



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – AIRE

REMOCIÓN ANÓXICA DE METANO BAJO CONDICIONES DESNITRIFICANTES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA ORTIZ ZÚÑIGA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. GUILLERMO QUIJANO GOVANTES (INSTITUTO DE INGENIERÍA)

COMITÉ TUTORAL

Dr. IVAN MORENO ANDRADE (INSTITUTO DE INGENIERÍA)

Dr. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO (UAM-IZTAPALAPA)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Iván Moreno Andrade

Secretario: Sr. Ulises Durán Hinojosa

Vocal: Dr. Julián Carrillo Reyes

1<sup>er</sup> suplente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

2<sup>do</sup> suplente: Dr. Guillermo Quijano Govantes

Lugar donde se realizó la tesis:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS AVANZADOS DE  
TRATAMIENTO DE AGUAS, UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA, INSTITUTO DE  
INGENIERÍA, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

---

Dr. Guillermo Quijano Govantes

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se llevó a cabo con el apoyo de los siguientes proyectos de investigación:

- Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, a través del proyecto de Investigación Científica Básica A1-S-10079.
- DGAPA-UNAM, a través del Proyecto IA100719.

María Fernanda Ortiz Zúñiga agradece la beca de CONACYT para realizar estudios de maestría (Beca #11026).

Se agradece el apoyo técnico de Gloria Moreno Rodríguez, Jaime Pérez Trevilla y Ángel A. Hernández Huerta para la realización de esta tesis.

## CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	6
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	9
<b>NOMENCLATURA</b>	10
<b>RESUMEN</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	13
1.1 El metano como gas de efecto invernadero	13
1.2 Fuentes principales de emisión de CH <sub>4</sub>	14
1.3 Sistemas de eliminación de CH <sub>4</sub>	16
1.3.1 Tecnologías fisicoquímicas	16
1.3.2 Tecnologías biológicas	19
1.4 Mecanismos de remoción biológica de metano	23
1.4.1 Proceso aerobio	23
1.4.2 Proceso anóxico desnitrificante	26
<b>2. HIPÓTESIS</b>	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
4.1 Medio de sales minerales (MSM)	30
4.2 Enriquecimiento de la comunidad microbiana OXANME	31
4.3 Proceso OXANME en continuo	31
4.4 Compuesto donador de electrones inicial para el proceso OXANME	33
4.5 Efecto de la concentración de nitrato en la acumulación de óxido nitroso	34
4.6 Caracterización de las comunidades microbianas	34
4.7 Parámetros de operación y desempeño del proceso OXANME	35

4.8	Procedimientos analíticos	38
4.8.1	Análisis en la fase gaseosa	38
4.8.2	Análisis en la fase líquida	38
4.8.3	Caracterización de las comunidades microbianas	39
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
5.1	Enriquecimiento de la biomasa	40
5.2	Proceso OXANME en reactor de tanque agitado	42
5.2.1	Remoción de metano	42
5.2.2	Aceptor de electrones del proceso OXANME	46
5.2.3	Consumo de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y balance de nitrógeno	47
5.3	Caracterización de las comunidades microbianas	53
5.3.1	Análisis de las comunidades arqueales	53
5.3.2	Análisis de las comunidades bacterianas	55
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>70</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis, la dedico principalmente a mi familia; gracias a ella se pudo cumplir este gran sueño.

*A mi madre:*

Por su gran apoyo, motivación, palabras de aliento y sabios consejos, pero sobre todo por su amor incondicional. Tu respaldo fue fundamental para la culminación de esta tesis.

*A mi padre:*

Por darme la oportunidad de realizar este sueño, por sus consejos, apoyo y su amor, gracias por ser mi ejemplo de vida y por todas las enseñanzas que me has dado.

*A mi Chuy:*

Por ser mi superheroína y enseñarme a vivir la vida, disfrutarla a pesar de las adversidades y retos que se te presenten. Tu nube viajera es tu más grande admiradora.

*A mi hermano:*

Por brindarme su amor, confianza y apoyo ante cualquier situación, cuidándome en todo momento y ser mi eterna compañía.

*A mi tutor:*

Por la confianza y el apoyo brindado, dejándome grandes enseñanzas profesionales como personales.

*Al equipo de investigadores y alumnos del Instituto de Ingeniería, Unidad Juriquilla:*

Por el aprendizaje transmitido, por apoyarme en todo momento tanto en aspectos profesionales como personales. Por brindarme su amistad dentro y fuera del Instituto ¡Gracias totales!

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Emisiones de metano entre los años de 2005 – 2012.	14
<b>Figura 2</b>	Tecnologías fisicoquímicas convencionales para el tratamiento de contaminantes gaseosos.	17
<b>Figura 3</b>	Representación esquemática de un (A) biofiltro, (B) biofiltro percolador, (C) biolavador y (D) sistema de difusión en lodos activos.	22
<b>Figura 4</b>	Vía de oxidación aerobia del metano en los metanotrofos. Tipo de metano monooxigenasa (MMO), metano monooxigenasa soluble (sMMO) y metano monooxigenasa particulada (pMMO).	23
<b>Figura 5</b>	Metanogénesis inversa.	27
<b>Figura 6</b>	Esquema general del montaje experimental del cultivo OXANME: (1) puerto de muestreo de líquido; (2) puerto de muestreo de gas; (3) sensor óptico de O <sub>2</sub> ; (4) válvula de ajuga calibrada; (5) control automatizado de intercambio de MSM.	32
<b>Figura 7</b>	Concentraciones de metano y CO <sub>2</sub> (en fase gaseosa), así como de nitrato durante el enriquecimiento del cultivo OXANME, donde: concentración de CH <sub>4</sub> (círculos), concentración de CO <sub>2</sub> (triángulos) y concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (rombos). La línea punteada representa la renovación del espacio de cabeza y la adición de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> a la botella.	41
<b>Figura 8</b>	Eficacia y capacidad de eliminación durante el cultivo OXANME, donde: eficiencia de remoción (ER, cuadrados), capacidad de eliminación (CE, triángulos). Las líneas punteadas representan los cambios de concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en la entrada al sistema. La línea roja representa adición de inhibidor de arqueas (BES).	43
<b>Figura 9</b>	Concentración de O <sub>2</sub> disuelto (cuadrados) y pH (círculos) en el reactor. Línea verde punteada representa el límite reportado en la literatura para llevar a cabo el proceso bajo condiciones anóxicas. Las líneas punteadas representan los cambios de concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en la entrada al sistema. Línea roja representa adición de inhibidor (BES).	47
<b>Figura 10</b>	Concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (cuadrados), concentración de proteína (triángulos) y tasa de producción de N <sub>2</sub> O (rombos) dentro del sistema OXANME. Líneas punteadas representan los cambios de concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en la entrada al sistema. Línea roja representa adición de inhibidor (BES).	50

<b>Figura 11</b>	Adhesión y acumulación de la biomasa en el reactor durante el proceso OXANME. Las flechas indican los puntos de acumulación de biomasa más importantes.	52
<b>Figura 12</b>	Caracterización de los géneros de las poblaciones arqueales desde el inóculo inicial a las diferentes etapas experimentales.	55
<b>Figura 13</b>	Abundancia relativa de los filos presentes en el lodo secundario.	56
<b>Figura 14</b>	Abundancia relativa de los filos presentes el día 96 de enriquecimiento y aclimatación del cultivo OXANME.	58
<b>Figura 15</b>	Abundancia relativa de los filos presentes en la etapa experimental II.	60
<b>Figura 16</b>	Abundancia relativa de los filos presentes en el reactor antes de añadir el inhibidor BES.	62
<b>Figura 17</b>	Abundancia relativa de los filos presentes en el reactor después de añadir el inhibidor BES.	64
<b>Figura 18</b>	Evolución de las comunidades bacterianas desde el inóculo inicial hasta la última etapa experimental con una abundancia relativa mayor al 1% los identificados debajo de este valor fueron agrupados en la categoría de “otros”.	67

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Clasificación y características de reactores biológicos para el tratamiento de contaminantes gaseosos.	21
<b>Tabla 2</b>	Composición del medio de sales minerales.	30
<b>Tabla 3</b>	Fases experimentales estudiadas en el reactor de tanque agitado.	37
<b>Tabla 4</b>	Desempeño del reactor de tanque agitado en la remoción de metano en las diferentes fases experimentales estudiadas.	44
<b>Tabla 5</b>	Flujos de nitrógeno en el reactor y balance de masa.	50
<b>Tabla 6</b>	Bacterias presentes en el lodo con una abundancia mayor al 1%.	57
<b>Tabla 7</b>	Caracterización bacteriana de la etapa de enriquecimiento y aclimatación con una abundancia mayor al 1%.	59
<b>Tabla 8</b>	Caracterización bacteriana de la etapa experimental II con una abundancia mayor al 1%.	61
<b>Tabla 9</b>	Caracterización bacteriana del reactor antes de añadir el inhibidor BES con una abundancia mayor al 1%.	63
<b>Tabla 10</b>	Caracterización bacteriana del reactor después de añadir el inhibidor BES con una abundancia mayor al 1%.	65

## NOMENCLATURA

Parámetro	Definición	Unidades
ANME	Arqueas metanotróficas anaerobias	
CE	Capacidad de eliminación de metano	$\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$
$C_e$	Concentración de entrada de $\text{CH}_4$ en el gas	$\text{g m}^{-3}$
COV	Compuestos orgánicos volátiles	
$C_s$	Concentración de salida de $\text{CH}_4$ en el gas	$\text{g m}^{-3}$
ER	Eficiencia de remoción de $\text{CH}_4$	$\text{g de CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{h}^{-1}$
F	Flujo de gas	$\text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$
GEI	Gases de efecto invernadero	
HEL	Límite superior de explosividad	%
kJ	KiloJoules	
L	Carga de metano	$\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$
$L_{\text{N-NO}_3^-}$	Carga de $\text{N-NO}_3^-$	$\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{h}^{-1}$
LEL	Límite inferior de explosividad	%
MDH	Enzima metanol deshidrogenasa	
MEA	Monoetanolamina	
MMO	Enzima metano monooxigenasa	
MSM	Medio de sal mineral	
Mt	Mega toneladas	
OD	Oxígeno disuelto	$\text{g m}^{-3}$
OXANME	Proceso de oxidación anóxica de metano	
Q	Flujo del líquido	$\text{m}^{-3} \text{h}^{-1}$
$R_{\text{N-NO}_3^-}$	Tasa de consumo de $\text{N-NO}_3^-$	$\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{h}^{-1}$
$R_d$	Flujo másico de nitrógeno dirigido a la desnitrificación	$\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{h}^{-1}$
$R_x$	Flujo másico de nitrógeno dirigido a la biomasa	$\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{h}^{-1}$
TRG	Tiempo de residencia del gas en el sistema de tratamiento	min
TRH	Tiempo de retención hidráulica	h
$V_L$	Volumen del líquido	$\text{m}^{-3}$

