopelícula en el RAH

Los resultados obtenidos en el análisis físico de la biopelícula (MVA) se pueden observar en la Tabla 3.5. Fueron tomadas muestras de Extendsphere™ empleado como soporte en el lecho fluidizado inverso. Las muestras fueron tomadas en tres diferentes secciones del LFI: superior, media e inferior al término de cada etapa operativa.

Tabla 3.5 Materia volátil Adherida al soporte en el LFI

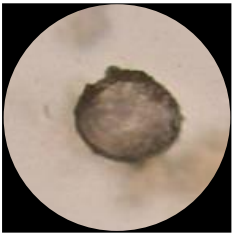
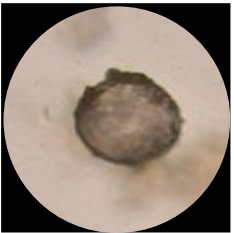
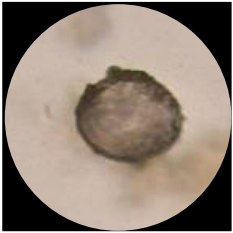
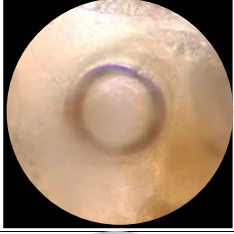
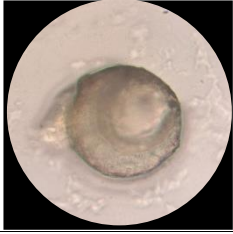
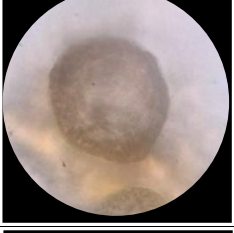
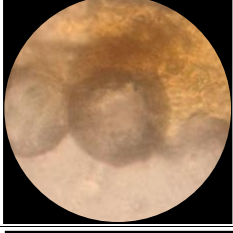
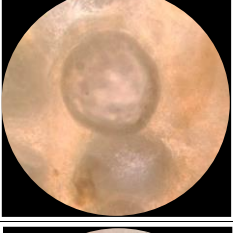
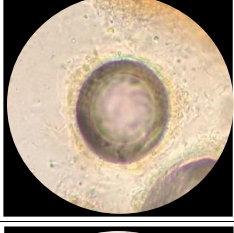
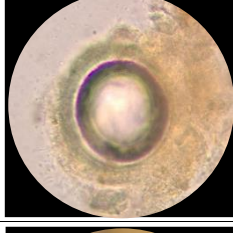
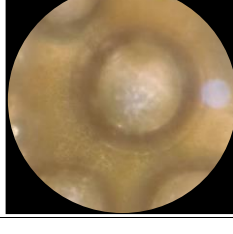
| Días de operación | Sección LFI | Soporte (g) | Biomasa (g) | Biomasa/Soporte (g/g) | Colonización (%) |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------|
| 0                 | S           | 0.341       | 0.018       | 0.053                 | 13.87            |
|                   | M           | 0.465       | 0.020       | 0.042                 | 11.01            |
|                   | I           | 0.659       | 0.031       | 0.047                 | 12.32            |
| 145               | S           | 0.240       | 0.031       | 0.129                 | 33.62            |
|                   | M           | 0.221       | 0.032       | 0.145                 | 37.67            |
|                   | I           | 0.195       | 0.030       | 0.153                 | 39.63            |
| 183               | S           | 0.198       | 0.042       | 0.213                 | 55.24            |
|                   | M           | 0.159       | 0.046       | 0.290                 | 75.35            |
|                   | I           | 0.142       | 0.036       | 0.255                 | 66.33            |
| 201               | S           | 0.142       | 0.038       | 0.270                 | 70.03            |
|                   | M           | 0.131       | 0.036       | 0.277                 | 72.04            |
|                   | I           | 0.123       | 0.032       | 0.263                 | 68.39            |
| 213               | S           | 0.172       | 0.046       | 0.267                 | 69.30            |
|                   | M           | 0.158       | 0.048       | 0.307                 | 79.64            |
|                   | I           | 0.124       | 0.041       | 0.329                 | 85.50            |

Secciones de lecho fluidizado inverso: S, superior, I, inferior, M media.

Se puede observar que existe una mayor cantidad de biomasa adherida en las secciones media y baja del LFI en la mayoría de las etapas, esto se pudiera deber a

la pérdida de biomasa adherida al soporte en la sección superior, provocada por la alimentación y recirculación directa en esta sección.

Tabla 3.6. Micrografías de la colonización del soporte fluidizado del RAH

| Días de<br>operación | Sección Superior                                                                    | Sección Media                                                                        | Sección Inferior                                                                      |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                    |    |    |    |
| 145                  |   |   |   |
| 183                  |  |  |  |
| 201                  |  |  |  |
| 213                  |  |  |  |

Luego de 213 días de operación se observó un aumento significativo en la biopelícula adherida al soporte, en promedio aumentó 0.253 g de biomasa/g de soporte (65.75 %). Dicho aumento se puede observar de manera gráfica en las micrografías observadas en la Tabla 3.6.

### 3.6 Extracción y cuantificación de ADN genómico

En esta sección se describen los resultados obtenidos de la electroforesis del ADN genómico extraído, así como la cantidad y pureza del mismo. Los resultados se describen de acuerdo a lo establecido en la metodología.

#### 3.6.1 Electroforesis de ADN genómico

La visualización de ADN genómico mediante electroforesis se muestra en la Figura 3.9, en donde se observa que tanto en las muestras del lecho fijo (D1-D4) como en las muestras del lecho fluidizado inverso (D9-D12) no hubo degradación durante la extracción de ADN genómico. Así mismo, se observa que el tamaño de los fragmentos de ADN de las muestras analizadas ronda entre los 23 130 pb y 9 416 pb, considerándose adecuadas para realizar la secuenciación shotgun.

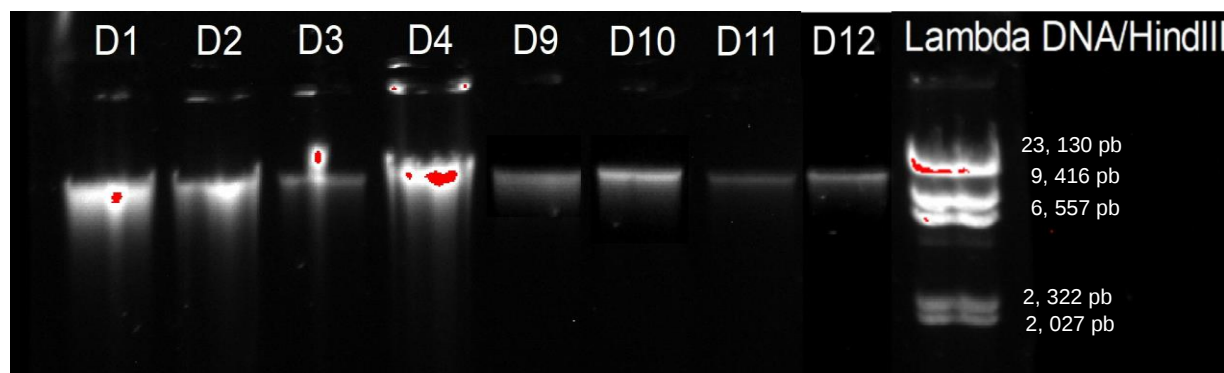


Figura 3.9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de muestras del RAH. D1 y D9: ADN Etapa 1; D2 y D10:ADN Etapa 2; D3 y D11: Etapa 3; y D4 y D12: ADN Etapa 4

Las concentraciones de ADN genómico obtenidas se muestran en la Tabla 3.7, en dónde se puede observar que las concentraciones más altas se obtuvieron en las muestras de lecho fijo, las cuales oscilaron entre 226.4 y 126.9 ng/μL, mientras que las de lecho fluidizado entre 16.4 y 22.5 ng/μL. Sin embargo, las concentraciones obtenidas en todas las muestras son suficientes, debido a que para el análisis de secuenciación shotgun se requieren de al menos 8 ng/μL.

Con relación a la pureza, la secuenciación shotgun requiere valores de  $1.8 \pm 1$ , sin embargo, algunas muestras se salían ligeramente del rango óptimo, no obstante, todas las muestras, de la D1 a D12 fueron consideradas para la secuenciación shotgun por ser representativas del sistema.

Tabla 3.7. Concentración y pureza del ADN extraído

| Clave | Descripción de la muestra                                                       | Concentración<br>(ng/μL) | Pureza<br>(260/280 nm) |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| D1    | Biopelícula adherida al soporte fijo al final de la Etapa 1                     | 226.4                    | 1.87                   |
| D2    | Biopelícula adherida al soporte fijo al final de la Etapa 2                     | 175.1                    | 1.87                   |
| D3    | Biopelícula adherida al soporte fijo al final de la Etapa 3                     | 126.9                    | 1.96                   |
| D4    | Biopelícula adherida al soporte fijo al final de la Etapa 4                     | 189.5                    | 1.88                   |
| D9    | Biopelícula adherida al soporte fluidizado sección media al final de la Etapa 1 | 16.4                     | 1.92                   |
| D10   | Biopelícula adherida al soporte fluidizado sección media al final de la Etapa 2 | 22.5                     | 1.92                   |
| D11   | Biopelícula adherida al soporte fluidizado sección media al final de la Etapa 3 | 19.7                     | 1.76                   |
| D12   | Biopelícula adherida al soporte fluidizado sección media al final de la Etapa 4 | 18.5                     | 1.68                   |

### 3.7 Caracterización de la comunidad microbiana mediante shotgun

La secuenciación shotgun reveló un total de 199 OTUs para el dominio *Archaea* y 7,793 OTUs para el dominio bacteria, pertenecientes a las 8 muestras secuenciadas. Sin embargo, para obtener una representación adecuada de los datos biológicos a nivel género y especie se consideraron dominantes aquellas poblaciones microbianas con una abundancia relativa  $\geq 1\%$ , aquellas poblaciones que no cumplían este criterio de selección se agruparon como *Minor Phyla*.

#### 3.7.1 Dinámica poblacional de dominio bacteria

El dominio bacteria presentó una gran diversidad de especies dominantes, para el lecho fijo se obtuvieron 23 especies, las cuales se pueden observar en la Figura 3.10 en función de sus abundancias relativas. Cabe mencionar que, los OTUs *Minor Phyla* en todas las etapas fueron muy numerosos, representando una abundancia de alrededor del 72 % en las etapas de remoción de carbono y del 60 % en las etapas de remoción carbono-nitrógeno, para el LF. En el LFI las abundancias de *Minor Phyla* fueron mayores, con alrededor del 80 % en todas las etapas, superior a lo obtenido en el LF.

Las especies con mayor abundancia relativa en las etapas de remoción carbono-nitrógeno (Etapas 2 y 3) en el LF fueron: *Sulfurospirillum cavolei*, una especie nitrato sulfuro reductora, así como *Ferribacterium limneticum* y *Alicyclophilus denitrificans* especies desnitrificantes. An et al., (2008) mencionan que la relación C/N requerida para una reducción total de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$  depende de las especies bacterianas presentes y de naturaleza de la fuente de carbono. Por otro lado, en las etapas de remoción de carbono (Etapas 1 y 4) las especies que mantuvieron una abundancia relativa alta fueron *Solidesulfobacillus carbinophilus*, *Mesotoga ífera* y *Atlantibacter hermannii* especies fermentadoras, así como *Trichlorobacter lovleyi*, una especie oxidadora de acetato, las cuales disminuyeron su abundancia relativa con la adición de nitratos, sin

embargo, las especies *Mesotoga ínfera* y *Atlantibacter hermannii* tuvieron un comportamiento de resiliencia al suspender el suministro de estos.

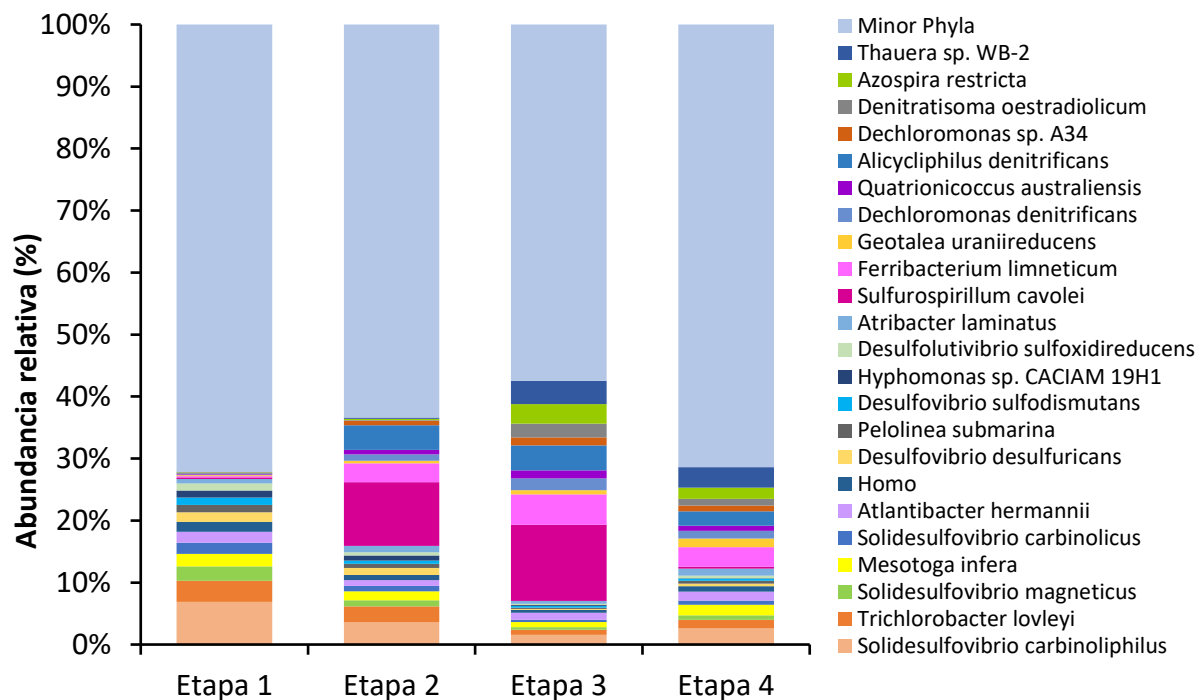


Figura 3.10 Abundancia relativa de bacterias en el lecho fijo del RAH

En la Figura 3.11 se puede observar la abundancia relativa de las bacterias en el LF en función de los grupos tróficos presentes, en dónde se puede apreciar que las bacterias desnitrificantes aumentaron su abundancia relativa en función de la adición de nitratos, aumentando de un 1.7 % en la Etapa 1 a 18.3 % en la Etapa 3, sin embargo, se mantuvieron dominantes en el sistema en la Etapa 4 con un 12 % sin la adición de nitratos. De acuerdo con lo descrito por Bickers y Van Oostrom (2000), la materia orgánica empleada en la desnitrificación es de fácil biodegradabilidad como el acetato, cuando esta fracción es escasa provoca que las cinéticas de los procesos metanogénicos sean muy lentas. Las bacterias nitrato sulfuro reductoras se mantuvieron dominantes en las Etapas 2 y 3, sin embargo, disminuyeron considerablemente en la Etapa 4, lo que sugiere que no se adaptaron a sistema. Las fermentadoras dominaron en la Etapa 1 con un 14.2 %, sin embargo, tuvieron una

tendencia negativa en las Etapas 2 y 3, disminuyendo hasta un 5.71 %. Este comportamiento sugiere que se activaron sistemas de regulación en donde el cambio de relación C/N impactó en el crecimiento de estas especies debido a que no había carbono suficiente para la asimilación de una cantidad mayor de nitrógeno, debido a esto podría asumir que las bacterias fermentadoras requieren de un incremento equivalente de carbono y nitrógeno para su crecimiento. Pese a que en la Etapa 4 la abundancia de las fermentadoras aumentó a 8.5 %, las bacterias desnitrificantes continuaron dominantes. Se observa la misma tendencia de las bacterias sulfato reductoras y las fermentadoras, pues se relacionan tróficamente esto debido a que la fermentadoras producen acetato el cual es consumido por las bacterias sulfato reductoras.