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió un sistema anóxico desnitrificante que utilizó metano ( $\text{CH}_4$ ) como donador de electrones. El proceso estuvo enfocado al aprovechamiento de metano no utilizado en la generación de energía térmica/eléctrica para la remoción de nitrógeno, en el contexto del tratamiento de aguas residuales. La remoción anóxica de metano se implementó en un reactor de tanque agitado con las fases gaseosa y líquida operadas en continuo y semi-continuo, respectivamente. Se estudiaron cinco etapas experimentales, en las que se evaluaron diferentes tasas de suministro de  $\text{NO}_3^-$ . El desempeño del sistema se evaluó en términos de capacidad de eliminación y eficiencia de remoción de  $\text{CH}_4$ , así como la tasa de consumo de nitrato ( $R_{N-\text{NO}_3^-}$ ) y emisión potencial de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) durante el proceso. El sistema anóxico presentó una tasa de remoción promedio de metano de  $32.1 \pm 11.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (referente a una eficiencia de remoción de  $4.1 \pm 1.5\%$ ), así como una tasa de remoción de  $\text{N-NO}_3^-$  en un rango de 0.9 a 3.8  $\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , sin emisión de  $\text{N}_2\text{O}$  bajo las condiciones de operación estudiadas. La caracterización de las poblaciones arqueales y bacterianas por secuenciación masiva de ADNr 16S mostró que el proceso de remoción anóxica de metano puede llevarse a cabo exclusivamente con bacterias, siendo el metano el donador de electrones del proceso, debido a la baja concentración de  $\text{O}_2$  disuelto en el reactor, descartando su oxidación por vía aerobia. Con el presente estudio se logró comprender interrogantes fundamentales del proceso OXANME.

**Palabras clave:** comunidad microbiana, metano, nitrato, proceso anóxico desnitrificante, reactor de tanque agitado.

## ABSTRACT

The present work studied a denitrifying anoxic system using methane ( $\text{CH}_4$ ) as an electron donor. The process focused on removing methane not used for thermal/electrical energy generation, which is a powerful greenhouse gas. In addition, the process herein proposed allows for nitrogen removal in the context of wastewater treatment. Anoxic methane removal was implemented in a stirred tank reactor with continuous and semi-continuous operating gas and liquid phases, respectively. Five experimental stages were studied, in which different  $\text{NO}_3^-$  supply rates were evaluated. System performance was assessed in terms of  $\text{CH}_4$  removal capacity and removal efficiency, as well as the rate of nitrate consumption ( $R_{N-\text{NO}_3^-}$ ) and potential emission of nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) during the process. The anoxic system had an average methane elimination capacity of  $32.1 \pm 11.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (relative to a removal efficiency of  $4.1 \pm 1.5\%$ ), as well as a removal rate of  $\text{N-NO}_3^-$  in a range of 0.9 a  $3.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . No  $\text{N}_2\text{O}$  emissions were observed under the operating conditions studied. The characterization of archaeal and bacterial populations by 16S rRNA gene sequencing showed that the process anoxic methane removal can be carried out exclusively with bacteria, with methane being the electron donor of the process, due to the negligible dissolved  $\text{O}_2$  concentration in the reactor, ruling out any potential aerobic oxidation. This study provides insights on both the understanding of the OXANME process fundamentals and performance under experimental conditions relevant in the context of wastewater treatment.

**Keywords:** microbial community, methane, nitrate, denitrifying anoxic process, stirred tank reactor.

# 1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1.1 El metano como gas de efecto invernadero

El calentamiento global se define como la modificación en la temperatura media global en superficie de la Tierra (IPCC, 2013). Este fenómeno se ha convertido en una problemática de suma importancia y actualmente se implementan soluciones para contrarrestar dicho cambio climático. El ascenso constante de temperatura se produce por la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. Los GEI son generados por fuentes naturales y antropogénicas (producidas por actividades humanas). El metano contribuye con el 10-16% de las emisiones de GEI en el planeta y sus emisiones se incrementan en 0.2-1% anualmente (López y col., 2017). En conjunto, las emisiones de CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> representan aproximadamente el 98% del total de los GEI (EPA, 2017). El CH<sub>4</sub> es un gas incoloro, inodoro, con baja solubilidad en agua (constante adimensional de Henry de 30 a 25°C y 1 atm), con una vida media en la atmósfera de 12 años y con un potencial de calentamiento global ~32 veces mayor que el CO<sub>2</sub> (Neumann y col., 2019). De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), se estima que las emisiones antropogénicas globales de metano aumenten en un 23% de 2005 a 2020 (EPA, 2010).

El metano es un gas combustible con poder calorífico de 35.9 MJ/N m<sup>3</sup>, que puede ser de origen fósil o bien, ser producido por descomposición anaerobia de materia orgánica. El CH<sub>4</sub> es más liviano que el aire, con una densidad de 0.55, con un límite inferior y superior de explosividad (LEL y HEL) de 5% y 15%, respectivamente

(Noyola y col., 2006). Esto implica que la operación de procesos en este rango de concentraciones de CH<sub>4</sub> tiene un riesgo de explosión, como ocurre en los casos de la extracción de petróleo y gas natural.

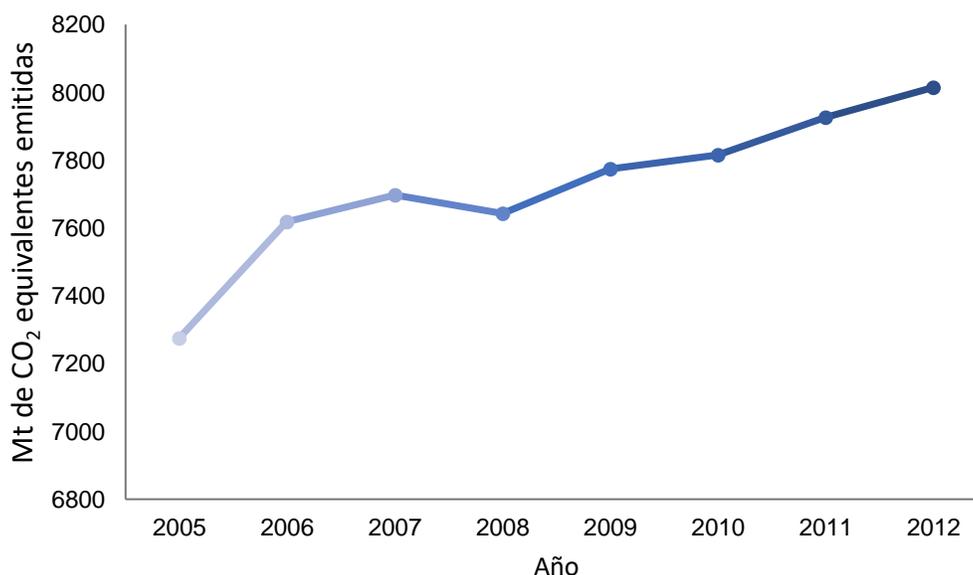
La utilización del metano para la producción de energía térmica y eléctrica en sistemas de aprovechamiento es posible cuando la concentración de CH<sub>4</sub> es igual o superior al 60% (Noyola y col., 2006; Rocha-Ríos y col., 2009). En este contexto, existen corrientes diluidas que contienen metano y que no son utilizadas para la generación de energía eléctrica o térmica. Este es el caso del metano generado en los rellenos sanitarios que han sido operados durante más de 25 años y que presentan una concentración de metano menor al 20%. Asimismo, los efluentes líquidos de digestores anaerobios (operados a altas presiones), pueden emitir el metano disuelto una vez que están a presión atmosférica (Daelman y col., 2012). Estas corrientes diluidas de CH<sub>4</sub> deben ser tratadas para evitar emisiones de este importante GEI a la atmosfera.

## **1.2 Fuentes principales de emisión de CH<sub>4</sub>**

Las fuentes de emisión de CH<sub>4</sub> más relevantes a nivel mundial incluyen la extracción y transporte de carbón, gas natural y petróleo, así como actividades agrícolas y ganaderas intensivas, descomposición de residuos orgánicos en rellenos sanitarios y el tratamiento de aguas residuales (EPA, 2017). En plantas de tratamiento de aguas residuales el metano es producido por degradación anaerobia de materia orgánica, tanto en el tratamiento de agua como en la digestión de lodos. La cantidad

de CH<sub>4</sub> producido depende principalmente de la concentración de materia orgánica degradable, de la temperatura y del tipo de sistema de tratamiento. El valor por defecto de la capacidad máxima de producción de CH<sub>4</sub> para las aguas residuales domésticas es de 0.6 kg de CH<sub>4</sub>/ kg de DBO (Doorn y col. 2006).

En la extracción y transporte de carbón, gas natural y petróleo, el CH<sub>4</sub> es emitido a la atmósfera producto de actividades operacionales, actividades de mantenimiento, emergencias en los gasoductos o por fugas en los equipos utilizados en la industria. Estas emisiones se conocen como emisiones fugitivas (Franklin y col., 2006). De acuerdo con el Banco Mundial la emisión global de metano en el periodo de 2005 al 2012 se incrementó en un 10.15%, en términos de mega toneladas (Mt) de CO<sub>2</sub> equivalentes emitidas (Figura 1).