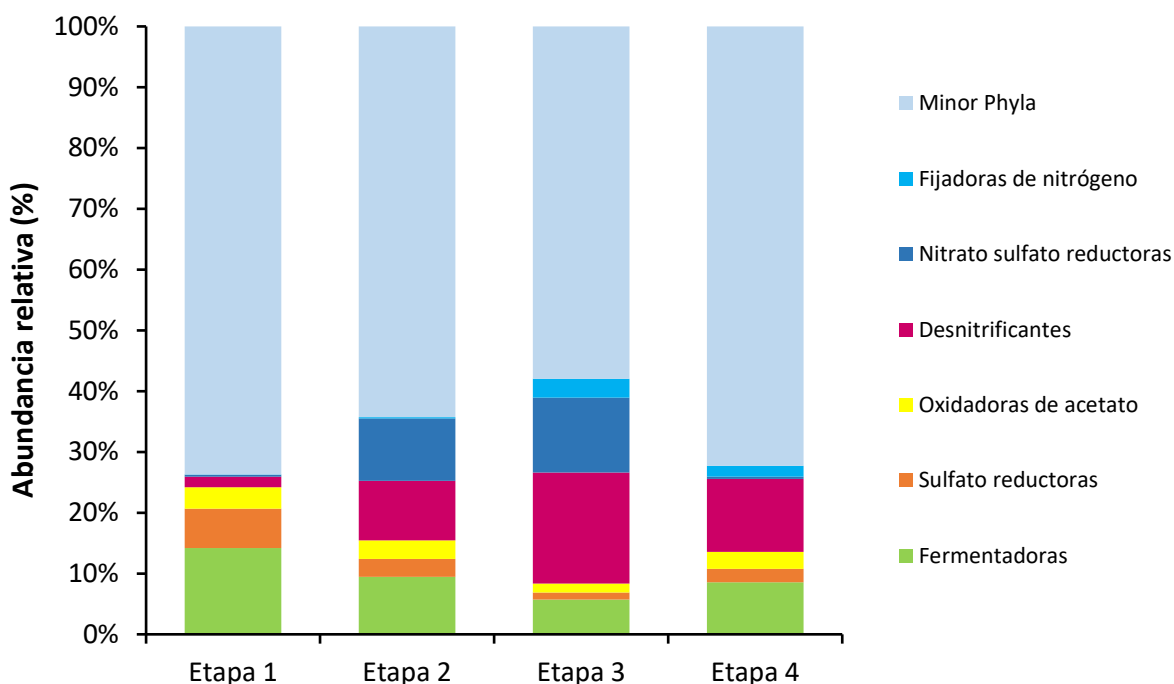


Figura 3.11 Abundancia relativa de bacterias por grupos tróficos en el lecho fijo del RAH

En el lecho fluidizado inverso se encontraron 15 especies dominantes, las cuales se pueden observar en la Figura 3.12. En las etapas de remoción carbono-nitrógeno la especie con mayor abundancia relativa en ambas etapas fue *Ferribacterium*

*limneticum* la cual tuvo una tendencia positiva a la adición de nitratos, aumentando su abundancia de 0.29 % en la Etapa 1 a 3.35 % en la Etapa 3. Con respecto a las Etapas de remoción de carbono, las especies con mayor abundancia fueron *Solidesulfovibrio carbinoliphilus* y *Atlantibacter hermannii*, quienes disminuyeron su abundancia en las Etapas 2 y 3, pero tuvieron un comportamiento de resiliencia en la Etapa 4. Las tendencias de las especies dominantes en las etapas de remoción de carbono y remoción carbono-nitrógeno en el LFI coinciden con las obtenidas en el LF.

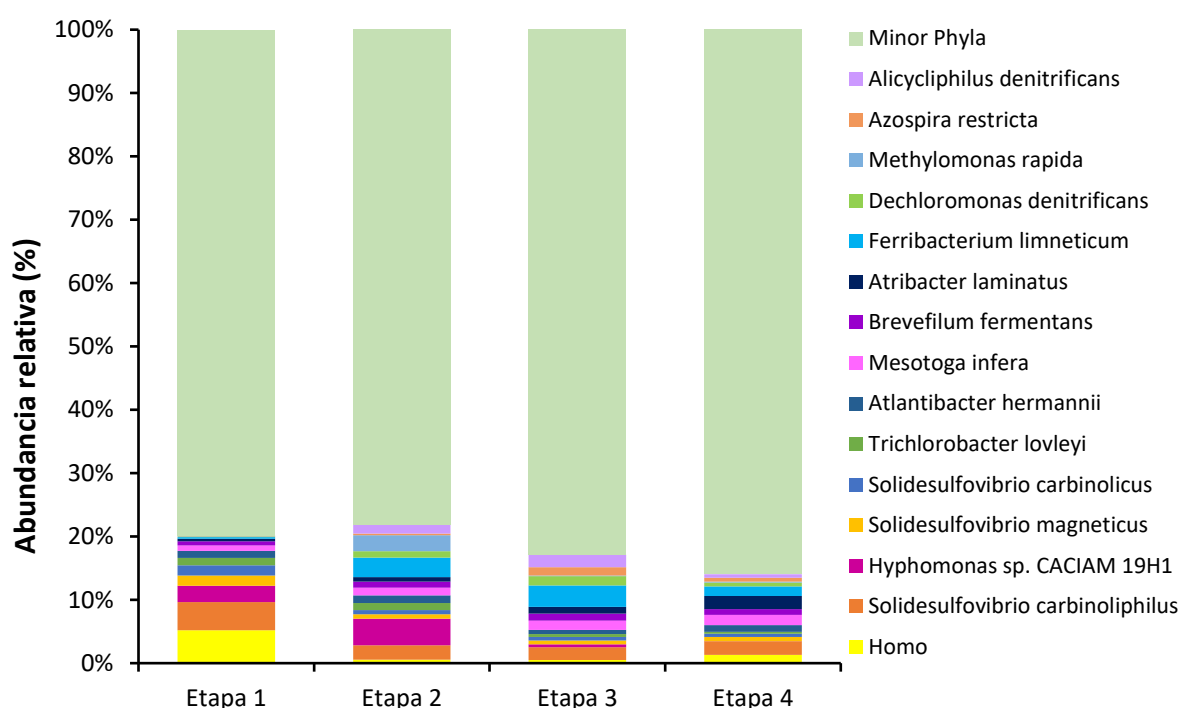


Figura 3.12 Abundancia relativa de bacterias en el lecho fluidizado del RAH

Los grupos tróficos presentes en el LFI se observan en la Figura 3.13 en dónde se puede apreciar que los fermentadores disminuyeron de manera directamente proporcional a la relación C/N, sin embargo, en la Etapa 4 al retirar el suministro de nitratos fueron resilientes, contrario a lo observado en el LF.

Las bacterias desnitrificantes por su parte, aumentaron significativamente su abundancia en la Etapa 2 con la adición de nitratos, sin embargo, su abundancia se

redujo en la Etapa 3 pese al aumento de nitratos alimentados, dicha disminución continuó hasta la Etapa 4. Esta tendencia a la baja se pudiese deber a competencias por nitrógeno y carbono. En la Etapa 3 y 4 se observó la dinámica de *Atribacter laminatus* competitiva, debido a que no comparte sustratos con ningún desnitrificante, esta competencia se podría deber a una fuente de nitrógeno, sin embargo, el pariente más cercano no asimila nitratos durante el crecimiento anaerobio de acuerdo a lo descrito por Katayama *et al.* (2020), pero la especie que está en el reactor posiblemente lo haga. Así mismo, se puede observar una competencia por fuente de carbono entre las bacterias desnitrificantes y las fijadoras de nitrógeno, pues ambos grupos emplean el mismo sustrato (acetato).

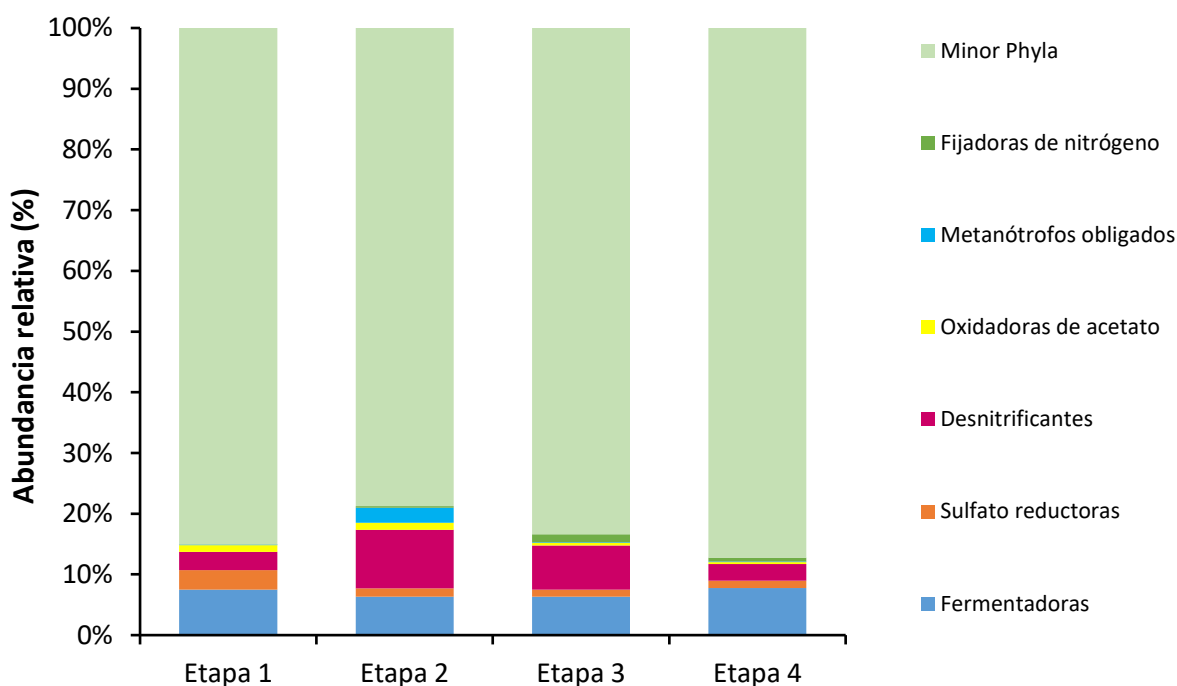


Figura 3.13 Abundancia relativa de bacterias por grupos tróficos en el lecho fluidizado del RAH

### 3.7.2 Dinámica poblacional del dominio *Archaea*

En esta sección se describirán las variaciones de las abundancias relativas de la comunidad *Archaea* tanto en el lecho fijo como en el lecho fluidizado inverso del RAH, para analizar la dinámica poblacional en función de la adición de nitratos al sistema en las Etapas 2 y 3. Del total de OTUs obtenidos para el dominio *Archaea* únicamente se consideraron como dominantes dos especies, de acuerdo al criterio antes descrito, tanto para el LF como en el LFI.

La Figura 3.14 muestra la abundancia relativa de las arqueas en el lecho fijo, en dónde se puede apreciar que *Methanothrix soehngenii* fue la especie con mayor abundancia relativa, superior al 82 % en todas las etapas del proceso. Lo anterior sugiere que la producción de biogás en el LF fue llevada a cabo por la vía acetotrófica, debido a que esta especie consume acetato para producir metano y CO<sub>2</sub> (Touzel *et al.*, 1988). La vía hidrogenotrófica estuvo a cargo de la especie *Methanobacterium formicicum*, con una abundancia relativa superior al 14 % en todas las etapas. En el lecho fijo no existió una dinámica de poblaciones notable, debido a que en todas las etapas del proceso las abundancias relativas de ambas especies no tuvieron una variación considerable.

Al igual que en el lecho fijo, en el lecho fluidizado inverso la ruta para la producción de metano fue la acetotrófica. La abundancia relativa de los acetótrofos en el LFI disminuyó en las etapas de remoción carbono-nitrógeno (Etapas 2 y 3) como se puede apreciar en la Figura 3.15, dando como resultado un aumento en la abundancia relativa de los hidrogenótrofos. Sin embargo, se puede apreciar resiliencia en los acetótrofos, debido a que en la Etapa 4, su abundancia relativa aumentó al retirar la adicción de nitratos, provocando que los hidrogenótrofos disminuyeran su abundancia.

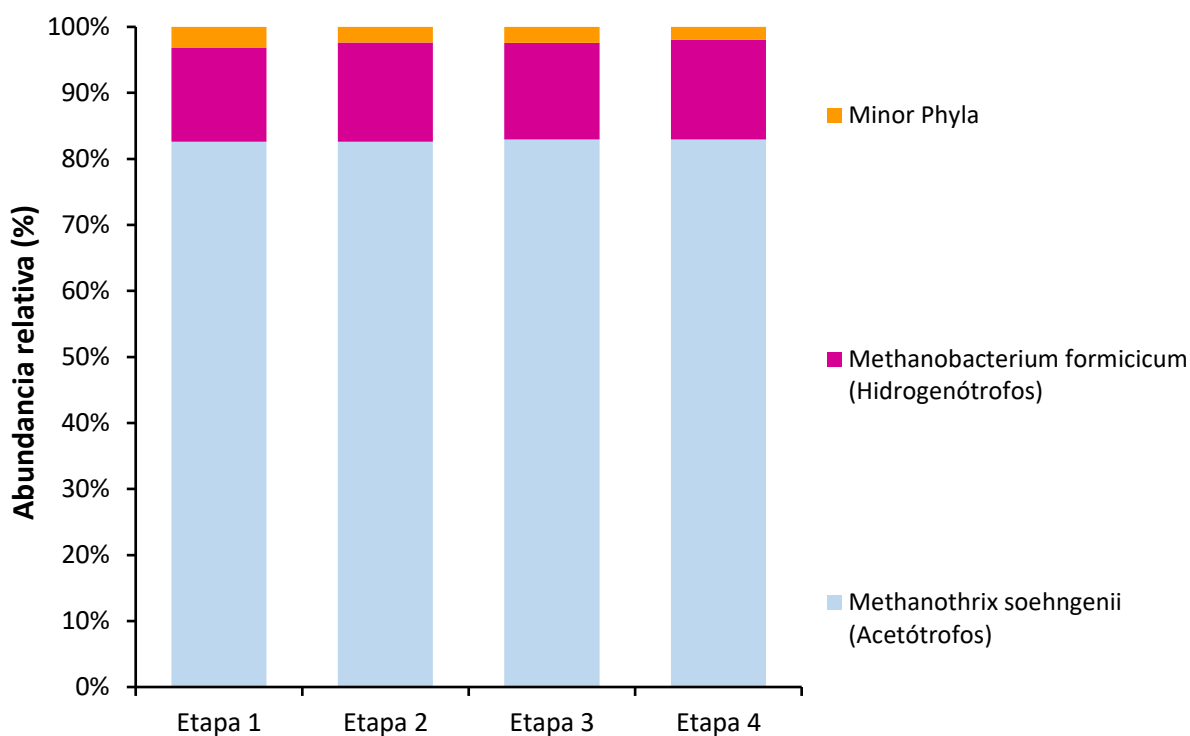


Figura 3.14 Abundancia relativa de arqueas en el lecho fijo del RAH

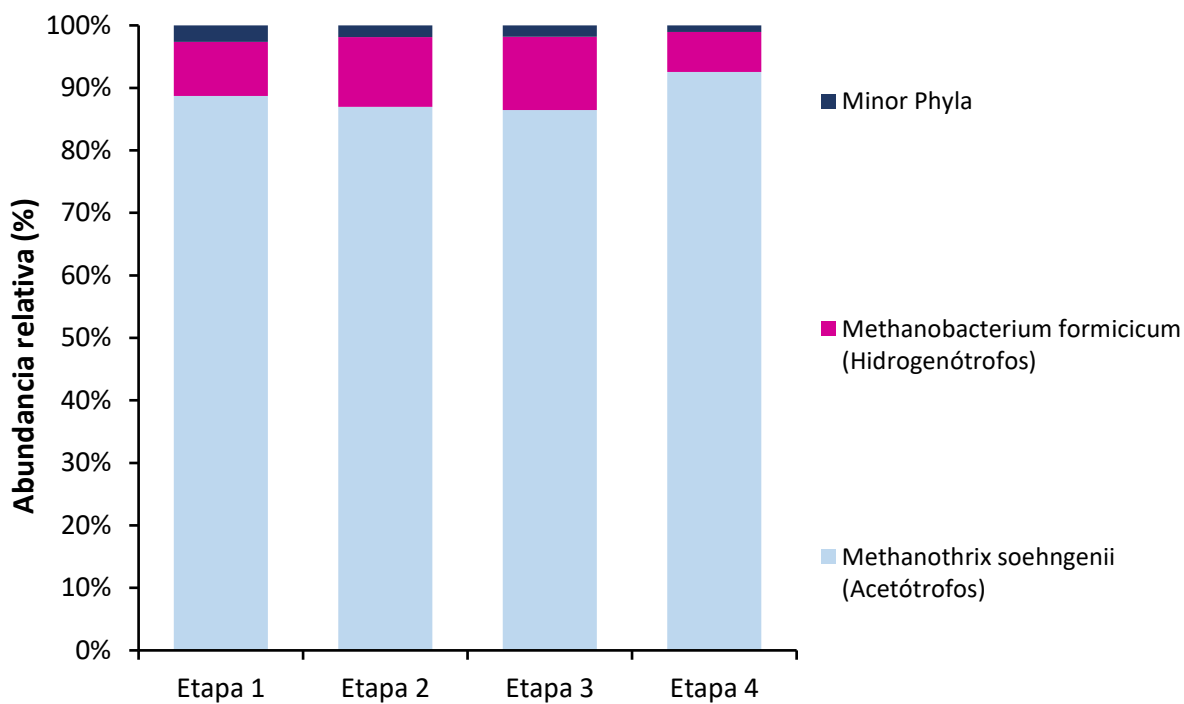


Figura 3.15 Abundancia relativa de arqueas en el lecho fluidizado inverso del RAH

### 3.7.3 Correlación de variables operativas y microbianas de la digestión anaerobia en el reactor anaerobio de biopelícula

Las variables operativas y microbianas del proceso de DA en el RAH se correlacionaron mediante un método de análisis de datos multivariados conocido como Análisis de Componentes Principales (ACP). Dicho análisis se realizó empleando el paquete estadístico Statgraphics Centurion versión XVI.I. El propósito del análisis es obtener un número reducido de combinaciones lineales de las variables que expliquen la mayor variabilidad en los datos. Se obtuvieron dos ACP, uno correspondiente al lecho fijo y uno al lecho fluidizado inverso. En la Tabla 3.8 se muestran los valores promedio de las variables fisicoquímicas de los tres últimos días de cada etapa operativa del RAH, dichos valores fueron empleados en ambos ACP.

Tabla 3.8 Variables fisicoquímicas del RAH para el ACP

| Clave          | Variable                                   | Final<br>Etapa 1 | Final<br>Etapa 2 | Final<br>Etapa 3 | Final<br>Etapa 4 |
|----------------|--------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Cva</b>     | Carga volumétrica aplicada real (gDQO/L·d) | 4.915            | 5.838            | 4.379            | 5.299            |
| <b>pHint</b>   | pH interno                                 | 6.877            | 7.397            | 7.757            | 6.803            |
| <b>DQOT</b>    | Remoción de DQO <sub>Total</sub> (%)       | 98.616           | 97.907           | 97.622           | 95.693           |
| <b>Pbiogas</b> | Producción de biogás                       | 5.333            | 4.167            | 2.317            | 5.233            |
| <b>Rbiogas</b> | Rendimiento de biogás (Lbiogás/gDQO rem)   | 0.595            | 0.468            | 0.261            | 0.601            |
| <b>Alfa</b>    | Alcalinidad ( $\alpha=IA/IP$ )             | 0.105            | 0.094            | 0.062            | 0.102            |
| <b>C/N</b>     | Relación Carbono-Nitrógeno                 | 0.000            | 30.000           | 15.000           | 0.000            |
| <b>Nitra</b>   | Remoción de nitratos (%)                   | 0.000            | 98.393           | 100.000          | 0.000            |

En la Tabla 3.9 y 3.10 se muestran los porcentajes de abundancia relativa de las especies microbianas al final de cada una de las etapas operativas del RAH, en el LF y LFI, respectivamente. Cabe mencionar que las especies involucradas en el ACP se

seleccionaron bajo el criterio de una abundancia relativa y dinámica poblacional notable en ambos lechos, seleccionando así 13 especies para el LF y 10 especies para el LFI.

Tabla 3.9 Abundancia relativa de las especies microbianas del LF para el ACP

| Clave       | Variable                                 | Final<br>Etapa 1 | Final<br>Etapa 2 | Final<br>Etapa 3 | Final<br>Etapa 4 |
|-------------|------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Scar</b> | <i>Solidesulfovibrio carbinoliphilus</i> | 6.88             | 3.56             | 1.56             | 2.59             |
| <b>Tlov</b> | <i>Trichlorobacter lovleyi</i>           | 3.40             | 2.58             | 0.81             | 1.39             |
| <b>Minf</b> | <i>Mesotoga infera</i>                   | 1.99             | 1.44             | 0.87             | 1.67             |
| <b>Aher</b> | <i>Atlantibacter hermannii</i>           | 1.75             | 0.91             | 1.15             | 1.49             |
| <b>Ddes</b> | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>       | 1.56             | 1.14             | 0.16             | 0.44             |
| <b>Scav</b> | <i>Sulfurospirillum cavolei</i>          | 0.30             | 10.26            | 12.29            | 0.34             |
| <b>Flim</b> | <i>Ferribacterium limneticum</i>         | 0.19             | 3.03             | 4.92             | 3.14             |
| <b>Dden</b> | <i>Dechloromonas denitrificans</i>       | 0.11             | 1.03             | 1.94             | 1.26             |
| <b>Aden</b> | <i>Alicyclophilus denitrificans</i>      | 0.10             | 3.97             | 3.99             | 2.32             |
| <b>Ares</b> | <i>Azospira restricta</i>                | 0.06             | 0.24             | 3.14             | 1.82             |
| <b>Twb2</b> | <i>Thauera</i> sp. WB-2                  | 0.05             | 0.16             | 3.75             | 3.28             |
| <b>Msoe</b> | <i>Methanothrix soehngenii</i>           | 82.59            | 82.60            | 82.96            | 82.94            |
| <b>Mfor</b> | <i>Methanobacterium formicicum</i>       | 14.20            | 15.01            | 14.63            | 15.10            |

Tabla 3.10 Abundancia relativa de las especies microbianas del LFI para el ACP

| Clave       | Variable                          | Final<br>Etapa 1 | Final<br>Etapa 2 | Final<br>Etapa 3 | Final<br>Etapa 4 |
|-------------|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>Scar</b> | Solidesulfovibrio carbinoliphilus | 4.46             | 2.27             | 2.00             | 2.11             |
| <b>Smag</b> | Solidesulfovibrio magneticus      | 1.61             | 0.70             | 0.61             | 0.70             |
| <b>Minf</b> | Mesotoga infera                   | 0.88             | 1.18             | 1.46             | 1.60             |
| <b>Alam</b> | Atribacter laminatus              | 0.38             | 0.71             | 1.10             | 2.05             |
| <b>Flim</b> | Ferribacterium limneticum         | 0.29             | 3.07             | 3.35             | 1.55             |
| <b>Dden</b> | Dechloromonas denitrificans       | 0.11             | 1.04             | 1.46             | 0.59             |
| <b>Ares</b> | Azospira restricta                | 0.03             | 0.24             | 1.29             | 0.60             |
| <b>Aden</b> | Alicyclophilus denitrificans      | 0.03             | 1.35             | 1.98             | 0.57             |
| <b>Msoe</b> | Methanothrix soehngenii           | 88.70            | 86.95            | 86.44            | 92.54            |
| <b>Mfor</b> | Methanobacterium formicicum       | 8.65             | 11.20            | 11.75            | 6.42             |

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del 1) ACP del LF y 2) ACP del LFI. En cada ACP se tomaron en cuenta únicamente los dos primeros componentes, explicando con esto más del 85 % de la variabilidad de los datos, en cada caso. Así mismo, en ambos casos, el criterio empleado para excluir variables en los componentes principales consistió en tomar en cuenta sólo las variables con un valor de peso superior o igual al 50 % de la variable con mayor peso, formando así grupos en cada componente principal.

### 1) Análisis de componentes principales del Lecho Fijo

Se obtuvo un número reducido de combinaciones lineales de las 21 variables para el LF que explican la mayor variabilidad en los datos. En este caso, se obtuvieron tres componentes con eigenvalores mayores o iguales que 1.0 como se muestra en la Figura 3.16.

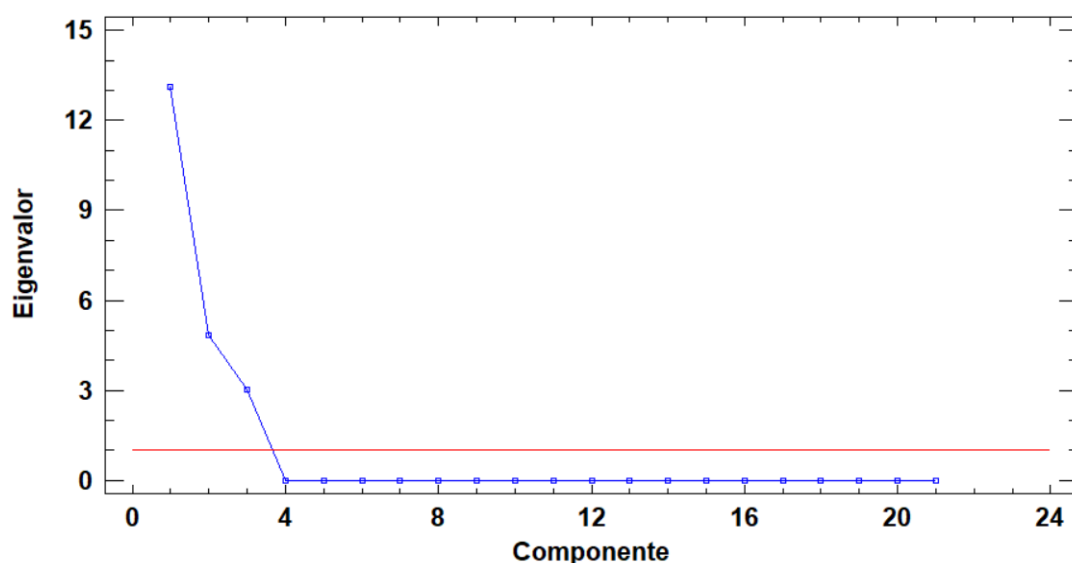


Figura 3.16 Gráfica de sedimentación del ACP del LF

Los tres componentes en conjunto explican el 100 % de la variabilidad en los datos originales, sin embargo, únicamente se describirán los dos primeros componentes, los cuales explican en conjunto el 85.57 % de la variabilidad en los datos. La confiabilidad de los datos se observa en la Tabla 3.10.

Los pesos de los componentes 1 y 2 se muestran en Tabla 3.11, los cuales se observan gráficamente en la Figura 3.17. Los grupos de variables formados en cada componente se resaltan en colores, indicando un comportamiento similar. En el Componente 1 el criterio de exclusión de variables se redujo de 0.135 a 0.11, esto debido a la importancia de la inclusión de Mfor.

Tabla 3.11 Varianza de los componentes en el ACP del LF

| Componente<br>Número | Eigenvalor | Porcentaje de<br>Varianza | Porcentaje<br>Acumulado |
|----------------------|------------|---------------------------|-------------------------|
| 1                    | 13.1246    | 62.498                    | 62.498                  |
| 2                    | 4.84607    | 23.077                    | 85.575                  |
| 3                    | 3.02935    | 14.425                    | 100                     |
| 4                    | 8.72E-16   | 0                         | 100                     |
| 5                    | 6.69E-16   | 0                         | 100                     |
| 6                    | 5.87E-16   | 0                         | 100                     |
| 7                    | 5.42E-16   | 0                         | 100                     |
| 8                    | 4.10E-16   | 0                         | 100                     |
| 9                    | 3.38E-16   | 0                         | 100                     |
| 10                   | 2.74E-16   | 0                         | 100                     |
| 11                   | 1.47E-16   | 0                         | 100                     |
| 12                   | 1.26E-16   | 0                         | 100                     |
| 13                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 14                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 15                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 16                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 17                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 18                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 19                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 20                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 21                   | 0          | 0                         | 100                     |

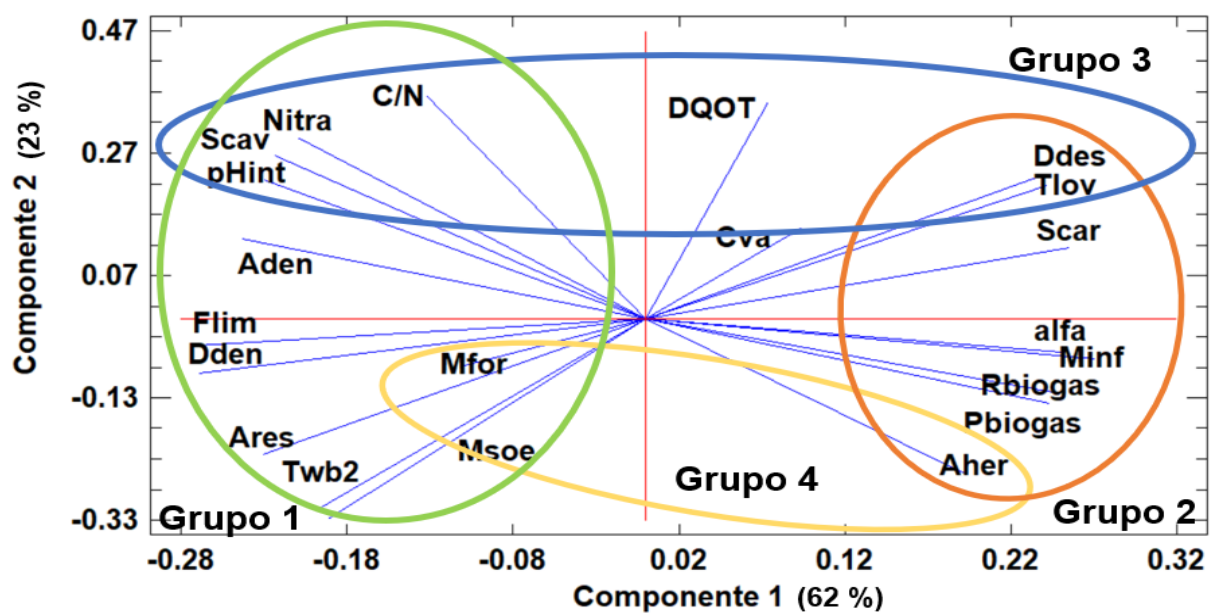


Figura 3.17 Correlaciones de las variables operativas y microbianas en el LF

Tabla 3.12 Peso de los componentes para cada variable en el LF

|         | Componente<br>1 | Componente<br>2 |
|---------|-----------------|-----------------|
| Cva     | 0.0941          | 0.1488          |
| pHint   | -0.2304         | 0.2258          |
| DQOT    | 0.0737          | 0.3542          |
| Pbiogas | 0.2493          | -0.1232         |
| Rbiogas | 0.2435          | -0.1391         |
| alfa    | 0.2506          | -0.0560         |
| C/N     | -0.1323         | 0.3642          |
| Nitra   | -0.2095         | 0.2953          |
| Scar    | 0.2552          | 0.1157          |
| Tlov    | 0.2419          | 0.2181          |
| Minf    | 0.2705          | -0.0667         |
| Aher    | 0.1931          | -0.2562         |
| Ddes    | 0.2369          | 0.2323          |
| Scav    | -0.2235         | 0.2659          |
| Flim    | -0.2710         | -0.0453         |
| Dden    | -0.2693         | -0.0909         |
| Aden    | -0.2435         | 0.1295          |
| Ares    | -0.2310         | -0.2219         |
| Twb2    | -0.1983         | -0.3137         |
| Msoe    | -0.1911         | -0.3274         |
| Mfor    | -0.1121         | -0.0799         |

El comportamiento del lecho fijo perteneciente al RAH se describe a continuación en función de las variables fisicoquímicas y microbiológicas empleadas para el ACP.

**Grupo 1.** La relación carbono-nitrógeno, así como la remoción de nitratos se correlacionaron en este primer grupo en conjunto con las especies desnitrificantes tales como *Ferribacterium limneticum* (Flim), *Dechloromonas denitrificans* (Dden), *Alicyclophilus denitrificans* (Aden) y *Thauera sp. WB-2* (Twb2). Así mismo se relacionaron con *Azospira restricta* (Ares) una especie fijadora de nitrógeno y *Sulfurospirillum cavolei* (Scav) una especie nitrato sulfuro reductora, esta relación se debe al aumento de su abundancia relativa en función de la adición de nitratos al

sistema, lo que trajo como consecuencia un aumento en el porcentaje de remoción de nitratos. *Methanotherix soehngeni* (Msoe), una *archaea* acetótrofa se ve involucrada en este grupo, debido a la competencia por sustrato (acetato) con Scav, Dden, Flim y Ares, debido a que estas especies emplean el acetato como donador de electrones para la reducción de nitrato mientras que, Msoe emplea el acetato para la producción de metano y CO<sub>2</sub>. *Methanobacterium formicicum* (Mfor) también se encuentra presente en este grupo debido a competencia por el H<sub>2</sub> disponible con Scav, quien emplea H<sub>2</sub> en presencia de acetato para reducir nitrato a nitrito, mientras que Mfor utiliza el H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> para producir metano (Bryant y Boone, 1987). Las arqueas metanógenas se vieron favorecidas al aumentar el pH interno del RAH en las etapas de remoción carbono-nitrógeno, debido a que el pH óptimo de *Methanotherix soehngeni* y *Methanobacterium* oscila entre 7 – 7.75 (Touzel *et al.*, 1988; Mauerhofer *et al.*, 2018) lo que pudo permitir a las arqueas mantenerse dominantes pese a las competencias presentes en el sistema.

**Grupo 2.** En este grupo se encuentra relacionados la producción y el rendimiento de biogás con bacterias fermentadoras tales como *Solidesulfovibrio carbinoliphilus* (Scar), *Mesotoga ífera* (Minf), *Atlantibacter hermannii* (Aher) y *Desulfovibrio desulfuricans* (Ddes). Esta correlación se debe a que al disminuir la abundancia relativa de estas especies, el rendimiento y la producción de biogás se vieron afectados en las etapas de remoción carbono-nitrógeno, debido a la disminución de acetato producido por estas especies, el cual, es empleado como sustrato por arqueas metanógenas para producción metano. El factor alfa de alcalinidad se encuentra en este grupo, pues tuvo una tendencia decreciente al igual que la producción y rendimiento de biogás debido a la introducción de nitratos al sistema en la Etapa 2 y 3. *Trichlorobacter lovleyi* (Tlov) se encuentra dentro de este grupo al estar relacionada sintroficamente con las especies fermentadoras, debido a que Tlov es una especie acetato oxidante de acuerdo con lo descrito por Sung *et al.* (2006).

**Grupo 3.** En este grupo se relacionó Scav una especie nitrato sulfuro reductora, Tlov una oxidadora de acetato y Ares una fijadora de nitrógeno, esta correlación se debió a la competencia por acetato entre las especies, en dónde Scav en las etapas de remoción carbono-nitrógeno se vio favorecida, aumentando su abundancia relativa significativamente, lo que dio como resultado un aumento en la remoción de nitrógeno y en una ligera disminución en la remoción de DQO total. Así mismo se relacionó Ddes una especie fermentadora, debido a que esta fue la encargada de proveer el acetato en este grupo. El pH interno y la relación C/N también formaron parte de este grupo, pues al reducir una mayor cantidad de nitratos el pH interno del sistema aumentó, debido a la formación de carbonato calcio proveniente de la reducción de nitrato (Martínez, 2004).

**Grupo 4.** En este grupo se relacionó Aher, una especie fermentadora que produce ácidos, en los se puede inferir que se encuentran el ácido píválico y acetato, esta especie se correlacionó sintróficamente con la arquea acetótrofa Msoe, al emplear acetato para la producción de biogás y con *Thauera sp. WB-2* quien emplea ácido píválico como aceptor de electrones en la reducción de nitrato de acuerdo con lo mencionado por Mao *et al.* (2010).

## **2) Análisis de componentes principales del Lecho Fluidizado Inverso**

Se obtuvo un número reducido de combinaciones lineales de las 18 variables que explican la mayor variabilidad en los datos. En este caso, se extrajeron tres componentes los cuales tuvieron eigenvalores mayores o iguales que 1.0. como se muestra en la Figura 3.18. Únicamente se describirán los dos primeros componentes, los cuales explican en conjunto el 87.78 % de la variabilidad en los datos. La confiabilidad de los datos se observa en la Tabla 3.12.