**Figura 1.** Emisiones de metano entre los años de 2005 - 2012 (adaptado de BIRF, 2019).

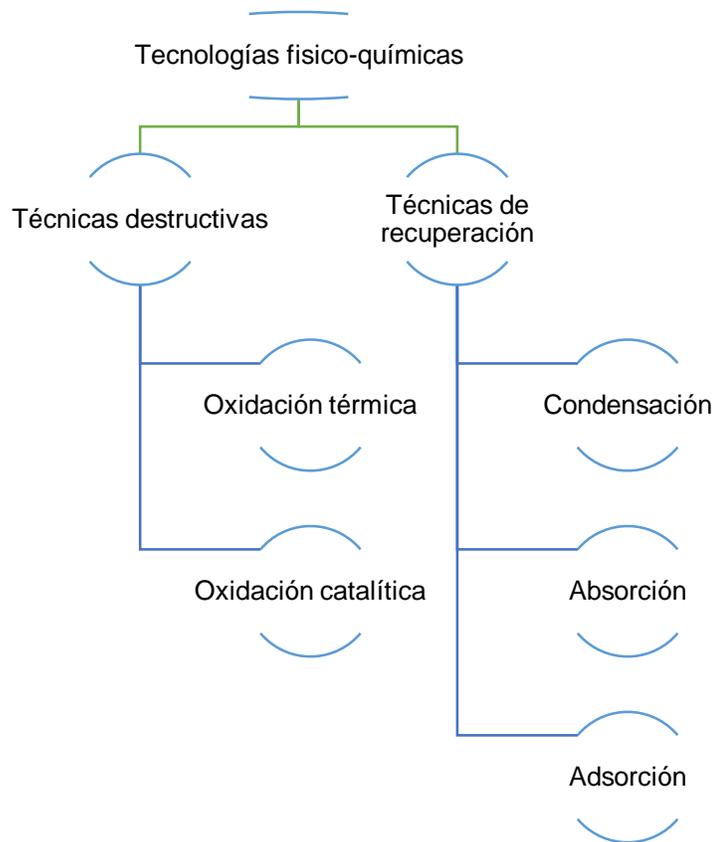
### 1.3 Sistemas de eliminación de CH<sub>4</sub>

Las tecnologías disponibles para la eliminación de CH<sub>4</sub> pueden clasificarse en dos grandes grupos: (i) tecnologías fisicoquímicas y (ii) tecnologías biológicas. Las tecnologías fisicoquímicas, en general se caracterizan por tratar corrientes de gas donde el flujo y la concentración de contaminantes son altos (Noyola y col., 2006). Para el caso del CH<sub>4</sub>, algunas tecnologías fisicoquímicas no pueden ser utilizadas con éxito debido a las características de baja solubilidad del CH<sub>4</sub>, así como las concentraciones encontradas en las corrientes diluidas de metano provenientes de rellenos sanitarios y plantas de tratamiento de aguas residuales. Por otra parte, las tecnologías biológicas se basan en la acción de los microorganismos para oxidar el CH<sub>4</sub> hasta CO<sub>2</sub> y agua (Semrau y col., 2010). A continuación, se describen las tecnologías más utilizadas para la remoción de metano.

#### *1.3.1 Tecnologías fisicoquímicas*

Las tecnologías fisicoquímicas se dividen principalmente en dos grupos: las de recuperación y las destructivas (Figura 2). Entre las tecnologías fisicoquímicas de recuperación más utilizadas se encuentran la condensación, absorción y adsorción (Quijano y col., 2017). Los procesos de condensación se pueden realizar disminuyendo la temperatura de la corriente gaseosa a tratar a presión constante, o bien aumentando la presión de la corriente gaseosa a temperatura constante (Revah y Morgan-Sagastume, 2005). Este tratamiento se aplica a corrientes gaseosas donde el gas a remover es fácilmente condensable, es decir que estén

presentes en concentraciones por encima de  $30\text{-}50\text{ g m}^{-3}$  y con puntos de ebullición por encima de los  $37^{\circ}\text{C}$  (Khan y Ghoshal, 2000). Dado que el  $\text{CH}_4$  tiene un punto de ebullición de  $-161^{\circ}\text{C}$ , no es recomendable su tratamiento por esta tecnología (ECHA, 2019).



**Figura 2.** Tecnologías fisicoquímicas convencionales para el tratamiento de contaminantes gaseosos (Adaptado de Quijano y col., 2017).

En los procesos de absorción, la corriente gaseosa a tratar es puesta en contacto con un disolvente líquido (que generalmente es agua), siendo el principal objetivo la transferencia del  $\text{CH}_4$  de la fase gaseosa hacia la fase líquida, logrando su depuración (Schnelle y col., 2015). Estos sistemas son recomendables para una

amplia gama de flujos de aire ( $100 - 100,000 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ ) y concentraciones de contaminante de  $10 - 50 \text{ g m}^{-3}$  (Delhoménie y Heitz, 2005). Las fases líquidas disolventes más utilizadas en estos procesos son soluciones de hidróxido de sodio (NaOH), metildietanolamina y monoetanolamina (Ghobadi y col., 2018). Una característica de los procesos de absorción es su alto requerimiento de reactivos químicos y alto consumo energético, lo cual tiene importantes impactos económicos y ambientales que deben considerarse antes de su instalación (Morero y Campanella, 2013).

Por otra parte, los procesos de adsorción se basan en el contacto de las moléculas del  $\text{CH}_4$  con la superficie de un adsorbente sólido (Quijano y col., 2017). El carbón activado y el gel de sílice se encuentran entre los materiales adsorbentes más utilizados en la depuración de corrientes gaseosas (Kim y Lee, 2019). Una vez saturado, el adsorbente puede regenerarse aplicando calor o disminuyendo la presión para volatilizar los compuestos adsorbidos. Cuando se regenera el material adsorbente en el mismo proceso de tratamiento se denomina "adsorción regenerativa", la cual requiere un alto gasto energético para regenerar el adsorbente, al utilizarse altas temperaturas para este propósito (Quijano y col., 2017).

Las tecnologías fisicoquímicas destructivas más comunes son la oxidación térmica y la oxidación catalítica. En la oxidación térmica la corriente gaseosa contaminada es elevada a temperaturas entre los  $650^\circ\text{C}$  y los  $800^\circ\text{C}$  con el fin de conseguir la oxidación de prácticamente todos los compuestos orgánicos volátiles (COV). Por otro lado, la oxidación catalítica es favorecida por el uso de catalizadores basados

en platino o paladio, que reducen los requisitos de energía para la combustión (Revah y Morgan-Sagastume, 2005). Las temperaturas de operación en procesos de oxidación catalítica para producir la descomposición de los contaminantes van de los 370°C a los 480°C (Khan y Ghoshal, 2000). Esto representa un ahorro energético importante con respecto a los procesos de oxidación térmica. Sin embargo, el uso de los catalizadores y su confinamiento (una vez descartados del proceso) también genera costos e impactos ambientales (Delhoménie y Heitz, 2005).

En términos generales, se puede concluir que las tecnologías fisicoquímicas son altamente eficientes ya que, bajo condiciones óptimas de operación sus eficiencias de remoción de contaminantes están entre el 90-99% (Khan y Ghoshal., 2000). Sin embargo, su alta demanda energética, uso de reactivos potencialmente tóxicos, así como grandes requerimientos de agua hacen que las tecnologías fisicoquímicas sean muy costosas y con impactos ambientales negativos (Shareefdeen, 2005).

### *1.3.2 Tecnologías biológicas*

Las tecnologías biológicas son una alternativa atractiva para la eliminación de contaminantes gaseosos, ya que son significativamente menos costosas que sus contrapartes fisicoquímicas y son amigables con el ambiente (Muñoz y col., 2015). Además, las tecnologías biológicas en muchos casos permiten la conversión completa de los contaminantes gaseosos en compuestos menos tóxicos o con menor impacto ambiental que los compuestos originales (Kennes y Thalasso, 1998).

Las biotecnologías para el tratamiento de gases se basan en la capacidad de las comunidades microbianas para metabolizar los contaminantes y convertirlos en compuestos menos tóxicos o inocuos para el ser humano y el ambiente (Shareefdeen, 2005).

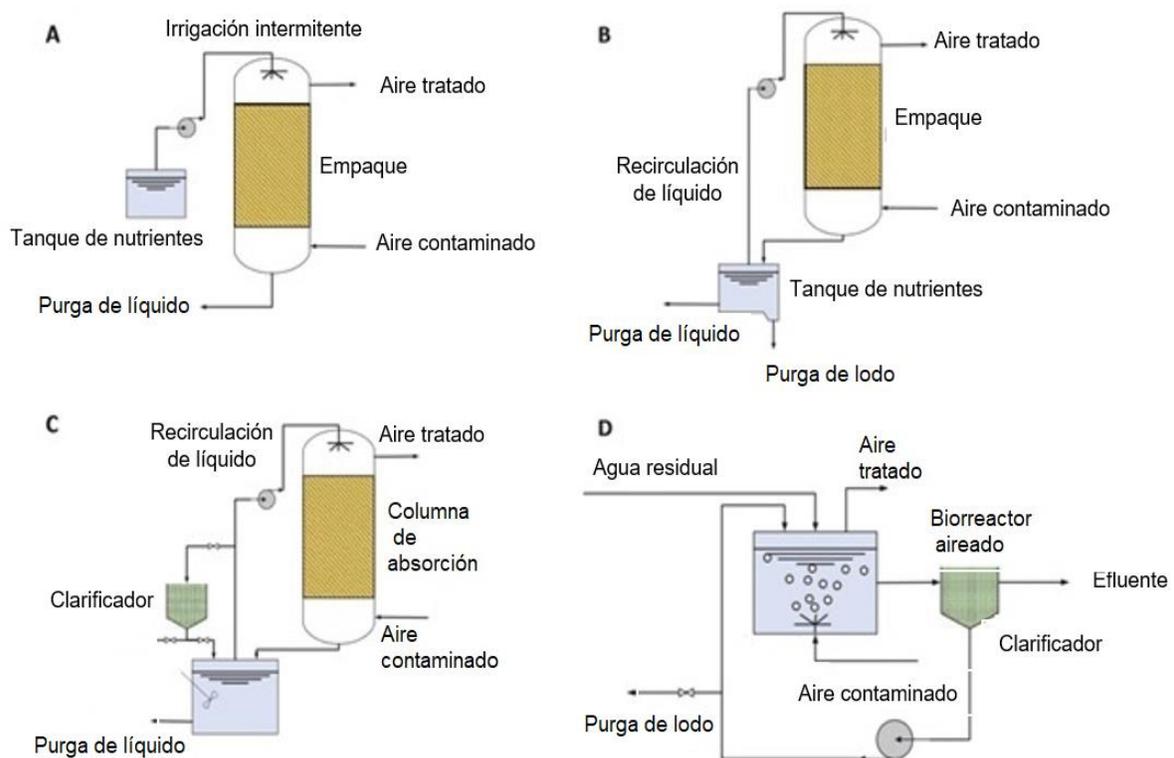
Dependiendo del tipo de proceso y de la naturaleza de los contaminantes gaseosos, los productos finales de las tecnologías biológicas de tratamiento pueden ser  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y biomasa (Revah y Morgan-Sagastume, 2005; Quijano y col., 2017). Dado que los microorganismos requieren agua para llevar a cabo sus procesos metabólicos, el primer paso para la eliminación de los contaminantes gaseosos es su transferencia de la fase gaseosa a una fase acuosa (Muñoz y col., 2015). Por ello, la solubilidad de los contaminantes gaseosos es un parámetro muy importante para la selección del sistema biológico idóneo de tratamiento. El principal reto de la remoción de metano es su baja solubilidad en agua, al ser de naturaleza hidrofóbica (López y col., 2017). Por lo tanto, los sistemas de tratamiento de metano suelen estar limitados por el transporte del  $\text{CH}_4$  y no por la reacción biológica (Islas-Lima y col., 2002). La Tabla 1 presenta un resumen de diferentes tipos de reactores biológicos y sus características fundamentales de operación, así como los contaminantes gaseosos para los que se recomienda su uso.