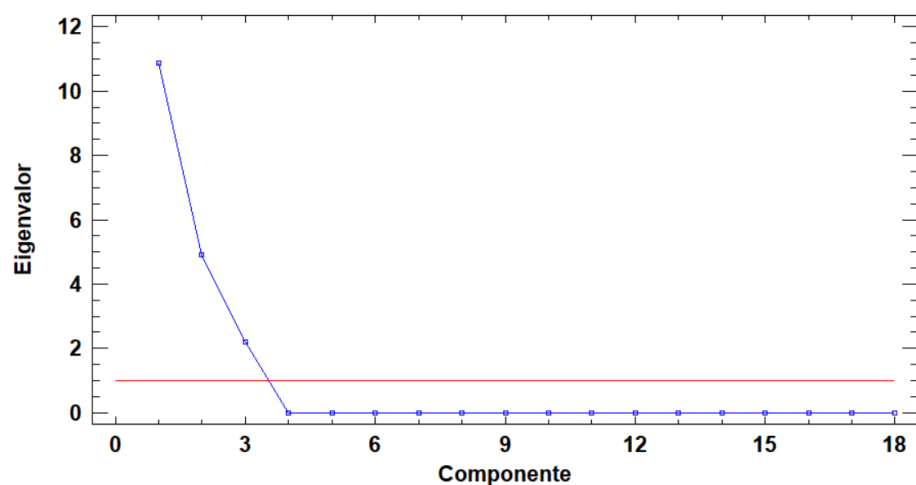


Figura 3.18 Gráfica de sedimentación del ACP del LFI

Tabla 3.13 Varianza de los componentes en el ACP del LFI

| Componente<br>Número | Eigenvalor | Porcentaje de<br>Varianza | Porcentaje<br>Acumulado |
|----------------------|------------|---------------------------|-------------------------|
| 1                    | 10.8845    | 60.47                     | 60.47                   |
| 2                    | 4.9171     | 27.317                    | 87.787                  |
| 3                    | 2.19836    | 12.213                    | 100                     |
| 4                    | 1.07E-15   | 0                         | 100                     |
| 5                    | 5.98E-16   | 0                         | 100                     |
| 6                    | 5.84E-16   | 0                         | 100                     |
| 7                    | 3.75E-16   | 0                         | 100                     |
| 8                    | 3.08E-16   | 0                         | 100                     |
| 9                    | 2.69E-16   | 0                         | 100                     |
| 10                   | 1.15E-16   | 0                         | 100                     |
| 11                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 12                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 13                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 14                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 15                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 16                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 17                   | 0          | 0                         | 100                     |
| 18                   | 0          | 0                         | 100                     |

El peso de los componentes 1 y 2 se observan en la Tabla 3.12 y se muestran de manera gráfica en la Figura 3.19. En diferentes colores se resaltan los grupos de variables formados para describir el lecho fluidizado inverso considerando el criterio de variables antes descrito.

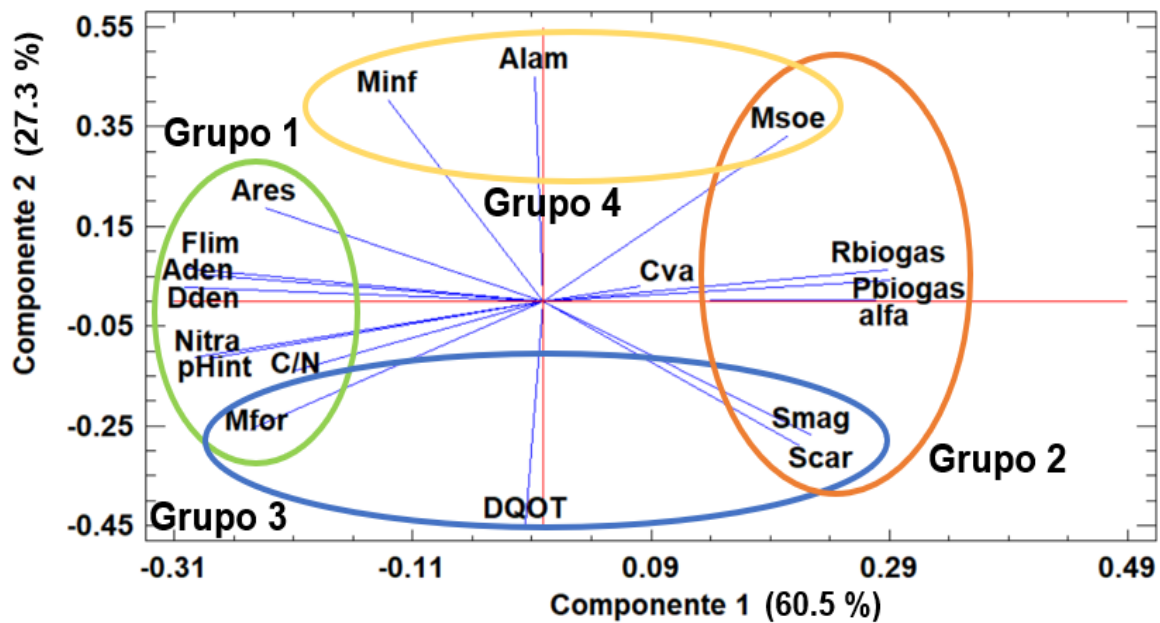


Figura 3.19 Correlaciones de las variables operativas y microbianas en el LFI

Tabla 3.14 Peso de los componentes para cada variable en el LFI

|                | Componente<br>1 | Componente<br>2 |
|----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Cva</b>     | 0.0821          | 0.0296          |
| <b>pHint</b>   | -0.2932         | -0.1119         |
| <b>DQOT</b>    | -0.0150         | -0.4491         |
| <b>Pbiogas</b> | 0.2916          | 0.0416          |
| <b>Rbiogas</b> | 0.2897          | 0.0630          |
| <b>alfa</b>    | 0.2793          | 0.0025          |
| <b>C/N</b>     | -0.2106         | -0.1406         |
| <b>Nitra</b>   | -0.2813         | -0.1159         |
| <b>Scar</b>    | 0.2152          | -0.2913         |
| <b>Smag</b>    | 0.2250          | -0.2706         |
| <b>Minf</b>    | -0.1314         | 0.4054          |
| <b>Alam</b>    | -0.0076         | 0.4505          |
| <b>Flim</b>    | -0.2890         | 0.0533          |
| <b>Dden</b>    | -0.2995         | 0.0641          |
| <b>Ares</b>    | -0.2340         | 0.1880          |
| <b>Aden</b>    | -0.3022         | 0.0278          |
| <b>Msoe</b>    | 0.2048          | 0.3324          |
| <b>Mfor</b>    | -0.2470         | -0.2589         |

El comportamiento del lecho fluidizado inverso del RAH se describe a continuación en función de las variables fisicoquímicas y microbiológicas empleadas para el ACP.

**Grupo 1.** En este grupo se correlacionó pH interno del RAH, así como la relación C/N y la remoción de nitratos con bacterias desnitrificantes tales como Flim, Aden y Dden así mismo se correlacionó con Ares una especie fijadora de nitrógeno, debido a su tendencia positiva a la ingesta de nitratos al sistema. Así mismo se correlacionaron con la vía CO<sub>2</sub> reductora a través de Mfor.

**Grupo 2.** La producción y rendimiento de biogás, así como el factor alfa de alcalinidad se correlacionaron en este grupo en conjunto con Msoe, una *Archaea* consumidora de acetato para producir metano, lo que sugiere que en el LFI la producción de biogás se llevó a cabo por la vía acetótrofa, siendo Scar una de las especies encargadas de

proveer esta fuente de carbono. Smag, una especie sulfato reductora también estuvo presente en este grupo, debido a la competencia por sustrato (acetato) con los acetótrofos.

**Grupo 3.** En este grupo se correlacionó la DQO total la cual fue influenciada por Scar una especie sulfato reductora productora de acetato, butirato y propionato (Allen *et al.*, 2008). Así mismo, se relacionó Smag una especie sulfato reductora consumidora de acetato, uno de los productos de Scar. La especie hidrogenótrofa Mfor, se correlacionó en este grupo, esto se podría deber a que los productos obtenidos por Smag, son la fuente de carbono de otras poblaciones que oxidan estos productos y generan H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, tales como *Solidesulfobacillus carbinolicus* y *Denitratisoma oestradiolicum* productoras de CO<sub>2</sub> a partir de ácidos grasos presentes en el RAH (Nanninga y Gottschal, 1987; Fahrbach *et al.*, 2006), correlacionándose así con los hidrogenótrofos de manera indirecta.

**Grupo 4.** En este grupo se correlacionaron dos especies fermentadoras Minf y Alam, ambas productoras de acetato y CO<sub>2</sub>, dichos productos metabólicos fueron empleados por la arquea acetótrofa Msoe para la producción de metano.

## CONCLUSIONES

Se operó un reactor anaerobio híbrido en condiciones mesofílicas empleando como soporte en el LFI Extendsphere™, el cual contaba con una colonización promedio inicial del 12.4 % (0.048 gbiomasa/gsoporte). Dicha colonización aumentó en función de los días de operación, obteniendo al término de la operación del reactor una colonización de 78.1 % (0.301 gbiomasa/gsoporte). El reactor empleó como fuente de carbono FL-RSO, la cual presentó un pH de 4.43, una DQO<sub>T</sub> de 70.28 g DQO/L de la cual un 94.87 % correspondió a la DQO<sub>S</sub>, con 41.31 g SST/L y 32.09 g SSV/L. La estabilización del reactor en la Etapa 1 se alcanzó a los 72 días de operación con un valor  $\alpha = 0.041$  y un porcentaje de remoción de DQO total y DQO soluble de 85 % y 86 %, respectivamente. Se alcanzaron remociones altas de DQO total y soluble al final de la Etapa 1 de hasta el 99 % viéndose reflejado en la producción de biogás de hasta 5.5 L al día, por lo que se puede considerar que los RSO son una opción viable para ser empleados como fuente de carbono obteniendo un desempeño adecuado del reactor.

Al suministrar nitratos al sistema en la primera etapa de remoción carbono-nitrógeno (Etapa 2) la remoción de DQO<sub>T</sub> se vio afectada, disminuyendo hasta un 54 %, sin embargo, luego de la adaptación de los microorganismos al estrés causado por este suministro, se lograron recuperar y estabilizar las remociones de DQO<sub>T</sub> superiores al 95 %, dicha estabilidad se mantuvo incluso al suministrar una cantidad mayor de nitratos en la Etapa 3. Esta misma tendencia de estabilidad al aumento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue observada en la remoción de nitratos, iniciando en la Etapa 2 con remociones del 60 % y aumentando en función a la cantidad de nitratos suministrados hasta alcanzar el 100 % de remoción al final de la Etapa 3. Así mismo, se observó que la adición de nitratos al sistema afectaba negativamente a la producción y rendimiento de biogás, disminuyendo directamente proporcional a la relación C/N, pues al final de la Etapa 2 con una relación C/N=30 se produjeron 4.16 L 0.(0.467 L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>) mientras que al final de la Etapa 3 con una relación C/N=15 se obtuvieron 2.31 L (0.267

L biogás/gDQO<sub>removidos</sub>). Sin embargo, al retirar la fuente de nitratos en la Etapa 4 la producción y rendimiento de biogás se recuperó significativamente, aumentando hasta alcanzar valores cercanos a la Etapa 1. De acuerdo a la resiliencia observada en las especies fermentadoras y la disminución de las bacterias desnitrificantes en la Etapa 4, se demuestra la reversibilidad del proceso con una relación C/N=15.

El análisis de la composición de las comunidades microbianas en la biopelícula del lecho fijo y del lecho fluidizado inverso a través de secuenciación shotgun de baja profundidad reveló un total de 199 OTUs para el dominio *Archaea* y 7,793 OTUs para el dominio *Bacteria*. Para el dominio *Bacteria* las especies más abundantes fueron *Solidesulfovibrio carbinolophilus*, *Atlantibacter hermannii*, *Mesotoga ífera*, *Ferribacterium limneticum*, *Alicyclophilus denitrificans* y *Sulfurospirillum cavolei*. La principal ruta metabólica para la producción de metano se llevó a cabo tanto en el LF como en el LFI a través de la ruta acetótrofa por la especie *Methanothrix soehngenii*, quien fue la arquea dominante con una abundancia superior al 85 % en ambos lechos. Con respecto a las bacterias desnitrificantes, se observó en ambos lechos una dinámica diferente. En el LF, las bacterias desnitrificantes aumentaron en función a los nitratos adicionados y se mantuvieron dominantes a pesar de la suspensión de nitratos alimentados, contrario a lo ocurrido en el LFI, en dónde las bacterias desnitrificantes aumentaron inicialmente al adicionar nitratos en la Etapa 2, sin embargo, disminuyeron significativamente su abundancia al aumentar los nitratos adicionados en la Etapa 3, esto se podría deber a la competencia por fuentes de carbono y nitrógeno con las bacterias fijadoras de nitrógeno y fermentadoras.

El análisis de componentes principales reveló que en ambos lechos que la producción, el rendimiento de biogás y la alcalinidad estaban fuertemente influenciados por la presencia de bacterias fermentadoras, lo que tiene un sentido lógico pues estas bacterias producen el sustrato empleado por las arqueas acetótrofas para la producción de metano. Por otro lado, la relación carbono-nitrógeno, así como la remoción de nitratos se correlacionaron en ambos lechos con bacterias desnitrificantes

y arqueas acetótrofas, lo que demuestra la competencia por la fuente de carbono (acetato) y explica el bajo desempeño del reactor en función a la producción y rendimiento de biogás en las etapas de remoción combinada carbono-nitrógeno.

## RECOMENDACIONES

Con relación a la configuración del reactor, se recomienda diseñar una trampa en el medio de los lechos que impida ascender al Extendsphere™ al lecho fijo, evitando que las comunidades de ambos lechos se combinen, y evitando así la obstrucción de las tuberías por el soporte.

Se recomienda evaluar nuevas relaciones de carbono-nitrógeno hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del proceso metanogénico, evaluando en conjunto la composición de biogás obtenido mediante cromatografía de gases para tener una mejor relación entre el metano y el nitrógeno producido en cada relación C/N.

En este estudio se operó el reactor a una carga volumétrica constante en todas las etapas operativas, sin embargo, se recomienda en futuras investigaciones variar tanto la carga volumétrica aplicada como la relación carbono-nitrógeno para observar la tendencia de los datos ante el cambio de estas dos variables.

---

## **ANEXO A. Protocolo para la colecta y conservación de muestras destinadas a la extracción de ácidos nucleicos (BIOMOL-1 Conservación de muestras)**

### **I. Muestras de biopelícula microbiana adherida a tubos de PVC**

El uso de guantes de látex es obligatorio y recuerde que la muestra debe mantenerse el mayor tiempo posible hundida en hielo frapo o alguna criocaja fría para evitar la degradación del ADN. Antes de iniciar cualquier manipulación limpie la mesa de trabajo con etanol al 70%. NOTA: Es importante medir simultáneamente la materia seca, SSV, SST o algún otro parámetro que permita relacionar la cantidad de ADN de la muestra con una medición del crecimiento o cantidad de biomasa de la misma muestra.

1. Unos días antes de iniciar la colecta de la muestra se esteriliza por calor húmedo y presión un mortero con pistilo por cada muestra usando una autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121 °C) durante 15 minutos.
2. Al finalizar la esterilización se deja secar el mortero y el pistilo esterilizados, después se colocan ambos en un congelador a -20 °C durante 2 horas como mínimo antes de la colecta de la muestra.
3. Ahora verifique que se tiene suficiente tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M, N- Lauroyl sarcosina al 10%, espátulas y otros materiales esterilizados para colectar la muestra. Si no tiene los reactivos y materiales necesarios entonces prepárelos antes de la colecta tal como se indica al final de este protocolo. Recuerde también etiquetar 8 microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug tanto en el tapón como en la pared del tubo con la clave asignada a cada muestra colectada. Se sugiere tener esos tubos etiquetados en la criocaja a -20 °C listos para ser utilizados al final del procedimiento.

NOTA: Recuerde que el Tiocianato de guanidina es una sustancia mutagénica usada como desnaturalizante de proteínas para desactivar las nucleasas contenidas en la muestra de biomasa. Dado que se trata de una sustancia mutagénica, se deben usar guantes y evitar el contacto o derrame de esta sustancia sobre cualquier superficie. Se debe disponer de un bote etiquetado como Desechos peligrosos y exclusivo para el material contaminado con Tiocianato de guanidina como las puntas para micropipetas, papel y guantes.

4. Inicialmente, se colectan 20 cm<sup>2</sup> de la superficie de la biopelícula usando una espátula esterilizada o un volumen de 1 mL de la biopelícula usando una pipeta de mano con punta esterilizada, también se puede elegir colectar la superficie de uno o más soportes según la disponibilidad de biomasa. La biomasa microbiana colectada se coloca en un tubo para centrifuga de 50 mL esterilizado usando una

espátula esterilizada. Si la muestra contiene poca biomasa se debe coleccionar una superficie o volumen mayor de la muestra si es posible.

5. El tubo con la muestra se balancea con otro tubo para centrífuga de 50 mL usado destinado al balanceo, entonces ambos tubos se balancean en una balanza analítica para ser centrifugados durante 12 min a 7,000 rpm (6,738 g) en la centrífuga Eppendorf 5810R a temperatura de 4 °C.
6. Durante la centrifugación se sacan mortero y pistilo esterilizados del congelador a -20 °C y se colocan en la mesa de trabajo sin quitarles el papel que los envuelve.
7. Al finalizar la centrifugación, se remueve el sobrenadante del microtubo con la muestra usando una micropipeta de 20 a 200 µL y punta con filtro esterilizada para remover todo el sobrenadante de la muestra de biopelícula, ya que el sobrenadante suele contener compuestos que contaminan el ADN o ARN a extraer, reduciendo su pureza. Estos compuestos podrían interferir en procedimientos biológico-moleculares posteriores.
8. Ahora, se toma con una espátula esterilizada el botón de la biopelícula del microtubo para colocarlo en el mortero esterilizado y congelado. El tubo vacío donde estaba la muestra se puede reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.
9. Después, se agregan 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl en el mortero esterilizado y congelado para macerar la biomasa de la biopelícula usando el pistilo esterilizado hasta obtener una suspensión homogénea.

NOTA: Si la pasta macerada obtenida está muy espesa y no se puede pipetear en los microtubos de 2 mL, entonces se añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M hasta obtener una suspensión líquida fácil de pipetear y repartir en tubos con una micropipeta de 100 a 1000 µL y punta con filtro esterilizada. Si añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl también se debe añadir la cantidad correspondiente de N-Lauroyl sarcosina al 10% para completar la mezcla.

10. Cuando la biomasa macerada sea homogénea y tenga fluidez, se añaden 600 µL de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10% usando una micropipeta de 100 a 1000 µL y punta con filtro esterilizada. Esta suspensión se mezcla suavemente moviéndola con el pistilo para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla.

## II. Muestras de biomasa fija a soporte fluidizados

1. El uso de guantes de látex es obligatorio y recuerde que la muestra debe mantenerse el mayor tiempo posible hundida en hielo frape o alguna criocaja fría para evitar la degradación del ADN. Antes de iniciar cualquier manipulación limpie la mesa de trabajo con etanol al 70%.

NOTA: Es importante medir simultáneamente la materia seca, SSV, SST o algún otro parámetro que permita relacionar la cantidad de ADN de la muestra con una medición del crecimiento o cantidad de biomasa de la misma muestra.

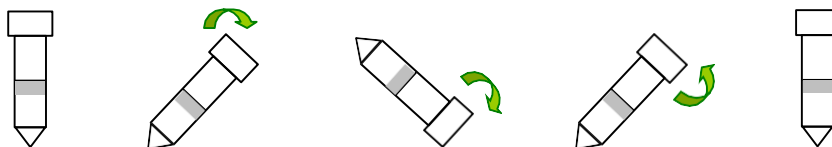
2. Unos días antes de iniciar la colecta de la muestra se esteriliza por calor húmedo y presión un mortero con pistilo por cada muestra usando una autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121 °C) durante 15 minutos.
3. Al finalizar la esterilización se deja secar el mortero y el pistilo esterilizados, después se colocan ambos en un congelador a -20 °C durante 2 horas como mínimo antes de la colecta de la muestra.
4. Ahora verifique que se tiene suficiente solución PBS 1X, tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M, N-Lauroyl sarcosina al 10%, espátulas y otros materiales esterilizados para colectar la muestra. Si no tiene los reactivos y materiales necesarios entonces prepárelos antes de la colecta tal como se indica al final de este protocolo. Recuerde también etiquetar 8 microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug tanto en el tapón como en la pared del tubo con la clave asignada a cada muestra colectada. Se sugiere tener esos tubos etiquetados en la criocaja a -20 °C listos para ser utilizados al final del procedimiento.

NOTA: Recuerde que el Tiocianato de guanidina es una sustancia mutagénica usada como desnaturalizante de proteínas para desactivar las nucleasas contenidas en la muestra de biomasa. Dado que se trata de una sustancia mutagénica, se deben usar guantes y evitar el contacto o derrame de esta sustancia sobre cualquier superficie. Se debe disponer de un bote etiquetado como Desechos peligrosos y exclusivo para el material contaminado con Tiocianato de guanidina como las puntas para micropipetas, papel y guantes.

5. En seguida, se sacan el mortero y pistilo esterilizados del congelador a -20 °C y se colocan en la mesa de trabajo sin quitarles el papel que los envuelve.
6. Inicialmente, se colectan 20 mL de la muestra líquida homogénea con los soportes colonizados por la biomasa en un tubo para centrífuga de 50 mL esterilizado usando una pipeta de mano con punta esterilizada. Si la muestra contiene poca biomasa se debe colectar un volumen mayor de la muestra si es posible.

NOTA: En el caso del reactor híbrido del Instituto Tecnológico de Orizaba donde se analizará el gradiente del lecho o cama con los soportes colonizados por la biomasa, se colectan 5 mL de la parte superior, 10 mL de la parte media y 5 mL de la parte inferior para completar 20 mL de la muestra líquida homogénea con los soportes colonizados por la biomasa.

7. La biomasa microbiana colectada se refrigera, evitando que se congele porque se formarían agujas de hielo al interior celular y se perderían células microbianas para la extracción de ADN.
8. Después, se procede a la conservación de las muestras de las muestras usando una solución PBS 1X, tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M y N-Lauroyl sarcosina al 10%.
9. La conservación de las muestras inicia agregando 30 mL de PBS 1X en dos tubos para centrífuga de 50 mL esterilizados, es decir, 30 mL en cada tubo. En seguida, se añaden a cada tubo 6 mL de muestra líquida con los soportes colonizados por la biomasa usando una jeringa esterilizada o una micropipeta de 1 a 10 mL y punta esterilizada cortada con tijeras metálicas esterilizadas para evitar taponamientos. Si la muestra contiene poca biomasa se puede colectar un volumen mayor de la muestra, respetando la proporción de PBS 1X.
10. Después, se realiza un lavado de los soportes colonizados agitando la mezcla suavemente invirtiendo los tubos (bien cerrados) 2 veces tal como se indica en la imagen siguiente.



11. En seguida, se realiza la remoción de todo el PBS 1X en ambos tubos sin colectar el líquido donde están los soportes colonizados usando una micropipeta de 1 a 10 mL y punta esterilizada.
12. Ahora, se realiza un segundo lavado agregando cuidadosamente 30 mL de PBS 1X a cada tubo y se agita la mezcla suavemente invirtiendo los tubos (bien cerrados) 2 veces tal como se indicó en la figura anterior.
13. Después, se realiza otra vez la remoción de todo el PBS 1X en ambos tubos sin colectar el líquido donde están los soportes colonizados usando una micropipeta de 1 a 10 mL y punta esterilizada.

NOTA: El lavado del líquido que contiene a los soportes colonizados tiene como propósito remover los compuestos que contaminan el ADN o ARN a extraer, reduciendo su pureza. Estos compuestos podrían interferir en procedimientos biológico-moleculares posteriores.

14. Ahora bien, el líquido que contiene a los soportes colonizados en ambos tubos de 50 mL se vierte en el mortero esterilizado y congelado. Los tubos vacíos donde estaban las muestras se pueden reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.
15. En seguida, se añaden 3 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 8.0, 0.1 M al mortero con la muestra (líquido que contiene a los soportes colonizados) usando una micropipeta de de 1-5 mL y punta esterilizada. Al agregar este reactivo al mortero quizás se congele, entonces debe esperar a que se descongele para iniciar el macerado de la muestra.
16. Entonces, se procede a macerar la muestra con el pistilo esterilizado para lograr desprender la biomasa de los soportes colonizados hasta observar la presencia de restos de biomasa en la suspensión.

NOTA: Si la pasta macerada obtenida está muy espesa y no se puede pipetear en los microtubos de 2 mL, entonces se añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M hasta obtener una suspensión líquida fácil de pipetear y repartir en tubos con una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Si añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl también se debe añadir la cantidad correspondiente de N-Lauroyl sarcosina al 10% para completar la mezcla.

17. Cuando se observe que hay suficiente biomasa desprendida de los soportes y macerada en una suspensión que tenga fluidez, es decir, no sea muy espesa; entonces, se añaden 900  $\mu$ L de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10% usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Esta suspensión se mezcla suavemente moviéndola con el pistilo para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla.
18. Finalmente, se reparte la suspensión con la biomasa macerada en 8 alícuotas de 500  $\mu$ L en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el rompedor de células Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada, esta punta se corta un poco con tijeras metálicas esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo. Se debe evitar succionar los soportes con la pipeta, esta manipulación es difícil, pero si hay pocos soportes en la muestra conservada será más fácil su manipulación durante la extracción de ADN o ARN.

19. Las alícuotas de la muestra en los microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug se meten al congelador para ser conservadas a -20 °C dentro de las cajas criogénicas para almacenar microtubos previamente etiquetadas. Recuerde también etiquetar los tubos tanto en el tapón como en la pared del microtubo con la clave asignada a cada muestra colectada.
20. Antes de lavar el mortero y el pistilo contaminados con Tiocianato de guanidina, se debe realizarse cuidadosamente una limpieza previa usando un papel para remover la mayor cantidad de residuos en ambos materiales. Todo el papel usado y contaminado debe ser contenido en un bote para residuos peligrosos. Después, se deben lavar el mortero y el pistilo con fibras exclusivas para estos materiales aun contaminados. El propósito de esta limpieza es desechar al drenaje y ambiente la menor cantidad de Tiocianato de guanidina.

### III. Materiales

1. Hielo frapo y contenedor para dicho hielo.
2. Frascos para medios de cultivo Pyrex o similar de diferentes capacidades para la elaboración de las soluciones.
3. Botes de boca ancha esterilizables (Polypropylene Wide Mouth Jars) de 250, 500 y 1000 mL marca Nalgene, distribuidos por Thermo Scientific-Nalgene. Estos botes se utilizan esterilizados para colectar las muestras, los botes de 1000 mL se usan para esterilizar las puntas de 5 mL.
4. Tubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados denominados BeadBug™ unfilled tubes, with caps and sealing ring. El número de catálogo Sigma-Aldrich es Z763837, también lo provee Merck como su filial. Se requiere ese tipo y marca de tubo porque solo ese cabe en el equipo homogenizador o rompedor de células, que se usa durante la extracción de ADN.
5. Crio-Etiquetas de microtubos que se usarán para etiquetar con claves de 3 caracteres como máximo cada alícuota de las muestras conservadas e identificar el origen de las muestras. El número de catálogo Daigger es EF1374H.
6. Perlas de Zirconia-Silicate con diámetro de 0.1-0.15 mm. Marca BioSpec. Número de catálogo: 11079101Z.
7. Gradillas para tubos de centrífuga de 50 mL y microtubos de 2 mL.
8. Tubos de 50 mL con tapón de rosca esterilizados: Estos tubos se utilizan para centrifugar las muestras líquidas y algunas sólidas muy húmedas como biopelículas. El número de catálogo Sigma- Aldrich es CLS4558, también lo provee Merck como su filial.
9. Puntas sin filtro Finnpiptette de 10 mL, esterilizadas en rack 5 x 24. El número de catálogo Finnpiptette es 9402163, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan estas puntas porque en el laboratorio las pipetas de mano son marca Finnpiptette.

10. Puntas sin filtro Finnpipette de 10 mL, no esterilizadas, paquete con 100 piezas. El número de catálogo Finnpipette es 9402151, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan estas puntas porque en el laboratorio las pipetas de mano son marca Finnpipette.
11. Puntas sin filtro Finnpipette de 5 mL, no esterilizadas, paquete con 500 piezas. El número de catálogo Finnpipette es 9402030, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan estas puntas porque en el laboratorio las pipetas de mano son marca Finnpipette. Las puntas se colocan en botes de boca ancha de 1000 mL esterilizables marca Nalgene.
12. Puntas con filtro de 200  $\mu$ L, esterilizadas en rack 10 x 96. El número de catálogo Axygen es TF- 200-R-S. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano Finnpipette utilizadas en el laboratorio.
13. Puntas con filtro de 1000  $\mu$ L, esterilizadas en rack 10 x 96. El número de catálogo Axygen es TF- 1000-R-S. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano Finnpipette utilizadas en el laboratorio.
14. Caja criogénica de polipropileno para tubos de 2 mL con capacidad para 100 tubos. El número de catálogo Biologix es 90-9100.
15. Espátulas de acero inoxidable de diferente tamaño esterilizados: Estas espátulas se utilizan para coleccionar las muestras sólidas y los sedimentos obtenidos después de centrifugar las muestras líquidas.
16. Mortero y pistilo esterilizados, estos materiales se usan para macerar y homogenizar la muestra suspendida en tiocianato de Guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M.
17. Papel Wipers Wypall L30 2/300 para limpieza de las superficies utilizadas. El número de catálogo Diprovic es 8457.
18. Tijeras de acero inoxidable esterilizadas para cortar la punta con filtro.
19. Plumón permanente con punta ultrafina para etiquetar los microtubos y la crio caja.

#### IV. Referencias

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2802-2813.

Cresson, R., Dabert, P., & Bernet, N. (2009). Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *Journal of applied microbiology*, 106(3), 863-876.

## **ANEXO B. Protocolo para la extracción, purificación, visualización y cuantificación de ADN (BIOMOL-1.1 Lodos anaerobios granulares.**

### **I. Lisado de las células por el método mecánico**

1. El uso de guantes de látex es obligatorio, antes de iniciar cualquier manipulación limpie la mesa de trabajo con etanol al 70%.
2. Revisar que se tienen disponibles todos los reactivos y materiales a utilizar durante la extracción de ADN, hacer un check-list.
3. Se deben etiquetar con la clave de la muestra a procesar todos los microtubos que serán utilizados durante el procesamiento de la muestra. El etiquetado se realiza sobre el tapón y el costado del microtubo con un plumón de tinta permanente, solo el microtubo destinado al ADN extraído debe tener una etiqueta adherible redonda porque será congelado.
4. Si se tienen todos los reactivos y materiales para realizar la extracción de ADN, entonces se prenden los dos Baños secos, que están programados a 70 °C y 37 °C.
5. Cuando el baño seco llegue a 70 °C, se debe sacar la muestra del refrigerador a – 20 °C y colocarla en una gradilla para añadirle inmediatamente a la muestra congelada 500  $\mu$ L de la solución de Lauril- sarcosina al 5% (disuelto en buffer de fosfatos con pH 8.0, 0.1 M).
6. En seguida, se coloca la muestra dentro del baño seco y se incuba durante 1 hora a 70 °C para iniciar la lisis celular. En los baños secos hay espacios para microtubos de 2.0 y 1.5 mL, asegúrese de colocar el microtubo en el espacio correcto, esto se verifica por el hundimiento del microtubo casi hasta el tapón dentro del baño seco.
7. Después de un minuto de la incubación se debe sacar la muestra para agitarla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a la máxima velocidad con el propósito de mezclar la muestra y el Lauril- sarcosina al 5% añadido con anterioridad. Finalmente, se regresa la muestra al baño seco para que finalice el período de incubación.
8. Durante la incubación de la muestra, se muelen todos los hielos de dos recipientes usando el equipotriturador y se coloca el hielo molido en el contenedor de hielo azul.
9. Después de una hora, se saca el microtubo de la muestra del baño seco y se coloca dentro del hielo molido. Entonces, se prepara el Rompedor de células colocando la pieza de plástico donde se colocan los microtubos con la muestra.

**Nota:** A partir de este paso, se debe mantener en todo momento la muestra hundida en el hielo molido para evitar la hidrólisis del ADN a menos que se indique lo contrario en el protocolo.

10. Ahora, se deben usar los lentes de seguridad para proteger los ojos de las perlas de zirconio, que podrían caer en los ojos. Entonces, se agregan dentro del tubo de la muestra 500  $\mu$ L de las perlas de zirconio (0.1 mm de diámetro) esterilizadas.
11. En seguida, se cierra el microtubo y se coloca dentro del Rompedor de células, que debe programarse a un valor de 48 para la velocidad (equivalente a la máxima velocidad) y 60 para el tiempo (equivalente a 60 segundos).
12. Al finalizar el tiempo se coloca la muestra en el hielo, si el microtubo sale caliente del rompedor de células se deja enfriar durante 2 a 5 minutos dentro del hielo.
13. Mientras se enfría la muestra, se le añaden 15 mg de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) y se agita en el vórtex Genie 2 a una velocidad entre 2000 y 3000 hasta observar que las perlas y la muestra se mezclan adecuadamente, el tiempo no debe superar los 10 segundos. Si es necesario golpee el tubo boca abajo sobre la superficie metálica del vórtex antes de poner el microtubo en agitación.

**Nota:** El PVPP fija los ácidos húmicos presentes en algunas muestras, éstos ácidos son inhibidores de la ADN polimerasa usada en la PCR y otros protocolos de biología molecular.

14. Posteriormente, se centrifuga la muestra con el PVPP durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrífuga con el microtubo de balanceo #1 o con otra muestra que se procese simultáneamente.
15. Al terminar la centrifugación, se recuperan 400  $\mu$ L del sobrenadante que contiene el ADN, usando una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en un microtubo nuevo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado (marca Axygen), manteniéndolo previamente en el hielo para enfriarlo. Recuerde que el ADN está en el sobrenadante.
16. En seguida, se añaden 500  $\mu$ L de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 2-10 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra, el propósito es agitar homogéneamente la mezcla para recuperar más ADN del sedimento de la muestra con el TENP.

**Nota:** El TENP recupera el ADN que se encuentra en el sedimento y lo suspende en el sobrenadante, también contiene sustancias quelantes que hacen insolubles iones que inhiben a las enzimas usadas en los protocolos de biología molecular.

17. Posteriormente, se centrifuga otra vez la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.
18. Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400  $\mu$ L del sobrenadante con una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado donde se colectó el primer sobrenadante.
19. Ahora se añaden otra vez 500  $\mu$ L de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 5-10 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra.
20. Después, se centrifuga otra vez la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.
21. Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400  $\mu$ L del sobrenadante con una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo donde se ha estado acumulando los dos sobrenadantes, quedando el microtubo con un volumen aproximado a 1200  $\mu$ L.
22. Después, se centrifuga el microtubo con la totalidad del sobrenadante obtenido ( $\approx$ 1200  $\mu$ L) durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf) balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.