**Tabla 1.** Clasificación y características de reactores biológicos para el tratamiento de contaminantes gaseosos (adaptada de Delhoménie y Heitz, 2005; Muñoz y col., 2015).

Reactor	Crecimiento de la biomasa	Fase líquida	Fundamento de operación
Biofiltro	Biopelícula sobre un soporte orgánico (corteza de árbol, composta, cáscaras de nueces) o inorgánico (perlita, piedras porosas).	El reactor se irriga con medio de sales minerales de forma intermitente. El lixiviado del reactor se descarta.	El reactor consiste en una columna empacada donde la corriente gaseosa se introduce co- o contra-corriente con respecto al líquido. Recomendables para contaminantes hidrofóbicos*. Sistemas de fácil diseño y operación. Sistemas de bajo costo.
Biofiltro percolador	Biopelícula inmovilizada en un soporte inorgánico como arena, empaques plásticos y metálicos.	Solución de sales minerales, irrigación sobre un lecho empacado.	La corriente gaseosa pasa a través de una columna empacada co- o contra-corriente con respecto al líquido. La biopelícula inmovilizada en el lecho empacado es continuamente irrigada con una solución de sales minerales. El gas absorbido en la solución acuosa es degradado en la biopelícula. La fase líquida se recircula de forma continua o intermitente. Recomendados para la eliminación de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) y contaminantes moderadamente hidrofílicos e hidrofóbicos*.
Biolavador	Biomasa suspendida en el biorreactor, en el medio de cultivo acuoso.	Solución acuosa de sales minerales en la que crece la biomasa en forma suspendida.	El proceso consta de dos etapas: i) una columna de absorción y ii) un biorreactor. En la columna de absorción se transfieren los contaminantes a la fase líquida. La corriente gaseosa y la solución acuosa fluyen co- o contra-corriente en la columna de absorción. Sistema con estabilidad de operación y control de parámetros como pH y concentración de nutrientes. Recomendados para contaminantes moderadamente hidrofílicos*.
Sistema de difusión en lodos activos	Biomasa suspendida o fija en el reactor.	Agua residual donde crecen los microorganismos.	Tanque donde se burbujan los contaminantes gaseosos en una fase líquida (lodos activos). El contaminante es absorbido y degradado por los microorganismos presentes en el agua residual de forma aerobia. Recomendados para contaminantes hidrofílicos*.

\*La clasificación *hidrofóbicos*, *moderadamente hidrofílicos* e *hidrofílicos* se refiere a compuestos con constantes adimensionales de Henry de 1-70, 0.1-0.99 y 0.0001-0.099, respectivamente (Muñoz y col., 2012).

En la Figura 3 se muestran representaciones esquemáticas de las diferentes configuraciones de biorreactores para el tratamiento de contaminantes gaseosos, observándose las diferencias principales tanto en el diseño del reactor como en las características de operación de los sistemas. Es importante mencionar que mientras los mecanismos metabólicos pueden ser similares en diferentes configuraciones de biorreactor, se pueden observar diferencias en la eficacia de remoción de un sistema a otro debido a diferencias en la transferencia de masa y en las condiciones hidrodinámicas, lo que afecta significativamente la biodegradación de los compuestos a tratar (Delhoménie y Heitz, 2005; Revah y Morgan-Sagastume, 2005).



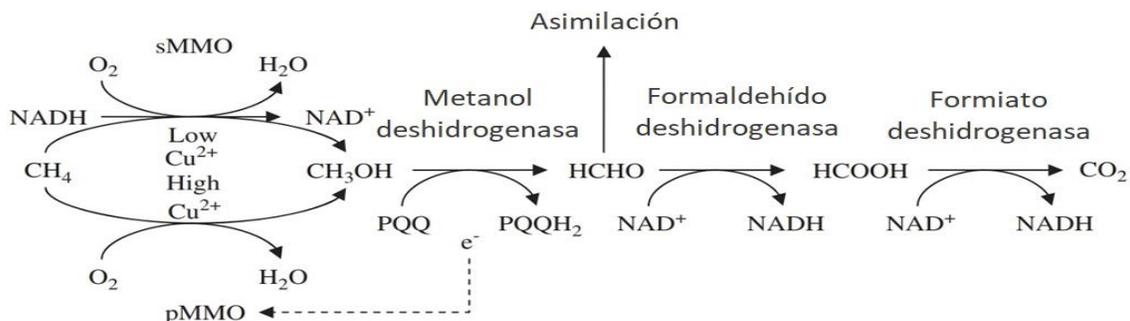
**Figura 3.** Representación esquemática de un (A) biofiltro, (B) biofiltro percolador, (C) biolavador y (D) sistema de difusión en lodos activos (adaptado de Muñoz y col., 2015).

## 1.4 Mecanismos de remoción biológica de metano

La oxidación biológica de metano involucra diferentes rutas metabólicas, cuyas reacciones se pueden agrupar principalmente en dos conjuntos, dependiendo del ambiente en donde se lleven a cabo: aerobios y anóxicos, los cuales se escriben a continuación.

### 1.4.1 Proceso aerobio

La oxidación aerobia se lleva a cabo por microorganismos metanotrofos, los cuales utilizan al metano como fuente de carbono y energía, y su oxidación completa resulta en la formación de  $\text{CO}_2$  y biomasa (Figura 4).



**Figura 4.** Vía de oxidación aerobia del metano en los metanotrofos. Tipo de metano monooxigenasa (MMO), metano monooxigenasa soluble (sMMO) y metano monooxigenasa particulada (pMMO). (adaptado de Modín y col., 2007).

Los metanotrofos son un subconjunto de bacterias conocidas como metilótrofos, todas ellas incluidas en el grupo de las proteobacterias (Hanson y Hanson, 1996). Se pueden distinguir tres tipos de metanotrofos: I, II y X, los cuales se diferencian principalmente por su morfología celular, filogenética y rutas metabólicas, así como por ciertas características fisiológicas, como se describe a continuación:

**Tipo I:** Este grupo incluye los géneros *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylocaldum* y *Methylosphaera*. Asimila el formaldehído producido a partir de la oxidación de metano por medio de la ribulosa monofosfato (RuMP) y sus membranas contienen ácidos grasos con 16 átomos de carbono (Murrell y Radajewski, 2000; López y col., 2013).

**Tipo II:** Este grupo pertenece a las  $\alpha$ -proteobacterias, incluyendo los siguientes géneros: *Methylosinus*, *Methylocystis* y *Methylocella*. Usan la ruta de la serina para la asimilación de formaldehído y sus membranas contienen ácidos grasos con 18 carbonos (Hanson y Hanson, 1996; Murrell y Radajewski, 2000; López y col., 2013).

**Tipo X:** A este grupo pertenece el género *Methylococcus*, combina características de los grupos I y II: tienen ácidos grasos con 16 átomos de carbono y la asimilación de formaldehído la realizan a través del ciclo de la ribulosa monofosfato y la ruta de la serina, además de poseer ribulosa-1,5-bifosfato (Semrau y col., 2010).

Los metanotrofos poseen la enzima conocida como metano monooxigenasa (MMO), la cual convierte el metano en metanol (Hanson y Hanson, 1996). La enzima MMO cataliza la oxidación de una amplia variedad de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos (Bratina y col. 1992). Esta enzima utiliza dos equivalentes reductores para dividir los enlaces O-O de dioxígeno. Uno de los átomos de oxígeno

es reducido a H<sub>2</sub>O y el otro se incorpora al metano para la formación de metanol (Hanson y Hanson, 1996). El metanol producido en esta reacción se oxida aún más, a formaldehído, por la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) (Murrell y Radajewski, 2000). Existen dos formas de MMO, la forma particulada (pMMO) y la forma soluble (sMMO). En función de su localización, la enzima MMO presenta diferentes características (Houbron y col., 1999). La pMMO ha sido reportada en todos los metanotrofos a excepción del género *Methylocella* (Jiang y col., 2010), es más sensible a la variación en los nutrientes como cobre, nitrógeno y la concentración de metano (Hanson y Hanson, 1996). La sMMO contiene un sitio único de di-hierro en su centro catalítico. Contiene tres componentes: una hidroxilasa con una estructura ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), una proteína regulatoria (proteína B) y una reductasa (proteína C) (Hanson y Hanson, 1996; Jiang y col., 2010). De acuerdo con Zhu y col. (2017) y Ettwing y col. (2010) las comunidades metanotróficas pueden oxidar el metano utilizando una vía única de desnitrificación que produce N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> a partir del óxido nítrico (NO), fabricando su propio oxígeno molecular. Por lo tanto, el oxígeno producido se usaría para oxidar metano aeróbicamente en un ambiente anóxico.

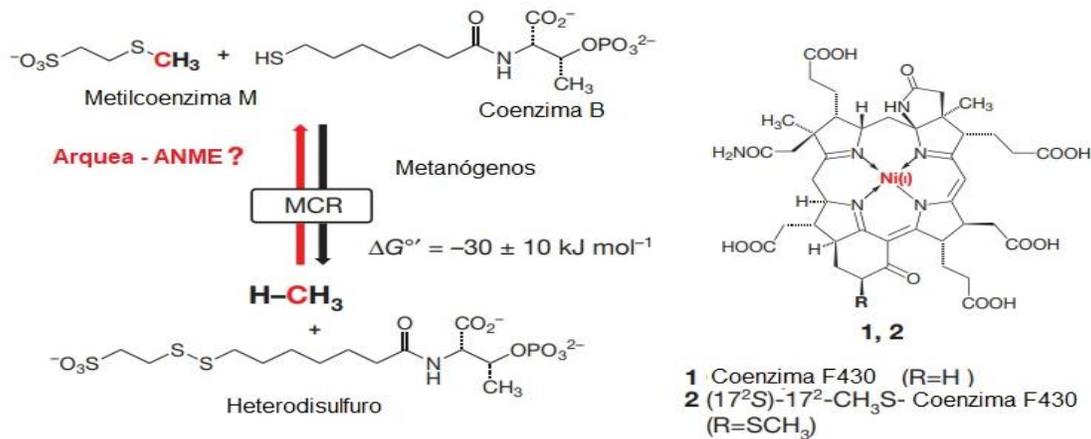
#### 1.4.2 Proceso anóxico desnitrificante

Por otra parte, la oxidación anóxica desnitrificante de metano es un proceso recientemente estudiado, donde los microorganismos utilizan nitrato como aceptor de electrones (Ettwig y col., 2008). En este proceso de oxidación anóxica de metano (OXANME), el nitrato actúa como aceptor de electrones y se reduce a N<sub>2</sub> (López y col., 2017). Asimismo, el CH<sub>4</sub> es convertido en CO<sub>2</sub> de acuerdo con la siguiente ecuación estequiométrica teórica, la cual es termodinámicamente favorable (Ettwig y col., 2008; Islas-Lima y col., 2002):



$$\Delta G^\circ = -960 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

Se ha reportado que los microorganismos que llevan a cabo el proceso OXANME pueden ser tanto arqueas como bacterias (Philippot, 2002). Diferentes estudios demuestran que las arqueas metanótrofas anaerobias conocidas como ANME son responsables de la actividad en el proceso de oxidación anaerobia de metano (Nauhaus y col., 2005). Se pueden distinguir tres grupos filogenéticamente diferentes: ANME-1 del orden *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*, ANME-2 y ANME-3 del orden *Methanosarcinales* asociados con las bacterias sulfato-reductoras (Glass y Orphan, 2012). Se ha propuesto que la oxidación anaerobia de metano se realiza mediante un proceso de metanogénesis inversa (Figura 5), basándose en la relación filogenética de las ANME con los metanógenos con los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* (Knittel y Boetius 2009; Scheller y col., 2010).