**Nota:** El propósito es eliminar las partículas suspendidas (impurezas), que serán depositadas en el fondo del microtubo después de la centrifugación.

23. Al finalizar la centrifugación, se regresa la muestra al hielo y se reparte el sobrenadante ( $\approx$ 1200  $\mu$ L) en volúmenes iguales usando 2 microtubos nuevos de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizados (marca Axygen) usando una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada.

**Nota:** En este momento se debe descongelar la ARNasa (1 mg/mL), colocándola sobre la superficie del hielo. Verificar que el baño seco alcanzó los 37 °C.

## II. Precipitación del ADN

24. Inicialmente, se añade 1 volumen de isopropanol (2-propanol) equivalente al volumen del líquido contenido en el microtubo de la muestra o 700  $\mu\text{L}$  y se agita suavemente cada microtubo durante 3 minutos sujetando los microtubos con los dedos para voltearlos con movimientos lentos cerca de la superficie del hielo tal como indica en la siguiente figura.



**NOTA:** El isopropanol precipita el ADN durante la agitación. El ADN se aprecia como fibras cafés en la solución cuando está asociado a proteínas o se evidencia como si hubiera un cambio de densidad o índice de refracción diferente. En ocasiones se puede verificar la precipitación del ADN observando fibras cafés (ADN+proteínas) o un cambio de la densidad del líquido como si fuesen dos fases líquidas.

25. Después de dicha agitación manual, se dejan reposar los dos microtubos durante 10 min a la temperatura ambiente sobre una gradilla.
26. Al finalizar los 10 minutos, se centrifugan ambos microtubos de la muestra durante 15 min a 14,500 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrifuga con ambos microtubos y colocando una marca en la parte del microtubo donde se acumulará el sedimento o botón durante la centrifugación para saber donde está el ADN después de la centrifugación. Esto se hace porque es muy difícil observar el botón formado por el ADN, aunque en ocasiones se puede observar ese botón café porque tiene el ADN impurezas como proteínas.
27. Cuando finalice la centrifugación, saque los microtubos de la centrífuga y decante suavemente el sobrenadante de ambos microtubos centrifugados, esos sobrenadantes son desechos y se tiran al bote de residuos no peligrosos. El ADN esta en el botón formado en ambos microtubos.
28. Posteriormente, se añade a uno de los microtubos 200  $\mu\text{L}$  de agua para PCR con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada. Después, se resuspende el sedimento o ADN usando la misma punta con filtro de la micropipeta succionando y expulsando el liquido suavemente por las paredes del microtubo para lograr la suspensión del ADN y evitando producir burbujas de aire que compliquen la manipulación de la suspensión de ADN. Si la punta con filtro se desprende de la micropipeta, asegúrese de que no contiene restos de la suspensión de ADN y deséchela, después coloque una punta con filtro esterilizada nueva.

29. Luego de realizar esta maniobra, se extrae la suspensión de ADN con la misma micropipeta para mezclar dicha suspensión con el sedimento o ADN del otro microtubo con el propósito de resuspender de la misma manera el segundo sedimento y tener la totalidad de ADN precipitado en el mismo microtubo. Si es necesario, se puede cambiar la punta con filtro de la pipeta, asegurándose que la punta desechada no contiene restos de la suspensión de ADN.
30. Cuando se tenga la suspensión de ADN completa, entonces se añaden 10  $\mu\text{L}$  de RNasa a 2.5mg/mL (concentración final 1 mg/mL) y se agita en el vórtex orbital IKA a 2000 rpm mediante un pulso.
31. Después, se coloca el tubo en el baño seco para ser incubado durante 30 minutos a 37 °C. Recuerde que hay espacios para microtubos de 2.0 y 1.5 mL, asegúrese de colocar el microtubo en el espacio correcto.

**Nota:** Verifique que está listo el baño seco a 70 °C.

32. Después de la incubación, se coloca el microtubo en el hielo para iniciar la eliminación de impurezas.

### III. Eliminación de las impurezas de ADN

33. Cuando el baño seco alcance los 70 °C, añada al microtubo de la muestra 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AL (Kit QIAamp) con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada.
34. Después, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a una velocidad de 2000 y se incuba 10 minutos en el baño seco a 70 °C.
35. Al finalizar la incubación, se coloca la muestra en el hielo y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de etanol puro (96- 100%, Sigma-Aldrich) con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada. Después, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a una velocidad de 2000.
36. Después, se añade toda la suspensión de ADN mezclada con el Buffer AL y el etanol puro (96- 100%, Sigma-Aldrich) a la micro-columna QIAamp contenida en un microtubo de 2 mL del kit usando una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada. *Atención: evitar mojar los bordes de la columna porque eso dificulta cerrarla adecuadamente.*
37. Posteriormente, se cierra bien la micro-columna y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrífuga con el microtubo de balanceo AL o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.

38. Al finalizar la centrifugación, se debe desechar el microtubo con el filtrado, se coloca la micro- columna dentro de un microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp y se coloca en el hielo.
39. En seguida, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 500 µL del Buffer AW1 del Kit QIAamp usando una micropipeta de 1000 µL y punta con filtro esterilizada. Atención: evitar mojar los bordes. Después, se cierra bien la micro-columna y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrífuga con el microtubo de balanceo AW1 o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.
40. Luego de esta segunda centrifugación, se debe desechar nuevamente el microtubo con el filtrado y se coloca la micro-columna dentro de otro microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp y se coloca en el hielo.
41. En seguida, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 500 µL del Buffer AW2 del Kit QIAamp usando una micropipeta de 1000 µL y punta con filtro. Atención: evitar mojar los bordes. Entonces, se cierra bien la micro-columna y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrífuga con el microtubo de balanceo AW2 o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.
42. Al finalizar esta centrifugación, se elimina otra vez el microtubo con el filtrado y se coloca la micro-columna dentro de un microtubo nuevo de 1.5 mL esterilizado con la tapa cortada (marca Axygen) previamente usando las tijeras esterilizadas.
43. Ahora, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 50 µL del Buffer AE del Kit QIAamp usando una micropipeta de 50 µL y punta con filtro esterilizada. Se deben también añadir los 50 µL del Buffer AE del Kit QIAamp a la micro-columna del microtubo de balanceo AW2 colocada en otro microtubo de 1.5 mL con la tapa cortada para balancear la centrífuga o a una micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.
44. Después de añadir los 50 µL del Buffer AE, el microtubo de 1.5 mL esterilizado con la micro- columna de la muestra se coloca en una gradilla y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
45. Cuando finalice el tiempo de incubación, el microtubo de 1.5 mL esterilizado con la micro-columna de la muestra se centrifuga 3 min a 8,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrífuga con el microtubo preparado anteriormente o tubo de 1.5 mL esterilizado con la micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.

46. Atención con la hidrólisis ácida del ADN en caso de usar agua para PCR en lugar del buffer AE.
47. Al terminar la centrifugación, se desecha la micro-columna y el recupera el filtrado (□40 µL) en un microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado (marca Axygen) usando una micropipetade 200 µL y punta con filtro esterilizada.
48. En seguida, el microtubo con la muestra de ADN extraído se coloca en una caja criogénica etiquetada y se guarda en el congelador a -25 °C. Recuerde etiquetar el microtubo con el ADN extraído antes de colocarlo en el congelador.
49. Ahora, se limpia la mesa de trabajo y cualquier otra superficie utilizada durante la extracción de ADN con etanol al 70%. También se apagan los equipos utilizados, se guardan los materiales usados como gradillas y se vacían los botes para residuos peligrosos y no peligrosos en los botes grandes respectivos.
50. Si quedan 4 o menos microtubos con 500 µL perlas de zirconio esterilizadas y/o paquetes de 15 mg de PVPP, reponga todos los microtubos y paquetes utilizados durante sus manipulaciones.

#### **IV. Visualización del ADN extraído**

51. La visualización de ADN extraído se realiza mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 0.7%. El resultado debe indicar una talla del ADN extraído entre 10 y 20 Kb según el marcador de talla Fago lambda/Hind III.
52. Al hacer el gel, recuerde usar siempre los guantes de latex para protegerse las manos de cualquier contacto con los colorantes de tinción Sybr-SAFE y Sybr-GOLD, éste último es carcinogénico. Cuando se visualizan productos de una PCR siempre se debe usar Sybr-SAFE como colorante de tinción, entonces se preparan 50 mL de solución del gel de agarosa, que es suficiente para un gel chico donde se pueden depositar 1 a 7 muestras y el marcador de talla.
53. El gel se prepara usando un frasco etiquetado para geles con Sybr-SAFE, primero se añaden al frasco 50 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X. Si esta solución no está preparada, se debe hacer una nueva solución diluyendo 100 mL de una solución madre Tris/Borate/EDTA (TBE) 10X en 900 mL de agua destilada para obtener 1000 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X.

Nota: La solución madre Tris/Borate/EDTA (TBE) 10X se compra ya preparada y siempre debe verificarse que la precipitación natural de las sales en la solución no sea excesiva porque eso cambiaría demasiado la concentración de las sales y la eficiencia de la solución durante la electroforesis.

54. Cuando se hayan añadido los 50 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X al frasco, entonces se pesan 0.35 g de agarosa y se añaden al frasco con los 50 mL de la solución TBE 1X.
  55. Ahora, se coloca la suspensión de agarosa al 0.7% en el horno de microondas para ser calentada durante uno o dos minutos hasta lograr disolver la agarosa. Se debe observar el frasco durante su calentamiento para evitar el derrame de la solución si la calienta mucho el frasco.
  56. Después, se deja enfriar el frasco con la solución del gel de agarosa al 1.5 % hasta que pueda soportar tocar el frasco con la mano. En seguida, se añade el colorante de tinción Sybr-SAFE. Siempre se añaden 10 µL del colorante es Sybr-SAFE por cada 100 mL de la solución del gel de agarosa, pero en este caso se añaden 5 µL de Sybr-SAFE porque se preparan 50 mL de la solución del gel de agarosa.
- NOTA: Si por alguna razón se decide usar el colorante de tinción Sybr-GOLD, siempre se añade 1 µL del colorante Sybr-GOLD por cada 100 mL de la solución del gel de agarosa, pero en este caso se añaden 0.5 µL de Sybr-GOLD porque se preparan 50 mL de la solución del gel de agarosa.
57. Después de agregar el colorante de tinción se agita suavemente el frasco con la mano hasta observar la disolución del colorante en la solución del gel homogéneamente. En la Tabla 1, se muestran los reactivos para la preparación de un gel de agarosa (50 mL) usando Sybr-SAFE y Sybr- GOLD.

**Tabla 2.** Fórmulas para la preparación de los geles de agarosa al 0.7 % (50 mL) para la visualización de ADN extraído usando como colorantes de tinción usando Sybr-SAFE y Sybr-GOLD.

| <b>Preparación del gel de agarosa al 0.7% con Sybr-SAFE (50 mL)</b>                    |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>NOTA: Usar siempre el frasco marcado Sybr-SAFE para la preparación del gel.</i>     |        |
| Agarosa                                                                                | 0.35 g |
| Solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X                                                     | 50 mL  |
| Sybr-SAFE (Solución concentrada)                                                       | 5 µL   |
| <b>Preparación del gel de agarosa al 0.7% con Sybr-GOLD (50 mL)</b>                    |        |
| <i>NOTA: Usar siempre el frasco marcado con Sybr-GOLD para la preparación del gel.</i> |        |
| Agarosa                                                                                | 0.35 g |
| Solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X                                                     | 50 mL  |
| Sybr-GOLD (Solución concentrada)                                                       | 0.5 µL |

NOTA: Se preparan 50 y 100 mL de gel de agarosa al 0.7% para las cámaras electroforéticas pequeña y grande, respectivamente. Los materiales desechables que tuvieron contacto con el Sybr-SAFE se tiran en el bote para desechos NO

peligrosos porque no es tóxico. Mientras que, los materiales que tuvieron contacto con el Sybr-GOLD se tiran en el bote para desechos peligrosos porque si es tóxico.

58. Cuando gel de agarosa al 0.7% aún está en estado líquido se coloca la base de acrílico sobre el soporte de plástico para la solidificación de dicho gel. Después, se debe nivelar dicho soporte con la mesa usando la burbuja de nivel, en seguida, se aprieta la base de acrílico con la manija del soporte para el vaciado del gel de agarosa al 0.7%. Finalmente, se coloca el peine de 8 dientes con 0.7 mm de ancho para obtener el número y tamaño de las celdas suficientes destinadas a depositar las muestras y el marcador de talla. La base de acrílico con el gel en estado líquido se deja enfriar durante una hora.

NOTA: Si durante el vaciado de la solución del gel se producen burbujas, entonces se deben arrastrarlas burbujas a la orilla de la base de acrílico usando una punta para pipeta sin filtro de 200  $\mu$ L (amarilla).

59. Inmediatamente, se coloca una BOLSA NEGRA sobre toda la base de acrílico para evitar que la luz degrade el colorante de tinción durante la solidificación del gel, ya que son moléculas fluorescentes sensibles a la luz. Adicionalmente, se debe colocar una caja de unicel que cubre al rompedor de células encima de la base para la solidificación del gel y se apagan las luces del laboratorio. El gel se deja enfriar hasta solidificarse durante aproximadamente 30 minutos con el aire acondicionado prendido.

NOTA: Cabe mencionar que la BOLSA NEGRA es como aquellas usadas en los botes de desechos y se encuentran debajo de la tarja del laboratorio.

60. Ahora se verifica la solidificación del gel de agarosa presionando suavemente con el dedo una esquina inferior, si está completamente solidificado se ve opaco, entonces se retira el peine jalándolo con un movimiento fuerte y rápido hacia arriba, después se afloja el soporte para liberar la base de acrílico con el gel y se coloca dentro de la cámara electroforética.

NOTA: Se debe tener cuidado de colocar la base de acrílico con el gel en el sentido correcto para la migración del ADN durante la electroforesis, una flecha verde en la cámara electroforética indica la dirección de la migración de los ácidos nucleicos.

61. En este momento, se coloca el cuadro de plástico negro debajo de la cámara electroforética en la posición justo debajo del gel para facilitar la deposición de las muestras y el marcador de talla.
62. Después, se añade la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X en la cámara de electroforesis hasta cubrir totalmente el gel y se debe verificar que las celdas no tengan aire atrapado. El nivel máximo de dicha solución está indicado con una

línea en la cámara electroforética, pero usualmentesuperamos este nivel para lograr cubrir el gel con dicha solución sin que se desborde fuera de la cámara electroforética.

63. Ahora, se corta un trozo de plástico parafilm con un tamaño adecuado para colocar sobre su superficie un número de gotas de 4  $\mu\text{L}$  de la solución de deposición (bluejuice) equivalentes al número de las muestras y el marcador de talla. Esto se realiza usando una micropipeta de 1 a 10 $\mu\text{L}$  y punta sin filtro esterilizada.

NOTA: Si se utiliza la solución de deposición Blue/Orange 6X solo se coloca una gota de 1  $\mu\text{L}$  de dicha solución para ser mezclada con la muestra de ADN extraído.

64. Después, se pipetea 4  $\mu\text{L}$  de una muestra de ADN extraído usando una micropipeta de 1 a 10  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada, esta muestra se mezcla con una de las gotas de la solución de deposición, mezclando ambas sustancias con la misma micropipeta y punta con filtro esterilizada usada para coleccionar el ADN, la técnica de mezclado consiste en succionar la mezcla y depositarla sobre el parafilm 5 veces para formar la mezcla ADN-solución de deposición.

En seguida, se deposita la mezcla ADN-solución de deposición en la celda del gel destinada a esa muestra, todas las muestras se depositan en el gel de la misma manera, recuerde tomar nota del orden de deposición de las muestras y el marcador de talla dentro del gel en una libreta de trabajo. Si se tienen pocas muestras procure depositarlas en las celdas centrales del gel, ya que a veces la migración del ADN no es en línea recta en las celdas de las orillas del gel.

NOTA: La solución de deposición aumenta la densidad del ADN, haciéndolo más denso para depositarlo correctamente en la celda del gel sumergido en el electrolito.

65. El marcador de talla o peso molecular llamado fago lambda/Hind III se coloca al final, la cantidad a depositar son 4  $\mu\text{L}$  y se mezclan con 4  $\mu\text{L}$  de la solución de deposición bluejuice tal como se hizo con las muestras.

NOTA: En ocasiones, el marcador de talla fago lambda/Hind III viene de fábrica mezclado con la solución de deposición y se ve azul dentro de su microtubo, en ese caso no se mezcla con ninguna solución de depósito.

66. Cuando se finalice con la deposición de las muestras en el gel, se cierra la cámara de electroforesis y se conectan los cables en la fuente de poder para iniciar la electroforesis. Se debe tener cuidado con dichos cables porque pueden quedar por debajo de la cámara antes de conectarlos y cuando los jale para realizar la conexión podrían voltear la cámara.

67. Ahora, asegúrese que el cable de la fuente de poder esta conectado a la corriente y prenda la fuente de poder apretando el botón ubicado en la parte baja del costado derecho. Después, ubique al frente de la fuente de poder un botón del lado izquierdo y apriete para que se ilumine el foco que corresponde a la V (voltaje) y apriete el botón situado del lado derecho (+/-) para subir el voltaje hasta 60 V. Ahora, apriete el botón del lado izquierdo otra vez para que se ilumine el foco que corresponde a la A (amperaje) que debe estar en 400, ese es el valor correcto, no se debe modificar. En seguida, vuelva a apretar el botón del lado izquierdo para que se ilumine el foco que corresponde al reloj y seleccionar el tiempo de la migración, usando el botón situado del lado derecho (+/-) suba el tiempo hasta 50 minutos. Finalmente, apriete el botón de la figura del hombre corriendo para que se ilumine el foco, lo que indica el inicio de la electroforesis, que se evidencia por un burbujeo en la parte baja de los electrodos dentro de la cámara electroforética.
68. Durante los primeros 5 minutos de la migración se debe tener la precaución de verificar que las manchas de los colorantes en cada muestra estén moviéndose en la dirección adecuada porque podría haberse colocado el gel en sentido apuesto, lo que provocaría la perdida de las muestras al salir por el gel durante los primeros 15 minutos de la electroforesis. La cámara tiene una flecha verde en la parte superior de los costados para verificar el sentido de la migración.
69. Mientras se realiza la electroforesis, se verifica la conexión entre el equipo fotodocumentador y la computadora a través del programa ImageLab. Si usted ha visualizado antes algún gel de agarosa con su computadora personal, entonces puede continuar con el protocolo. Sin embargo, si usted nunca ha visualizado un gel de agarosa con su computadora personal entonces se debe verificar dicha conexión como se indica a continuación.
70. Si es la primera vez que se visualiza un gel de agarosa se debe instalar en la computadora personal el programa Image Lab Software usando el disco de instalación o descargando dicho programa de la página web de BIORAD. Después de instalar en su computadora personal dicho programa, entonces se debe conectar la computadora al fotodocumentador mediante el cable USB y prender el fotodocumentador usando el botón verde ubicado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo. En seguida, se abre el Image Lab Software, que indicará una serie de pasos para calibrarlo por primera y única vez. Durante este proceso el programa solicitará que se coloque en el fotodocumentador la charola UV color Morado (si se tiene, tenga cuidado con esa charola porque el vidrio está flojo), después otra charola que no se tiene y debe dar click en skip, en seguida solicitará la charola azul (si se tiene) y finalmente, se solicitará otra charola que no se tiene y debe dar click en skip. Eso concluirá la calibración y se podrá iniciar el protocolo para visualizar el gel de agarosa.

71. Cuando la migración electroforética haya finalizado al haber transcurrido los 50 minutos, se apaga la fuente de poder, se desconectan los cables unidos a la fuente de poder para quitar la tapa de la cámara de electroforesis y se coloca a un lado de dicha cámara.

## **V. Visualización del ADN extraído**

72. La visualización del ADN extraído se realiza en el Fotodocumentador de geles BIORAD usando el programa Image Lab Software. Al inicio se prende la computadora personal y se conecta al equipo Fotodocumentador de geles mediante el cable USB, después, se prende dicho equipo presionando el botón verde situado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo Fotodocumentador.
73. Ahora se debe prender el equipo fotodocumentador de geles mediante un botón verde situado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo. Esperar a que se prenda el botón verde indicando Ready ubicado al frente del equipo. Si ya ha usado el equipo fotodocumentador, se debe conectar la computadora al fotodocumentador mediante el cable USB y prender la computadora para lograr la conexión correcta con el fotodocumentador.
74. Después, se retira el gel de la celda de electroforesis, inclinándolo sobre la cámara para escurrir el líquido que contiene y evitando con los dedos que se resbale el gel por los costados.
75. El gel escurrido se deposita en la bandeja Azul del fotodocumentador de geles empujándolo con los dedos para que caiga en medio de dicha bandeja, cuidando que el gel no se rompa al manipularlo y evitando rayar la bandeja con el caster o base de acrílico donde se cuaja el gel.
76. Se debe tratar de centrar el gel en el área de visualización y orientarlo de manera que los pozos coincidan la parte superior de la bandeja usando los dedos. También se debe procurar que no queden burbujas de aire entre el gel y la bandeja presionando el gel con cuidado para no romperlo hasta que las burbujas de aire sean removidas. Nunca haga algo que raye la bandeja.
77. En seguida, se abre la puerta frontal del fotodocumentador y se coloca la bandeja con el gel en la ranura correspondiente, empujándola lentamente hasta que tope con el fondo. Entonces, se cierra la puerta frontal.
78. En la computadora se inicia el software "ImageLab", que está conectado al fotodocumentador y en la sección de "Protocol" seleccionar "New". Después, en "Gel imaging" hacer click en Application>Select. Aquí seleccionar "Nucleic Acid Gels" y después seleccionar el colorante intercalante que se utilizó para la electroforesis (SYBR Safe o SYBR Gold).

79. En “Image Exposure” seleccionar “Intense Bands”. Hacer click en “Lane and Band Detection” en el menú de la izquierda y seleccionar “Custom”, verificar que diga “50” en el cuadro de diálogo. Después, hacer click en el botón “Run Protocol” y esperar a que termine.
80. Al aparecer la imagen se deben utilizar las herramientas de la barra izquierda “Lane and Band Tools” para ajustar la imagen, los tonos y luminosidad de la foto. La herramienta “Annotation Tools” se debe utilizar para agregar texto a la imagen, indicando la identidad de las muestras, es decir, sus claves; así como el marcador de talla utilizado y el peso de cada banda del marcador.

NOTA: El tamaño del ADN extraído debe ser cercano a las 20,000 pb aproximadamente. Además, debe haber una sola banda, ya que de lo contrario significa que el ADN se ha degradado durante la extracción.

81. Cuando la imagen esté lista, hacer click en “File” en la barra superior, después en “Export” y seleccionar “Export for Publication”. En la ventana que se abre verificar que la opción “Entire Image” esté seleccionada, y hacer click en “Export”. Aquí se selecciona la carpeta donde se vaya a guardar la imagen, así como el formato de imagen en que se desee guardar (jpg, tif y pdf); poniendo como título las claves de las muestras analizadas, fecha e iniciales de quien procesa esas muestras (ejemplo: V1-V9 21-03-19 RSC). El archivo creado también se guarda en una memoria USB exclusiva del laboratorio para copiarlo en una computadora personal.
82. Finalmente, se cierra el archivo y el programa ImageLab, se apaga la computadora y el equipo fotodocumentador.
83. Después, se abre la compuerta del fotodocumentador para sacar la bandeja azul con el gel y usando las manos con los guantes de latex sin polvo se toma el gel y se deposita en el bote de los residuos no peligrosos si se usó SYBR-SAFE o se deposita en el bote de los residuos peligrosos si se usó SYBR-GOLD.
84. En seguida, se toma con cuidado la bandeja azul y se coloca sobre la tarja para enjuagarla con agua destilada y posteriormente secarla con el papel blanco aplicándolo para absorber el agua sin tallar la superficie brillante. Finalmente, se guarda la bandeja Azul en su caja con mucho cuidado.
85. La solución de TBE de la cámara electroforética se deposita en el frasco etiquetado “TBE 1X ADN solo carga” y dicha cámara se coloca sobre la tarja para enjuagarla con agua destilada y en seguida, secarla con el papel blanco aplicándolo para absorber el agua sin tallar la superficie. Finalmente, se deja la cámara de electroforesis sobre la charola azul.

## VI. Medición de la concentración de pureza del ADN

86. La lectura de la pureza y concentración del ADN extraído se realiza mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Primero, se debe prender el espectrofotómetro Biometer D20 Eppendorf y dejar calentar la lámpara del equipo durante 10 minutos.
87. Mientras transcurre este tiempo se debe lavar perfectamente la cubeta G1.0 mm con abundante agua nanopura esterilizada y se seca con papel para limpiar lentes de microscopio. La cubeta G1.0 mm se debe manipular con mucho cuidado porque es muy costosa (\$60,000 pesos).
88. Al finalizar los 10 minutos, se selecciona el programa DNA\_1mm usando las flechas del tablero frontal del equipo y se aprieta la tecla *Enter*. Después se usa la tecla *NEXT* hasta llegar a *Samples* en la pantalla del equipo.
89. Ahora se mide el Blanco usando el buffer AE, que se utilizó para eluir el ADN durante la extracción, hay un frasco del buffer AE en el cajón de los materiales para esta medición. Entonces, se colocan en la cubeta abierta 2.5  $\mu$ L de dicho buffer usando una micropipeta de 1 a 10  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Después, se cierra la cubeta suavemente y se coloca en la compuerta del equipo; en seguida, se cierra dicha compuerta y se da click en la tecla *Blanco* del tablero frontal del equipo.
90. Una vez leído el blanco, se saca la cubeta de la compuerta con mucho cuidado, se enjuaga con agua nanopura esterilizada y se seca la cubeta con un papel para limpiar lentes de microscopio. Después, se edita la muestra a analizar apretando primero la tecla *EDIT* sobre el tablero frontal y posteriormente la tecla *Keyboard* en la pantalla del equipo. El nombre de la muestra debe estar compuesta por su clave seguido de la palabra ADN (ejemplo V6-ADN). Finalmente, oprima la tecla *Enter* para terminar con la edición de la muestra.
91. Ahora, se colocan 2.0  $\mu$ L del ADN extraído en la cubeta G1.0 mm abierta usando una micropipeta de 1 a 10  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Se cierra la cubeta suavemente y se coloca en la compuerta del equipo; después, se cierra dicha compuerta y se da click en la tecla *Sample* para iniciar la medición de la concentración y pureza.
92. Al finalizar la lectura, se vuelve a editar otra muestra y se procede a enjuagar y secar la cubeta para la siguiente lectura tal como se indicó en los pasos anteriores hasta finalizar con todas las muestras.
93. Cuando se ha finalizado con el análisis de las muestras, se debe apretar la tecla *NEXT* para iniciar el procesamiento de los datos (Processing results). Ahí podrá

verificar que los resultado de las mediciones de las muestra están guardados usando las fechas para abajo y arriba.

94. Después, se aprieta otra vez la tecla *NEXT* para pasar a la pestaña *Export*, eligiendo todos lo parámetros mediante las flechas del tablero del equipo y se guarda el archivo en el disco duro poniendo como título las claves de las muestras analizadas, ADN, fecha e iniciales de quien procesa esas muestras (ejemplo: V1-V9 ADN 21-03-19 RSC).
95. En seguida, se da click en la tecla *FINISH*, se verifica que el archivo este guardado y se apaga el equipo. Recuerde enjuagar y secar la cubeta G1.0 mm con mucho cuidado para guardarla en su estuche.

## VII. Soluciones, equipos y materiales necesarios para ejecutar este protocolo

Solución de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 (NO TÓXICA): Se deben preparar 250 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 30.3 g de Trizma HCl y 6.95 g de Trizma Base, después se colocas ambos reactivos dentro del frasco etiquetado, que contenga 150 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 250 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

|                                           |                                 |
|-------------------------------------------|---------------------------------|
| Trizma HCl (Sigma-Aldrich: 93363)         | 30.3 g                          |
| Trizma Base (Sigma-Aldrich: 93362)        | 6.95 g                          |
| Agua ultrapura (desionizada) esterilizada | Cuanto baste para aforar 250 mL |
| <b>TOTAL</b>                              | <b>250 mL</b>                   |

Después de aforar la solución de Tris-HCl 1 M, pH 7.6, está se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, la solución se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y después se conserva a temperatura ambiente. Se debe verificar el pH de la solución agregando 20 mL en un vaso de precipitados de 50 mL, si el pH no es 7.6, se debe indicar en la etiqueta del frasco el pH medido. Esta solución no se esteriliza.

Solución de Guanidina tiocianato 4 M, Tris-HCl pH 7.6 (TÓXICA-CARCINOGENICA): Se deben preparar como mínimo 50 mL usando el frasco de 500 mL, barra magnetica y demás materiales exclusivos para preparar esta solución. Inicialmente, se pesan 23.6 g de guanidina tiocianato usando la espátula y charola de pesado exclusivas para este reactivo, después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración, que contenga una barra magnética, ambos de uso exclusivo para preparar esta solución. En seguida, se coloca el frasco en una parrilla con agitación a una temperatura de 50 °C y se agregan 5 mL de Tris-HCl 1 M y 20 mL de agua ultrapura esterilizada, esta solución se agita a la

velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Este procedimiento se puede repetir las veces que se requieran para obtener más volumen de la solución de Guanidina tiocianato 4 M (Tris-HCl pH 7.6).

|                                             |              |
|---------------------------------------------|--------------|
| Guanidina tiocianato (Sigma-Aldrich: G9277) | 23.6 g       |
| Tris-HCl 1 M                                | 5 mL         |
| Agua ultrapura (desionizada) esterilizada   | 20 mL        |
| <b>TOTAL</b>                                | <b>50 mL</b> |

La solución de Guanidina tiocianato 4 M (Tris-HCl pH 7.6) se esteriliza por autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Solución de Fosfato monobásico de sodio 1 M (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 24.0 g de Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 200 mL para aforarla solución con agua ultrapura esterilizada.

|                                                  |                                 |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Sigma-Aldrich: S3139) | 24.0 g                          |
| Agua ultrapura (desionizada) esterilizada        | Cuanto baste para aforar 200 mL |
| <b>TOTAL</b>                                     | <b>200 mL</b>                   |

Después de aforar la solución de Fosfato monobásico de sodio 1 M, está se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, se conserva a temperatura ambiente. Esta solución no se esteriliza.

Solución de Fosfato dibásico de sodio 1 M (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 28.4 g de Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 200 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

|                                                  |                                 |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Sigma-Aldrich: S7907) | 28.4 g                          |
| Agua ultrapura (desionizada) esterilizada        | Cuanto baste para aforar 200 mL |
| <b>TOTAL</b>                                     | <b>200 mL</b>                   |

Después de aforar la solución de Fosfato dibásico de sodio 1 M, está se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, se conserva a

temperatura ambiente. Esta solución nose esteriliza.

Solución de Tampón Fosfatos 0.1 M, pH 8.0 (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se añaden en el frasco 150 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética, después se adicionan 1.36 mL de Fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 1 M y 18.64 mL de Fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1 M. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria durante 10 minutos para lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, la solución se coloca dentro de un matraz aforado de 200 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

|                                           |                                 |
|-------------------------------------------|---------------------------------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                 | 1.36 mL                         |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                 | 18.64 mL                        |
| Agua ultrapura (desionizada) esterilizada | Cuanto baste para aforar 200 mL |
| <b>TOTAL</b>                              | <b>200 mL</b>                   |

Después de aforar la solución de Tampón Fosfatos 0.1 M, pH 8.0, está se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos. Esta solución se conserva a temperatura ambiente. Se debe verificar el pH de la solución agregando 20 mL en un vaso de precipitados de 50 mL, si el pH no es 8.0, se debe indicar en la etiqueta del frasco el pH medido.

Solución de N-Lauril Sarcosina 10 %, Tampon Fosfatos 0.1 M pH 8.0 (NO TÓXICA): Se deben preparar 100 mL usando un frasco de 250 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 10.0 g de N-Lauril Sarcosina, después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que debe contener 100 mL de la solución de Tampon Fosfatos 0.1 M pH 8.0 esterilizada medidos con una probeta y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo.

|                                           |                                 |
|-------------------------------------------|---------------------------------|
| N-Lauril Sarcosina (Sigma-Aldrich: 61743) | 10.0 g                          |
| Tampon Fosfatos 0.1 M pH 8.0 esterilizado | Cuanto baste para aforar 100 mL |
| <b>TOTAL</b>                              | <b>100 mL</b>                   |

La solución de N-Lauril Sarcosina 10 %, se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Solución de NaOH 1 M (NO TÓXICA): Se deben preparar 100 mL usando un frasco de 250 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 4.0 g de NaOH, después se añaden los 4.0 g de NaOH dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de Agua ultrapura esterilizada medidos con probeta y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo.

|                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| NaOH                        | 4.0 g                    |
| Agua ultrapura esterilizada | Cuanto baste para 100 mL |
| <b>TOTAL</b>                | <b>100 mL</b>            |

Esta solución no se esteriliza y se conserva a temperatura ambiente, su uso es exclusivo para ajustar el pH de las soluciones, ya que la solución no fue aforada.

**Solución de EDTA 0.5 M, pH 8.0 (NO TÓXICA):** Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 54.05 g de EDTA, después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de Agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, la solución se coloca dentro de un matraz aforado de 200 mL con la misma barra magnética para aforar la solución con Agua ultrapura esterilizada y ajustarla a pH 8.0 con la solución de NaOH 1 M. La adición del NaOH ocasiona que se disuelva el EDTA.

|                             |                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| EDTA                        | 54.05 g                               |
| Agua ultrapura esterilizada | Cuanto baste para 200 mL              |
| Solución de NaOH 1 M        | Cuanto baste para ajustar el pH a 8.0 |
| <b>TOTAL</b>                | <b>200 mL</b>                         |

Después de aforar la solución de EDTA 0.5 M, pH 8.0, ésta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, la solución se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y después se conserva a temperatura ambiente. Se debe verificar el pH de la solución agregando 20 mL en un vaso de precipitados de 50 mL, si el pH no es 8.0, se debe indicar en la etiqueta del frasco el pH medido. Esta solución no se esteriliza.

**Solución de NaCl 1 M (NO TÓXICA):** Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 11.69 g de EDTA, después se colocan el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contenga 150 mL de Agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, la solución se coloca dentro de un matraz aforado de 200 mL para aforar la solución con Agua ultrapura esterilizada.

|                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| NaCl                        | 11.69 g                  |
| Agua ultrapura esterilizada | Cuanto baste para 200 mL |
| <b>TOTAL</b>                | <b>200 mL</b>            |

Después de aforar la solución de NaCl 1 M, ésta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, la solución se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 minutos y después se conserva a temperatura ambiente.

Solución o suspensión TENP (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesa 2.0g de Polivinilpolipirrolidona (PVPP), después se colocan dentro del frasco etiquetado una barra magnética, 150 mL de Agua ultrapura esterilizada, 10 mL de Tris-HCl 1 M pH 7.6, 8 mL de EDTA 0.5 M, 20 mL de NaCl 1 M y 2 g de PVPP. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, la solución se coloca dentro de un matraz aforado de 200 mL para aforar la solución con Agua ultrapura esterilizada.