**Figura 5.** Metanogénesis inversa (adaptado de Scheller y col., 2010).

Para el caso de las bacterias, Raghoebarsing y col. (2006) indicaron que el proceso de oxidación anaerobia de metano se lleva a cabo con una proporción de células bacterianas a células arqueales de 8:1, mientras que Ettwing y col. (2009) sugieren que el proceso OXANME se lleva a cabo por bacterias pertenecientes a dos grupos distintos (a y b) pertenecientes al filo NC10, entre las que destacan *Aquifex pyrophilus*, *Methylacidiphilum* y *Methylomonas* (Raghoebarsing y col., 2006; Ettwing y col., 2009; Ettwing y col., 2010; He y col., 2015).

Sobre el proceso OXANME se han reportado interrogantes fundamentales que aún requieren investigación. Se ha sugerido que el CH<sub>4</sub> no es el donador de electrones que inicia el proceso desnitrificante sino el metanol, el primer metabolito de la oxidación aerobia del metano. Garantizando la ausencia de concentraciones de O<sub>2</sub> disuelto en fase líquida se evita la producción aerobia de metanol producido por microorganismos heterótrofos. De acuerdo con Warneke y col. (2011) y Jin y col. (2012) teniendo concentraciones de OD por debajo de 0.3 g por m<sup>-3</sup>, se garantiza

un ambiente anóxico adecuado para el proceso OXANME. Por otra parte, se ha reportado que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  influye de forma directa en la eficiencia del proceso de reducción del nitrato y en la posible acumulación de  $\text{N}_2\text{O}$ , un intermediario del proceso de desnitrificación:  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  (Peng y Zhu, 2006). El óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) pueden acumularse y emitirse durante la asimilación del nitrato (Knowles., 2005). El  $\text{N}_2\text{O}$  es un gas de efecto invernadero con un potencial de calentamiento global ~300 veces superior al del  $\text{CO}_2$ , es decir, 10 veces mayor potencial de calentamiento global que el  $\text{CH}_4$  y su concentración atmosférica se incrementa anualmente en un 0.3% (López y col., 2013; 2017). Sin embargo, se desconoce la concentración crítica de  $\text{NO}_3^-$  a partir de la cual se activa la emisión de  $\text{N}_2\text{O}$ . La investigación sobre estas interrogantes permitirá un mayor entendimiento del proceso OXANME que involucra la remoción de dos contaminantes el metano y nitrógeno (evitando la producción de  $\text{N}_2\text{O}$ ), en el contexto de tratamiento de aguas residuales. En donde las corrientes diluidas de  $\text{CH}_4$  (no utilizadas para la generación de energía) pueden ser aprovechadas como donador de electrones para este proceso.

## **2. HIPÓTESIS**

El CH<sub>4</sub> es el compuesto que dona inicialmente los electrones con el que se lleva a cabo el proceso OXANME.

Existe una concentración crítica de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a partir de la cual se favorece la formación de N<sub>2</sub>O.

El proceso OXANME puede llevarse a cabo exclusivamente con bacterias metanótrofas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Estudiar aspectos fundamentales del proceso OXANME como proceso novedoso en el que se remuevan CH<sub>4</sub> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de forma simultánea en el contexto del tratamiento de aguas residuales.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Confirmar cuál es el compuesto que inicialmente dona los electrones en el proceso de reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (metano o metanol) en el proceso OXANME.
2. Determinar si existe una concentración específica crítica de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a partir de la cual se estimula la acumulación de N<sub>2</sub>O en el proceso OXANME.
3. Caracterizar las comunidades microbianas involucradas en el proceso OXANME (bacterias y arqueas) bajo condiciones de estado estacionario.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Medio de sales minerales (MSM)

Para el cultivo y crecimiento de los microorganismos sin limitación de nutrientes se utilizó el MSM descrito por López y col. (2017), cuya composición se presenta en la Tabla 2. Para llevar a cabo el proceso anóxico se utilizó  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones, añadiendo diferentes concentraciones en el MSM: de 150 a 4000  $\text{g m}^{-3}$  de  $\text{NO}_3^-$  (correspondientes de 0.205 a 5.483  $\text{g NaNO}_3^- \text{ m}^{-3}$ ).

**Tabla 2.** Composición del medio de sales minerales.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración final (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.96
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.52
$\text{NaHCO}_3$	1.05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{CaCl}_2$	0.028
<b>Micronutrientes</b>	<b>Concentración final (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>
EDTA	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.162
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.020
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.03
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.003
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.003
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002

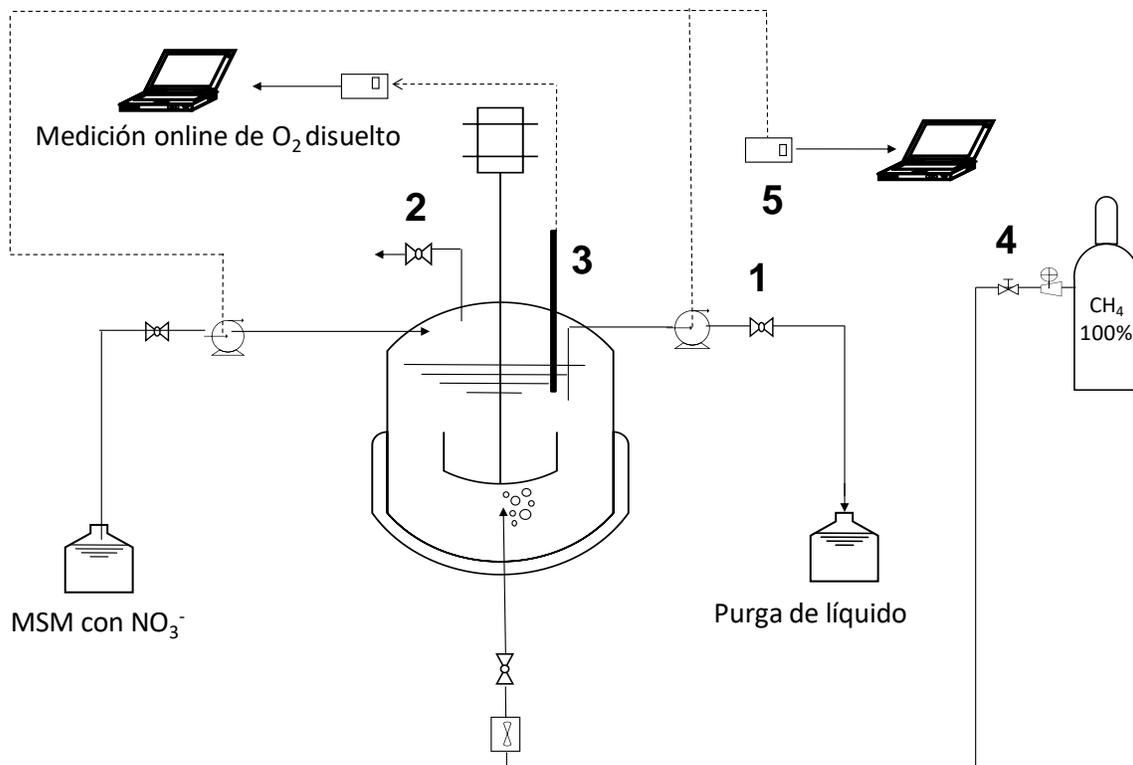
El trabajo de investigación se dividió en 5 etapas experimentales: Enriquecimiento de la comunidad microbiana OXANME, proceso OXANME en continuo, compuesto donador de electrones inicial para el proceso OXANME, efecto de la concentración de nitrato en la acumulación de óxido nitroso y la caracterización de las comunidades microbianas, las cuales se describen a continuación.

#### **4.2 Enriquecimiento de la comunidad microbiana OXANME**

Se utilizaron 30 mL de lodo aerobio secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales (Santa Rosa Jáuregui, Santiago de Querétaro). El lodo se introdujo a una botella de 1 L con 220 mL de MSM previamente desoxigenado y se incubó a 25°C y agitación de 300 rpm. Se hizo pasar un flujo de biogás a la botella (1 L/min durante 10 minutos) para lograr un espacio de cabeza con una composición aproximada de 60% de CH<sub>4</sub> y 40% de CO<sub>2</sub>. Se monitorizaron de forma periódica las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en fase gaseosa, así como la concentración NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la fase líquida.

#### **4.3 Proceso OXANME en continuo**

Una vez enriquecida la comunidad microbiana, se llevó a cabo el proceso OXANME en modo continuo en un reactor de tanque agitado (diámetro interno: 12.7 cm, altura 15 cm). El reactor tuvo un volumen de trabajo de 1 L y estuvo provisto de medición en línea de O<sub>2</sub> disuelto, control de temperatura a 25°C y agitación magnética de 350 rpm (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema general del montaje experimental del cultivo OXANME: (1) puerto de muestreo de líquido; (2) puerto de muestreo de gas; (3) sensor óptico de  $O_2$ ; (4) válvula de ajuga calibrada; (5) control automatizado de intercambio de MSM.

El cultivo OXANME previamente preparado en la botella hermética (sección 4.1) se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en 900 mL de MSM desoxigenado, el cual fue utilizado como inóculo para el reactor de tanque agitado. La monitorización de  $O_2$  disuelto se llevó a cabo mediante un sensor digital Vernier® conectado a una tarjeta de adquisición de datos. El reactor se operó en continuo con respecto a la fase gaseosa durante todas las etapas experimentales. Se utilizó un flujo de metano (99.9%, PRAXAIR, México) de 20 mL/min, correspondiente con un tiempo de retención del biogás de 50 min (considerando el volumen de trabajo del reactor). La carga de metano que ingresó al reactor, fue en función del flujo de

metano considerando una concentración de entrada de  $702.5 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3}$ . Durante las cinco etapas experimentales se tuvo una pequeña variación en el flujo de metano, debido a la calibración de la válvula de ajuga teniendo cargas promedio de metano de  $774.3$  a  $838.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ .

La operación del líquido fue en semi-continuo, utilizando una bomba peristáltica para la dosificación de MSM suplementado con  $\text{NO}_3^-$  a pH de  $7.0 \pm 0.1$ , así como una bomba de purga de líquido, realizando un intercambio del líquido automatizado (7 horas al día). El flujo de entrada de MSM y de purga de líquido fue el mismo ( $20 \text{ mL/min}$ ) para mantener constante el volumen del reactor.

#### **4.4 Compuesto donador de electrones inicial para el proceso OXANME**

Durante la implementación del proceso OXANME en continuo, se aseguró la hermeticidad del sistema para evitar la presencia de trazas de  $\text{O}_2$  disuelto y evitar la oxidación del  $\text{CH}_4$  por vía aerobia. Para este fin, se llevó a cabo la desoxigenación de cualquier líquido que se introdujo al reactor en todas las etapas experimentales mediante burbujeo con  $\text{N}_2$ . Las condiciones anóxicas (concentraciones de  $\text{O}_2$  disuelto por debajo de  $0.3 \text{ g m}^{-3}$ ) se confirmaron con un sensor óptico de  $\text{O}_2$  disuelto de última generación con precisión de 3 cifras significativas (Vernier®, Oregon, Estados Unidos).

#### **4.5 Efecto de la concentración de nitrato en la acumulación de óxido nitroso**

Una vez que el proceso OXANME se llevó a cabo de forma estable en el biorreactor, se estudiaron diversas cargas de  $\text{N-NO}_3^-$  para identificar una posible concentración específica de nitrato en el reactor a partir de la cual se estimula la formación de  $\text{N}_2\text{O}$ . Por lo tanto, se realizó el seguimiento de la concentración de biomasa con el fin de determinar una posible concentración específica crítica de  $\text{N-NO}_3^-$ .

#### **4.6 Caracterización de las comunidades microbianas**

Con el fin de determinar el papel de las bacterias y arqueas en el proceso OXANME, se llevó a cabo la caracterización de las poblaciones microbianas por medio de secuenciación masiva del gen ADNr 16S utilizando Illumina miSeq. Se tomaron 15 ml de muestra, se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Las poblaciones de arqueas y bacterias se caracterizaron en el inóculo, al finalizar el enriquecimiento de comunidades metanotróficas en la botella hermética (sin recambio de líquido), así como en el reactor durante la remoción estable de metano. Para identificar el efecto de las arqueas en el proceso OXANME, el día 45 de operación se tomó una muestra para caracterizar las poblaciones microbianas, e inmediatamente después se añadió un inhibidor específico para arqueas (2.36 mM de bromoetanosulfonato, BES). Al día siguiente se tomó una muestra líquida del reactor para caracterizar de nuevo las poblaciones microbianas. Se utilizó esta estrategia para relacionar posibles cambios en la remoción de metano con la inhibición de las arqueas en el reactor.

#### 4.7 Parámetros de operación y desempeño del proceso OXANME

Los parámetros de operación estudiados en el reactor de tanque agitado fueron los siguientes:

Tiempo de retención del gas (TRG)

$$TRG = \frac{V_L}{F} \quad (2)$$

Tiempo de residencia hidráulica (TRH)

$$TRH = \frac{V_L}{Q} \quad (3)$$

Carga de metano ( $L_{CH_4}$ )

$$L = C_e \times \frac{Q}{V_L} \quad (4)$$

Carga de  $N-NO_3^-$  ( $L_{N-NO_3^-}$ )

$$L_{N-NO_3^-} = [N - NO_3^-] \times \frac{1}{TRH} \quad (5)$$

Los parámetros de desempeño del sistema OXANME fueron los siguientes:

Capacidad de eliminación de  $CH_4$  (CE)

$$CE = (C_e - C_s) \times \frac{Q}{V_L} \quad (6)$$

Eficacia de remoción del  $CH_4$  en fase gaseosa (ER)

$$ER = \frac{C_e - C_s}{C_e} \times 100 \quad (7)$$

Tasa de consumo de  $N-NO_3^-$  ( $R_{N-NO_3^-}$ )

$$(R_{N-NO_3^-}) = (C_{e\ N-NO_3^-} - C_{s\ N-NO_3^-}) \times \frac{1}{TRH} \quad (8)$$

Por otra parte, con el fin de llevar a cabo un balance de nitrógeno en el sistema, se determinaron tanto el flujo de nitrógeno dirigido a desnitrificación ( $R_d$ ) como el flujo dirigido a la producción de biomasa ( $R_x$ ), de acuerdo a las ecuaciones 10 y 11:

$$R_d = [CO_2] \times \frac{1}{TRH} \times \frac{*0.36 \text{ g } CH_4}{\text{g } CO_2} \times \frac{*6.2 \text{ g } NO_3^-}{\text{g } CH_4} \times \frac{*0.226 \text{ g } N}{\text{g } NO_3^-} \quad (10)$$

\*valores: 0.36,6.2 y 0.226 obtenidos de la relación estequiometrica de la ecuación (1).

$$R_x = \frac{\text{g biomasa}}{\text{m}^3} \times \frac{1}{TRH} \times \frac{1 \text{ g biomasa}}{0.5 \text{ g proteina}} \times \frac{0.14 \text{ g } N}{\text{g biomasa}} \quad (11)$$

El flujo dirigido a desnitrificación ( $R_d$ ,  $\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , Ecuación 10) se determinó con los datos de producción de  $\text{CO}_2$ , ya que por medio de la estequiometria del proceso (Ecuación 1) se conoce cuantos moles de  $\text{N-NO}_3^-$  se requieren para producir un mol de  $\text{CO}_2$ . Para el flujo másico dirigido a la biomasa ( $R_x$ ,  $\text{gN-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) se determinó con base en la concentración de proteína (Ecuación 11). Se consideró que el 50% de la biomasa bacteriana estuvo constituida por proteína, mientras que el 14% de la biomasa estuvo compuesta por nitrógeno, respectivamente (Quintero Ramírez, 1993; Bailey y col., 1986).

Mientras que el  $\text{N-NO}_3^-$  recuperado indica el porcentaje de nitrógeno consumido que fue aplicado por la producción de biomasa y la desnitrificación:

$$\text{N-NO}_3^- \text{ Recuperado (\%)} = \left( \frac{R_d + R_x}{R_{\text{N-NO}_3^-}} \right) * 100 \quad (12)$$

La Tabla 3 muestra las diferentes etapas experimentales estudiadas en el reactor de tanque agitado. Las concentraciones estudiadas de nitrato en el MSM fueron de 1000, 2000, 3000 y 4000 g m<sup>-3</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (correspondientes con 226, 452, 678 y 904 gN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> m<sup>-3</sup>). La fracción líquida de digestato generado en la digestión de lodos de purga puede contener hasta 2200 g N-NH<sub>4</sub> m<sup>-3</sup> (McCarty, 1964), por lo que constituye una corriente rica en nitrógeno que se puede utilizar en el proceso OXANME si el N-NH<sub>4</sub> se oxida a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La dosificación del nitrato al reactor fue una función de la concentración de nitrato en el MSM de alimentación, así como del tiempo de operación de las bombas de alimentación y purga de líquido. En la fase experimental I el recambio de líquido tuvo una duración 9 h, mientras que en las fases II-V el recambio de líquido tuvo una duración de 7 h.

**Tabla 3.** Fases experimentales estudiadas en el reactor de tanque agitado.

Fase experimental	Días de operación	Carga de metano (g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	Concentración de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> en el MSM de alimentación (g m <sup>-3</sup> )	Carga de N-NO <sub>3</sub> al sistema OXANME (g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	TRG (min)	TRH (h)
I	0-3	819	226	2.20	50	102.4
II	4-14	838.2	904	6.86	50	131.7
III	15-30	775.6	678	5.14	50	131.7
IV	31-40	778.4	452	3.43	50	131.7
V	41-50	774.3	226	1.71	50	131.7

## **4.8 Procedimientos analíticos**

### *4.8.1 Análisis en la fase gaseosa*

Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se determinaron por cromatografía de gases empleando el equipo SRI-8610C (SRI Instruments, Torrance, CA, USA). El cromatógrafo estuvo equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas (ambas de 6 pies x 1/8 pulgada, una de sílica gel y la otra de tamiz molecular 13x), usando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 20 mL min<sup>-1</sup>, las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron en 90°C y 150°C, respectivamente. La temperatura del horno inicial fue de 40°C, la cual se mantuvo por 4 min y se incrementó a 110°C.

La concentración de N<sub>2</sub>O se realizó por medio de cromatografía de gases empleando el equipo SRI-8610C (SRI Instruments, Torrance, CA, USA). El cromatógrafo estuvo equipado con un detector fotométrico de llama, usando helio como gas acarreador (flujo de 70 mL/min). Las temperaturas del horno, inyector y detector se mantuvieron en 200°C, 60°C y 150°C, respectivamente.

### *4.8.2 Análisis en la fase líquida*

La concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se determinó con el kit HACH 8039 HR, con un rango de 0 a 30 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. Para llevar a cabo la medición, las muestras líquidas se centrifugaron (3700 rpm durante 5 minutos) y filtraron (0.45 µm). La concentración de biomasa se determinó por medio de mediciones de proteína utilizando el método de Lowry modificado (Lowry y col., 1951) utilizando 1ml de muestra, teniendo una

digestión previa con NaOH (concentración 0.2 M) en baño María a 100°C por 20 minutos. Los resultados se calcularon con los datos obtenidos de la curva de calibración realizada para proteínas teniendo un coeficiente de correlación de 97.8%.