Después de aforar la solución de TENP, esta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos, esta solución es realmente una suspensión porque el PVPP nunca se solubiliza. Finalmente, se conserva a temperatura ambiente. Esta suspensión no se esteriliza, aunque existe una solución llamada TEN sin PVPP, que si se esteriliza.

### **VIII. Equipos y materiales necesarios**

- ✓ Equipos: Triturador de hielo, baños secos a 37 °C y 70 °C, rompedor de células, vórtex, centrífuga de hasta 14,500 rpm, cámara electroforética con fuente de poder y accesorios, BioPhotometer D30, fotodocumentador Gel Doc EZ con charola azul e Image lab software y horno de microondas.
- ✓ Contenedor para el hielo molido (frapé).
- ✓ Microtubos Axygen de 1.5 mL libres de ADN y ADNasas con 500 µL de perlas de zirconio de 0.1 mm de diámetro, los microtubos con las perlas deben pesarse y marcarse de 2 en 2 para usarlos balanceados durante la extracción del ADN. Estos microtubos con las perlas se esterilizan por autoclaveado durante 15 minutos a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121 °C). Después de la esterilización los microtubos con las perlas deben colocarse en una estufa a una temperatura de 50 a 60 °C durante 12 horas o más para lograr que las perlas se sequen, esto facilita su vertimiento en el microtubo de la muestra para realizar la lisis celular.
- ✓ Micromicrotubos esterilizados Axygen de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) libres de ADN y ADNasas.
- ✓ Micromicrotubos esterilizados Axygen de 1.5 mL libres de ADN y ADNasas (vacíos).
- ✓ Puntas estériles con filtro para micropipeta con capacidad de 2-10 µL, 5-50 µL, 20-200 µL y 100- 1000 µL.
- ✓ Solución de TBE 1X: Añadir 100 mL de TBE 10X a una probeta de un litro, posteriormente adicionar 900 mL de agua nanopura, después tapar la probeta con parafilm y mezclar suavemente. Finalmente, vaciar la solución TBE 1X preparada en un frasco de un litro y etiquetarla indicando la fecha de elaboración, quien la elaboró y nombre de la solución.
- ✓ Sybr-SAFE, que es el colorante de tinción principal (10,000X) o Sybr-GOLD

(Solución concentrada), colorante de tinción alternativo (10 mg/mL), agarosa y marcador de talla bacteriófago Lambda/Hind III y solución de deposición.

- ✓ Reactivos como Etanol absoluto grado biología molecular, 2-Propanol grado biología molecular, Polivinilpirrolidona, TENP y agua grado biología molecular.
- ✓ Enzima ARNasa A (Qiagen).
- ✓ QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).
- ✓ Sybr-SAFE, que es el colorante de tinción principal (10,000X) o Sybr-GOLD (Solución concentrada), colorante de tinción alternativo (10 mg/mL), agarosa y marcador de talla bacteriófago Lambda/Hind III y solución de deposición.

#### IX. Referencias

Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., y Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2802-2813.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akunna, J. C., C. Bizeau y R. Moletta. 1992. Denitrification in anaerobic digesters: Possibilities and influence of wastewater COD/N-NOX ratio. *Environmental Technology*. **13**(9):825-836.

Alcántara-Hernández, R. J., N. Taş, S. Carlos-Pinedo, A. Durán-Moreno y L. I. Falcón. 2017. Microbial dynamics in anaerobic digestion reactors for treating organic urban residues during the start-up process. *Letters in applied microbiology*. **64**(6):438-445.

Allen, T. D., P. F. Kraus, P. A. Lawson, G. R. Drake, D. L. Balkwill y R. S. Tanner. 2008. *Desulfovibrio carbinolophilus* sp. nov., a benzyl alcohol-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from a gas condensate-contaminated aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. **58**(6):1313-1317.

Amha, Y. M., M. Z. Anwar, A. Brower, C. S. Jacobsen, L. B. Stadler, T. M. Webster y A. L. Smith. 2018. Inhibition of anaerobic digestion processes: applications of molecular tools. *Bioresource technology*. **247**: 999-1014.

An, Y., F. Yang, H. C. Chua, F. S. Wong y B. Wu. 2008. The integration of methanogenesis with shortcut nitrification and denitrification in a combined UASB with MBR. *Bioresource technology*. **99**(9):3714-3720.

APHA. 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23<sup>th</sup> ed. American Public Health Association. Washington DC.

Bernard, O., M. Polit, Z. Hadj-Sadok, M. Pengov, D. Dochain, M. Estaben y P. Labat. 2000. Advanced monitoring and control of anaerobic wastewater treatment plants: software sensors and controllers for an anaerobic digester. *Water Science and Technology*. **43**(7):175-182.

Bickers, P. O. y A. J. Van Oostrom. 2000. Availability for denitrification of organic carbon in meat-processing wastestreams. *Bioresource Technology*. **73**(1):53-58.

Bryant, M. P. y D. R. Boone. 1987. Isolation and characterization of *Methanobacterium formicum* MF. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **37**(2):171-171.

Bucci, P. L. 2021. Remoción simultanea de nitrógeno y carbono orgánico en SBR usando la tecnología de granulación aerobica. Tesis de grado. Doctor de Ingeniería. Universidad Nacional de La Plata.

Carballo-Costa, M. N. 2016. Eliminación conjunta de nitrógeno y metano disuelto de biorreactores anaerobios mediante el empleo de un biorreactor híbrido con biomasa en suspensión y biopelículas. Tesis de grado. Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad de Santiago de Compostela.

CCA. 2017. Caracterización y gestión de los residuos orgánicos en América del Norte, informe sintético, 55. Comisión para la Cooperación Ambiental. Montreal, Canada.

Chiu, Y. C. y M. S. Chung. 2003. Determination optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification. *International bioteterioration y biodegradation*,

Cresson, R., P. Dabert, y N. Bernet. 2009. Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *J App Microbiol*, **51**(1):43-49.

Cruz-Ramos, A. 2019. Mejoramiento de la fluidización de un reactor anaerobio híbrido semifluidizado. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Deng, L., Liu, Y., y Wang, W. 2020. Biogas technology. *Biogas Technol*.

Díaz, A. S., R. L. Rentería, J. A. Cortez y E. S. Palacios. 2008. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México.

Fahrbach, M. J., J. Kuever, R. Meinke, P. Kämpfer y J. Hollender. *Denitratisoma oestradiolicum* gen. nov., sp. nov., a 17  $\beta$ -oestradiol-degrading, denitrifying

betaproteobacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **56**(7):1547-1552.

Fukui H. y M. Tatara.2010. Distillery Wastewater Treatment by Fixed-bed Anaerobic-Aerobic Ditch (FA2D) System. Proceedings of the 12th World Congress on Anaerobic Digestion: Water and Energy for the World. Guadalajara, Jalisco, México.

García-Rodríguez, G. 2015. Estudio de la influencia de la relación C/N en la desnitrificación y metanogénesis de aguas residuales en un reactor anaeróbico de lecho fluidizado inverso. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Minatitlán.

Godon, J. J., E. Zumstein, P. Dabert, F. Habouzit y R. Moletta. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. App Environ Microbiol. **63**(7):2802–2813.

González-García, J. L. 2016. Tratamiento y minimización del lactosuero en un reactor anaerobio híbrido para la producción de bioenergéticos. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

He, Q., C. Feng, N. Chen, D. Zhang, T. Hou, J. Dai, H. Chunbo y B. Mao. 2018. Characterizations of dissolved organic matter and bacterial community structures in rice washing drainage (RWD)-based synthetic groundwater denitrification. Chemosphere. **215**:142-152.

Helmer-Madhok, C., M. Schmid, E. Filipov, T. Gaulm, A. Hippen, K. H. Rosenwinkel, C. F. Seyfriend, M. Wagner y S. Kunst. 2002. Deammonification in biofilm systems populations structure and function. Water Science and Technology. **46**(1-2):223-231.

Hernández-Castelán, D. A. 2017. Análisis del Ciclo de Vida de una planta de aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos para la generación de biocombustibles. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Hosseini, S. E. y M. A. Wahid. 2015. Utilization of biogas released from palm oil mill effluent for power generation using self-preheated reactor. *Energy Conv. Manag.* 105: 957-966.

Hussain A., J. Johain y M. Fawziea. 2021. Effect of pH on biogas production during anaerobic digestion. *Journal of University of Shanghai for Science and Technology.* **23**(8):224-231.

INEGI. 2022. Estadísticas a propósito del día mundial del medio ambiente. [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx). (consultado septiembre, 2022).

Jaramillo-Montoya, F. R. 2018. Diseño de nuevas estrategias de estimación y pronóstico del término de la fase aerobica para el proceso de remoción biológica en reactores batch secuenciales. Tesis de grado. Doctorado en Ingeniería Eléctrica. Universidad de Chile.

Juárez-García, I. A. 2022. Hidrólisis de los residuos de frutas y verduras para la producción de un biofertilizante a nivel laboratorio. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Katayama. T., M. K. Nobu, H. Kusada, X. Y. Meng, N. Hosogi, K. Uematsu y H. Tamaki. 2020. Isolation of a member of the candidate phylum ‘Atribacteria’ reveals a unique cell membrane structure. *Nature Communications.* 11(1):6381.

Khalid, A., M. Arshad, M. Anjum, T. Mahmood, y L. Dawson. 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, **31**(8):1737–1744.

Kiyasudeen, K., M. Hakimi-Ibrahim, S. Quaik y S. Ahmed-Ismail. 2016. Prospects of Organic Waste Management and the Significance of Earthworms. Springer. Suiza.

Kothari, R., A. K. Pandey, S. Kumar, V. V. Tyagi y S. K. Tyagi. 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* **39**:174–195.

Labox. 2022. La técnica de la PCR. Introducción y principios Básicos. [esp.labbox.com](http://esp.labbox.com) (consultada septiembre, 2022).

Laserna-Mendieta, E. y M. J. Claesson. 2016. Creación de librerías mediante amplificación del ARN ribosomal 16S para la caracterización de la microbiota.

Lee, Y. Y., H. Choi y K. S. Cho. 2018. Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N<sub>2</sub>O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *Journal of environmental science and health, Part A*. **54**(1):16-29.

Lehnert, N., B. W. Musselman y L. C. Seefeldt. 2021. Grand challenges in the nitrogen cycle. *Chem. Soc. Rev.* 50,3640.

Lucero, M. J. y L. Guerrero. 2021. Tratamiento biológico de residuos agrícolas por digestión anaerobia y nitrificación-desnitrificación. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, **14**(3):978-996.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2008. Biología de los microorganismos. Decima edición. Pearson-Prentice Hall. Madrid, España.

Mansilla, E. C., R. C. Moreno, A. O. Palomo, C. L. Causapé, F. G. Candelas y M. T. Carmona. 2021. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica.

Mao, Y., X. Zhang, X. Xia, H. Zhong y L. Zhao. 2010. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **37**(9):927-934.

Martínez, M. E. 2004. Eliminación biológica de compuestos orgánicos y nitrogenados presentes en los efluentes de una industria productora de resinas. Memoria de grado. Doctorado en Química. Universidade da Coruña.

Mauerhofer, L. M., B. Reischl, T. Schmider, B. Schupp, K. Nagy, P. Pappenreiter y S. K. M. R. 2018. Physiology and methane productivity of *Methanobacterium thermaggregans*. *Applied microbiology and biotechnology*. **102**:7643-7656

Mellado, O. M. 2020. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*. **3**(30):88-111.

Metcalf y Eddy. 1995. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. 3ª Edición. McGraw-Hill, New York, USA.

Nanninga, H. J. y J. C. Gottschal. 1987. Properties of *Desulfovibrio carbinolicus* sp. nov. and other sulfate-reducing bacteria isolated from an anaerobic-purification plant. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**(4):802-809.

Náthia-Neves, G., M. Berni, G. Dragone, S. I. Mussatto y T. Forster-Carneiro. 2018. Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **15**(9):2033–2046.

NHGRI. 20230. Shotgun Sequencing. [www.genome.gov](http://www.genome.gov) (consultada octubre, 2023)

REMBIO. 2012. Producción de biogás en México. Estado actual y perspectivas. [rembio.org.mx](http://rembio.org.mx). (Consultado el 5 de septiembre 2022).

Rocamora, I., S. T. Wagland, R. Villa, E. W. Simpson, O. Fernández y Y. Bajón-Fernández. 2020. Dry anaerobic digestion of organic waste: A review of operational parameters and their impact on process performance. *Bioresource Technology*, **299**:122681.

Rosas-Mendoza, E. S. 2018. Digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola. Tesis de grado. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Rosas-Mendoza, E. S. 2007. Evaluación de la competencia entre bacterias desnitrificantes y bacterias matanogénicas en un reactor anaerobio. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Roeckel-von-Bennwitz, M., C. B. Arriagada-Gajardo y V. G. Guzmán-Fierro. 2017. Innovative Nitrogen and Carbon Removal. Intech Open, London.

Rubio, S., R. A. Pacheco-Orozco, A. Milena Gómez, S. Perdomo y R. García-Robles. 2020. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Univ. Med. **61**(2):49-63.

Sáez-Rico, J. 2017. Diseño de un reactor anaerobio para la digestión de fangos. Tesis de grado. Ingeniería Química. Universidad Politécnica de Valencia.

Sánchez-Balseca, J. J., I. M. Muñoz-Rodríguez y M. B. Aldás-Sandoval. 2019. Tratamiento biológico de desnitrificación de aguas residuales usando un reactor de biopelícula con cáscara de arroz como fuente de energía. Tecnología y ciencias del agua. **10**(2):78-97.

SEMARNAT. 2019. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, edición 2018. [www.semarnat.com gob.mx](http://www.semarnat.com.gob.mx) (consultada mayo, 2022).

Singh, A., B. Müller, y A. Schnürer. 2021. Profiling temporal dynamics of acetogenic communities in anaerobic digesters using next-generation sequencing and T-RFLP. Scientific reports. **11**(1):1-14.

Shahi, S. K., S. N. Freedman y A. K. Mangalam. 2017. Gut microbiome in multiple sclerosis: the players involved and the roles they play. Gut microbes. **8**(6):607-615.

Shao, S. 2015. Estudio de optimización de la codigestión anaerobia de residuos orgánicos mediante simulación numérica. Tesis de grado. Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidaad Politecnica de Catalunya.

Soler-Jofra, A., J. Pérez, y M. C. van Loosdrecht. 2021. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review. *Water Research*. **190**, 116723.

Stein, L. Y. y M. G. Klotz. 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology*. **26**: R83–R101.

Sung, Y., K. E. Fletcher, K. M. Ritalahti, R. P. Apkarian, N. Ramos-Henández, R. A. Sanford y F. E. Löffler. 2006. *Geobacter lovleyi* sp. nov. strain SZ, a novel metal-reducing and tetrachloroethene-dechlorinating bacterium. *Applied and environmental microbiology*. **72**(4):2775-2782.

Tamay de Dios, L., C. Ibarra y C. Valasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. **2**(2):70-78.

Thorndycroft, F., G. Butland., D. J. Richardson y N. Watmough. 2007. A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme. *Biochemical Journal*. **401**(1):111-119.

Tozuel, J. P., G. Prensier, J. L. Roustan, I. Thomas, H. C. Dubourguier y G. U. Y Albagnac. 1998. Description of a new strain of *Methanothrix soehngenii* and rejection of *Methanothrix concilii* as a synonym of *Methanothrix soehngenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*. **38**(1):30-36.

Tugtas, A. E., U. Tezel y S. G. Pavlostathis. 2006. An extension of the Anaerobic Digestion Model No. 1 to include the effect of nitrate reduction processes. *Water Science and Technology*. **54**(4):41-49.

Villaraldo-Falfán, L. 2018. Balance energético comparativo del proceso de generación de biogás a partir de un lodo residual y un lodo residual pretratado. Tesis de grado. Maestría en Ciencias en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Wang, H., N. Chen, C. Feng, Y. Deng y Y. Gao. 2020. Research on efficient denitrification system based on banana peel waste in sequencing batch reactors: Performance, microbial behavior and dissolved organic matter evolution. *Chemosphere*, **253**:126693.

Pérez-Mayet, O. 2017. Evaluación del desempeño de un reactor de biopelícula a escala piloto en el proceso de conversión de ROSM en bioenergéticos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba.

Xia, X., S. Zhang, S. Li, L. Zhang, G. Wang, L. Zhang y Z. Li. 2018. The cycle of nitrogen in river systems: sources, transformation, and flux. *Environmental science: Processes & impacts*. **20**(6), 863-891.

Zhang, K., J. Gu, X. Wang, Y. Yin, X. Zhang, R. Zhang, X. Tuo y L. Zhang. 2018. Variations in the denitrifying microbial community and functional genes during mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Science of the Total Environment*. **634**:501-508.

Zhang, Q., J. Hu y D. Lee. 2017. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renewable Energy*. **98**:108-119.

Zamri, M. F. M. A., S. Hasmady, A. Akhiar, F. Ideris, A. H. Shamsuddin, M. Monfijur, I. M. Rizwanul Fattah y T. M. I. Mahlia. 2021. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Renewable and sustainable Energy Reviews*. **137**:110637.

Zhao, Z., J. Luo, B. Jin, J. Zhang, B. Li, B. Ma, X. An, S. Zhang y B. Shan. 2018. Analysis of Bacterial Communities in Partial Nitrification and Conventional Nitrification Systems for Nitrogen Removal. *Nature*. **8**(1):1-9.

Zhu, Z., Y. Zhao, Y. Guo, R. Zhang, Y. Pan y T. Zhou. 2021. A novel additional carbon source derived from rotten fruits: Application for the denitrification from mature landfill leachate and evaluation the economic benefits. *Bioresource Technology*. **334**: 123244.