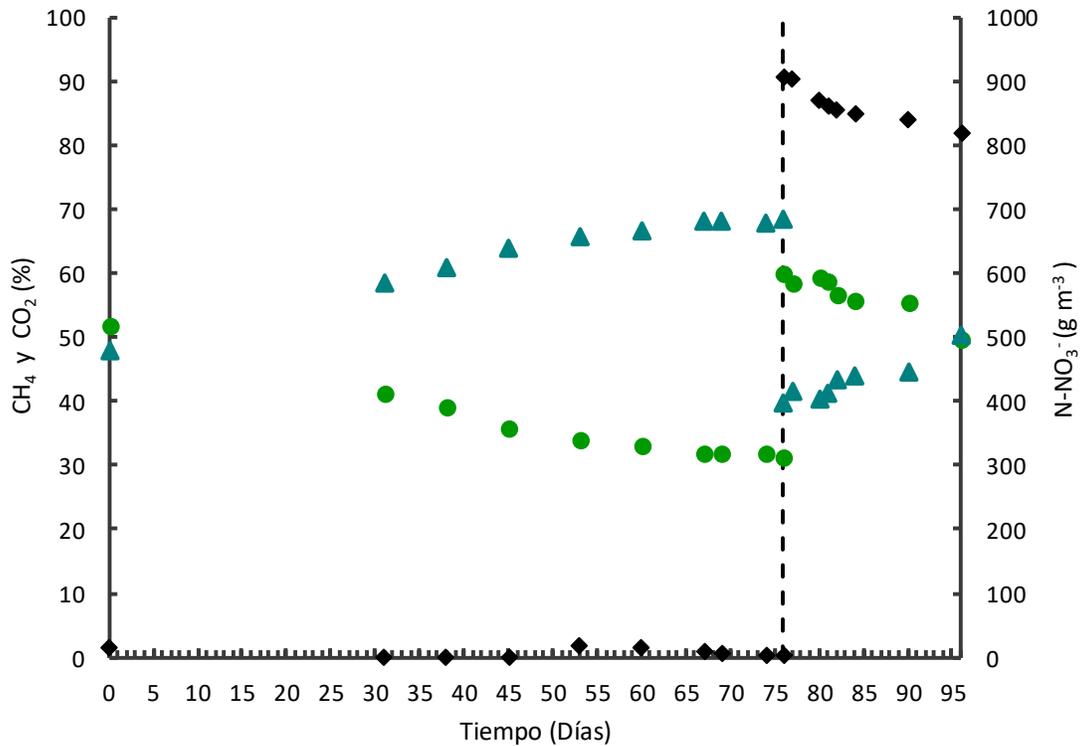
#### 4.8.3 Caracterización de las comunidades microbianas

Se realizó la caracterización de las comunidades microbianas en diferentes etapas de operación del reactor de tanque agitado. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit PowerSoil® (MOBIO, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN fue cuantificada por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos). Las muestras de ADN fueron enviadas al Research and Testing Laboratory (RTL, Lubbock, USA) para el análisis de secuenciación masiva Illumina MiSeq de células bacterianas (16S rRNA, primers: 28F 5' - GAGTTTGATCNTGGCTCAG-3', 388R 5' - TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') y arqueales (16S rRNA, primers: Arch340wF 5-CCCTAYGGGGYGCASCAG-3; Arch806R 5-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3). Las secuencias fueron analizadas utilizando el software QIIME y la selección de unidades taxonómicas operativas se llevó a cabo utilizando el algoritmo UPERASE. El análisis de búsqueda de quimeras se realizó con el software UCHIME, ejecutado con el modo de *novo*. La clasificación taxonómica de cada unidad taxonómica operativa se realizó con una secuencia de consenso basada en el RDP classifier y comparada con secuencias de la NCBI database (Barragán-Trinidad y col., 2017).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Enriquecimiento de la biomasa

La aclimatación y enriquecimiento del cultivo OXANME se llevó a cabo durante 96 días a partir de un lodo activado (lodo aerobio secundario de recirculación). El enriquecimiento también tuvo como objetivo eliminar la materia orgánica contenida en el lodo, para poder llevar a cabo el proceso OXANME únicamente con CH<sub>4</sub> como donador de electrones en la siguiente etapa experimental (sistema continuo en tanque agitado). La Figura 7 presenta las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa en la botella de enriquecimiento. Se observa el consumo progresivo de CH<sub>4</sub>, desde una concentración inicial en fase gaseosa de 52% hasta 30% en el día 76, cuando se renovó el espacio de cabeza de la botella con concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> de 60 y 40%, respectivamente. El N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> suplementado inicialmente (~20 g m<sup>-3</sup>) se fue consumiendo, hasta alcanzar una concentración de 3 ± 2 g m<sup>-3</sup> el día 74. Junto con la renovación del espacio de cabeza el día 76, también se añadió N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en una concentración de 900 g m<sup>-3</sup>. A partir del día 82 se observó el consumo tanto de CH<sub>4</sub> como de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (concentraciones de 49% y 820 g m<sup>-3</sup> en el día 96, respectivamente), así como la producción de CO<sub>2</sub>, confirmando que el proceso OXANME se llevó a cabo.



**Figura 7.** Concentraciones de metano y CO<sub>2</sub> (en fase gaseosa), así como de nitrato durante el enriquecimiento del cultivo OXANME, donde: concentración de CH<sub>4</sub> (círculos), concentración de CO<sub>2</sub> (triángulos) y concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (rombos). La línea punteada representa la renovación del espacio de cabeza y la adición de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a la botella.

La mayoría de los trabajos reportados en la literatura utilizaron como inóculo lodos anóxicos y el tiempo de enriquecimiento fue de entre 45 y 480 días. López y col. (2017) utilizaron como inóculo una mezcla con volúmenes iguales de lodos secundarios y lodos anóxicos con un tiempo de enriquecimiento de 45 días, utilizando botellas de vidrio de 1.25 L con suministro de nitrato y metano. Hatamoto y col. (2014) utilizaron una muestra de suelo de plantaciones de arroz con un tiempo de enriquecimiento de 114 días, en botellas de vidrio con adición periódica de metano y nitrato. Ettwing y col. (2008) utilizaron una muestra de sedimentos

anóxicos con un tiempo de enriquecimiento de 450 días y un reactor de tanque agitado con un volumen de 13 L, el cual fue suministrado con  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Mientras, Raghoebarsing y col. (2006) utilizaron un sedimento anóxico del Twentekanaal (Holanda) con un tiempo de enriquecimiento de 480 días.

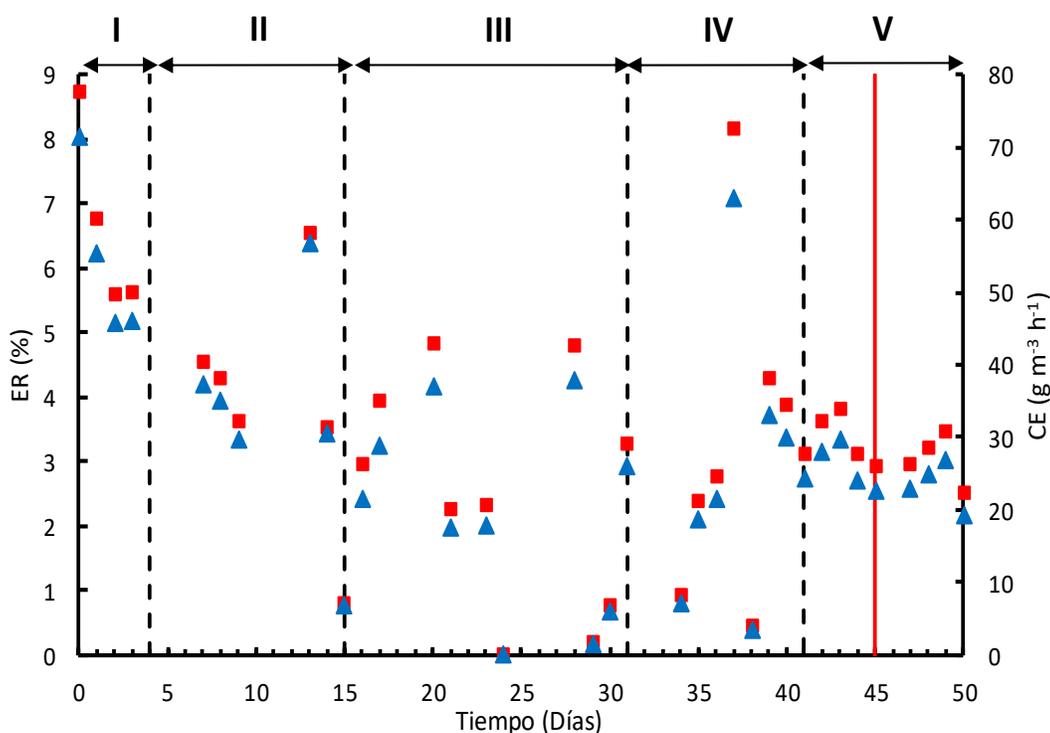
En el presente trabajo se consiguió enriquecer, a partir de un lodo aerobio secundario, una comunidad microbiana que llevó a cabo el proceso OXANME con un tiempo de enriquecimiento de 96 días y adición periódica de nitrato y metano. Estos resultados indican que se pueden enriquecer comunidades microbianas capaces de llevar a cabo el proceso OXANME a partir de lodo secundario, lo cual facilita la implementación del proceso OXANME en aplicaciones prácticas. La presencia tanto de arqueas como de bacterias metanotróficas desnitrificantes al final del enriquecimiento se confirmó por secuenciación masiva del ADNr 16S (Sección 5.3).

## **5.2 Proceso OXANME en reactor de tanque agitado**

### *5.2.1 Remoción de metano*

Una vez obtenido el inóculo OXANME, el proceso se llevó a cabo en un reactor de tanque agitado operado en continuo para el suministro del flujo  $\text{CH}_4$ , mientras que la fase líquida fue operada en modo semi-continuo, teniendo una duración al día de 9 h para la fase experimental I y 7 h para las fases II-V. La capacidad de eliminación y eficiencia de remoción fueron los parámetros utilizados para evaluar el desempeño de remoción de metano. La Figura 8 presenta los valores de CE y ER determinados

durante las cinco fases experimentales estudiadas. De forma global, el reactor alcanzó valores promedio de CE y ER de  $32.1 \pm 11.7 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y  $4.1 \pm 1.5\%$ , respectivamente. La Tabla 4 presenta un resumen de los valores de CE, ER y producción de  $\text{CO}_2$  obtenidos en cada una de las etapas experimentales estudiadas. Como se observa en la Figura 8, en la etapa experimental I se alcanzó el valor máximo de CE promedio de  $54.7 \pm 12.1 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (correspondiente con una ER de  $6.7 \pm 1.5\%$ ). Durante esta fase experimental, se observó que hubo una remoción rápida de metano inicialmente, probablemente debido al efecto de la absorción de metano en la fase líquida, más que por la oxidación biológica.



**Figura 8.** Eficacia y capacidad de eliminación durante el cultivo OXANME, donde: eficacia de remoción (ER, cuadrados), capacidad de eliminación (CE, triángulos). Las líneas punteadas representan los cambios de concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  en la entrada al sistema. La línea roja representa adición de inhibidor de arqueas (BES).

**Tabla 4.** Desempeño del reactor de tanque agitado en la remoción de metano en las diferentes fases experimentales estudiadas.

<b>Etapas experimental</b>	<b>CE (g CH<sub>4</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>ER (%)</b>	<b>CO<sub>2</sub> Producido (g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>)</b>	<b>CO<sub>2</sub> producido/ CH<sub>4</sub> consumido (g CO<sub>2</sub>/ gCH<sub>4</sub>)</b>
I	54.7 ± 12.1	6.7 ± 1.5	1.1 ± 0.1	0.020 ± 0.008
II	37.9 ± 11.1	4.5 ± 1.2	0.9 ± 0.1	0.023 ± 0.008
III	17.5 ± 13.9	2.3 ± 1.8	0.8 ± 0.2	0.046 ± 0.015
IV	25.4 ± 18.4	3.3 ± 2.4	0.8 ± 0.2	0.032 ± 0.008
V	24.8 ± 3.1	3.2 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.019 ± 0.017

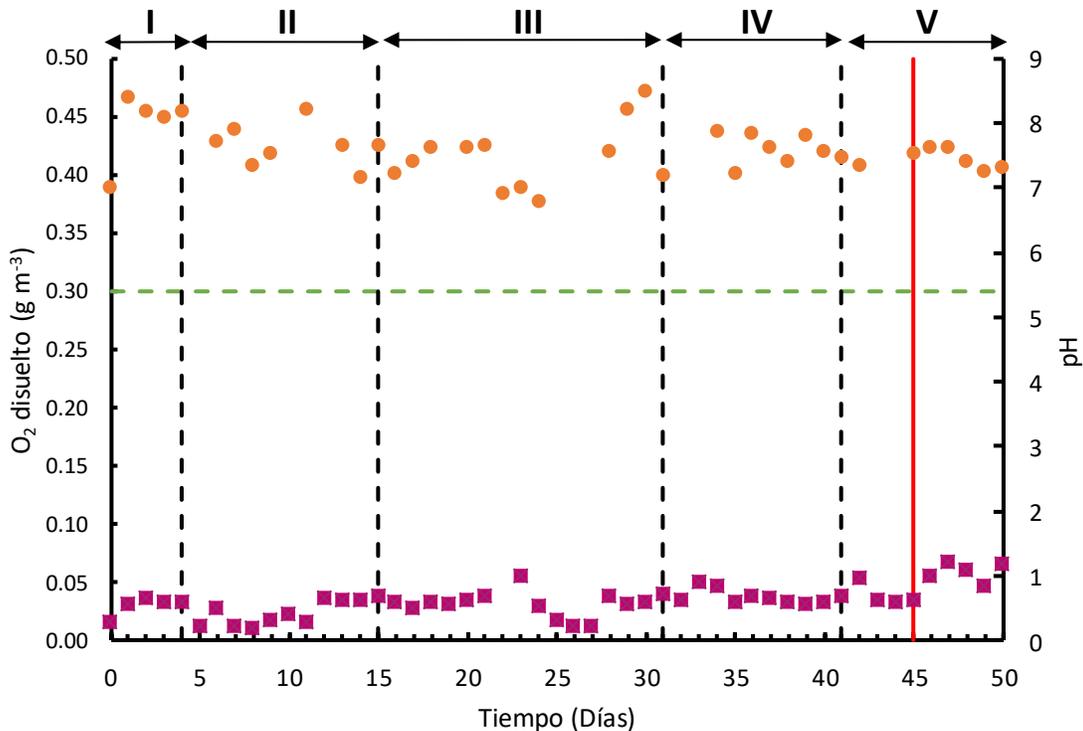
En las etapas experimentales II, III, IV se determinó una CE promedio de  $26.9 \pm 14.5 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y una ER promedio de  $3.4 \pm 1.8 \%$ . En la etapa experimental V se observaron valores de CE y ER de  $24.8 \pm 3.1 \text{ g de CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y  $3.24 \pm 0.4 \%$ , respectivamente. Es importante mencionar que en esta etapa experimental (día 45) se añadió ácido 2-bromoetanosulfónico (BES), que es un inhibidor específico para arqueas. Después de la adición del BES no se observó un cambio significativo en los valores de CE y RE en la etapa. La remoción de metano tampoco fue menor que en las etapas experimentales anteriores. Por lo tanto, estos resultados indicaron que el proceso de remoción de metano bajo condiciones desnitrificantes se llevó a cabo por la actividad de las bacterias. Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con Raghoebarsing y col. (2006), quienes reportaron que el proceso de oxidación de metano puede llevarse a cabo principalmente por bacterias.

Los resultados obtenidos en este trabajo son competitivos con los reportados en la literatura con respecto a la remoción de metano obtenida. Es importante destacar que en la mayoría de los trabajos se cuenta con un soporte para la retención de biomasa en el sistema. Los resultados indicaron que, a pesar de no contar con un

soporte dentro del sistema y utilizando TRH de 102.4 h para la etapa experimental I y 131.7 h para las etapas siguientes, la biomasa se adaptó a las condiciones de operación teniendo una CE promedio de  $32.1 \pm 11.7$  g de  $\text{CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  a un TRG de 50 min. Por ejemplo, López y col. (2017) utilizaron un biofiltro percolador con un volumen de trabajo de 1 L, y lograron una CE de  $27.7$  g  $\text{CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con un TRG de 60 min. Mientras que Hatamoto y col. (2014) utilizaron un reactor de tanque agitado con un volumen de 0.27 L, teniendo una CE de  $33.6$  g  $\text{CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  a un TRG de 250 min. Los valores de CE son similares a los obtenidos en el presente estudio utilizando un TRG menor, por lo que el sistema desarrollado en la presente tesis es más compacto. Las variaciones en la remoción de metano fueron de 0 a  $71.5$  g  $\text{CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . De acuerdo con López y col. (2017), los valores de CE fueron de 0 a  $27.7$  g  $\text{CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  teniendo una alta variación en sus valores de CE respecto al tiempo. En la Tabla 5 se muestra el ratio de  $\text{CO}_2$  producido por g de  $\text{CH}_4$  consumido ( $\text{gCO}_2/\text{gCH}_4$ ) determinado experimentalmente. Se observó que en todas las fases experimentales el ratio  $\text{gCO}_2/\text{gCH}_4$  fue menor que el valor estequiométrico teórico (Ecuación 1), el cual es de  $2.75$   $\text{gCO}_2/\text{gCH}_4$ . Estos resultados indicaron que del  $\text{CH}_4$  absorbido, entre el 0.7 y 1.69% fue oxidado a  $\text{CO}_2$  por acción microbiana.

### 5.2.2 Aceptor de electrones del proceso OXANME

La Figura 9 muestra los valores de  $O_2$  disuelto y pH medidos en las diferentes fases experimentales. El valor promedio de pH registrado durante todas las etapas experimentales fue de  $7.6 \pm 0.4$ . El valor de pH promedio fue cercano al óptimo para la oxidación anóxica de metano que está entre 7 y 8 (Knowles, 1982; Raghoebarsing y col., 2006; Haroon y col., 2013). Por otra parte, la concentración de  $O_2$  disuelto fue  $< 0.07 \text{ g m}^{-3}$  en todas las etapas experimentales estudiadas. Estos valores de  $O_2$  disuelto fueron cercanos al límite de detección del sensor. De acuerdo con Warneke y col. (2011) y Jin y col. (2012), concentraciones de OD menores a  $0.3 \text{ g m}^{-3}$  indican un ambiente anóxico adecuado para el proceso OXANME. El valor promedio de  $0.035 \text{ g } O_2 \text{ m}^{-3}$  medido en todas las etapas experimentales indicó claramente que el  $CH_4$  fue el donador de electrones del proceso, evitando su oxidación por vía aerobia, descartando al metanol como posible donador de electrones. Este es un resultado muy importante, ya que reportes anteriores han sugerido que trazas de  $O_2$  disuelto pueden ser responsables de iniciar la oxidación de metano a metanol, mientras que etapas de oxidación posteriores del metanol son llevadas a cabo con nitrato como aceptor de electrones (Warneke y col., 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el metano fue el donador de electrones en el proceso OXANME ya que se descartó la formación de metanol utilizando  $O_2$  como aceptor inicial de electrones.



**Figura 9.** Concentración de O<sub>2</sub> disuelto (cuadrados) y pH (círculos) en el reactor. Línea verde punteada representa el límite reportado en la literatura para llevar a cabo el proceso bajo condiciones anóxicas. Las líneas punteadas representan los cambios de concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la entrada al sistema. Línea roja representa adición de inhibidor (BES).

### 5.2.3 Consumo de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y balance de nitrógeno

La Tabla 5 presenta la carga de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aplicada al reactor en las diferentes fases experimentales, las cuales resultaron en concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de entre 4 y 530 g m<sup>-3</sup> en el reactor, como se observa en la Figura 10. En la primera fase experimental, la carga de nitrato fue de 2.2 g de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, resultando en una concentración promedio de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 6.4 ± 1.1 g m<sup>-3</sup>. En etapas subsecuentes se modificó la carga de nitrato con el fin de identificar una posible concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que promoviera la producción de N<sub>2</sub>O, un gas de efecto invernadero

indeseable en el proceso OXANME. En la fase experimental II se observó una concentración promedio de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $401 \text{ g m}^{-3}$ , pero alcanzando concentraciones de hasta  $528 \text{ g m}^{-3}$ , concentraciones altas y no recomendables para el proceso OXANME ya que se ha reportado inhibición del proceso a concentraciones de  $\text{N-NO}_3^- \geq 500 \text{ g m}^{-3}$  (Glass y Silverstein, 1998). La caída drástica en la concentración de proteína entre los días 8 y 14 sugirió efectivamente una inhibición de la comunidad microbiana a concentraciones de  $\text{N-NO}_3^-$  superiores a  $500 \text{ g m}^{-3}$ . En la fase experimental III se redujo la carga de nitrato a  $5.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , resultando en una concentración promedio de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $373 \text{ g m}^{-3}$  (concentración máxima de  $389 \text{ g m}^{-3}$ ). Bajo estas condiciones la concentración de proteína se incrementó (concentración promedio de  $331 \text{ g m}^{-3}$ ). En la etapa experimental III (a partir del día 21) se midió la concentración de  $\text{N-N}_2\text{O}$  en fase gaseosa a la salida del reactor y se observó que no hubo producción de este gas de efecto invernadero bajo las condiciones experimentales utilizadas. En la fase experimental IV la carga de nitrato fue de  $3.4 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , resultando una concentración promedio de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $200 \pm 9.7 \text{ g m}^{-3}$  (concentración máxima de  $214 \text{ g m}^{-3}$ ). En esta etapa se observó la concentración más alta de proteína (concentración promedio de  $590 \text{ g m}^{-3}$ ) y no se detectó  $\text{N}_2\text{O}$  en la fase gaseosa a la salida del reactor. Para la última fase experimental se redujo la carga de nitrato a  $1.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , resultando en una concentración promedio de  $\text{N-NO}_3^-$  de  $100 \pm 54 \text{ g m}^{-3}$  en el reactor. Bajo estas condiciones, tampoco se detectó  $\text{N}_2\text{O}$  a la salida del reactor.

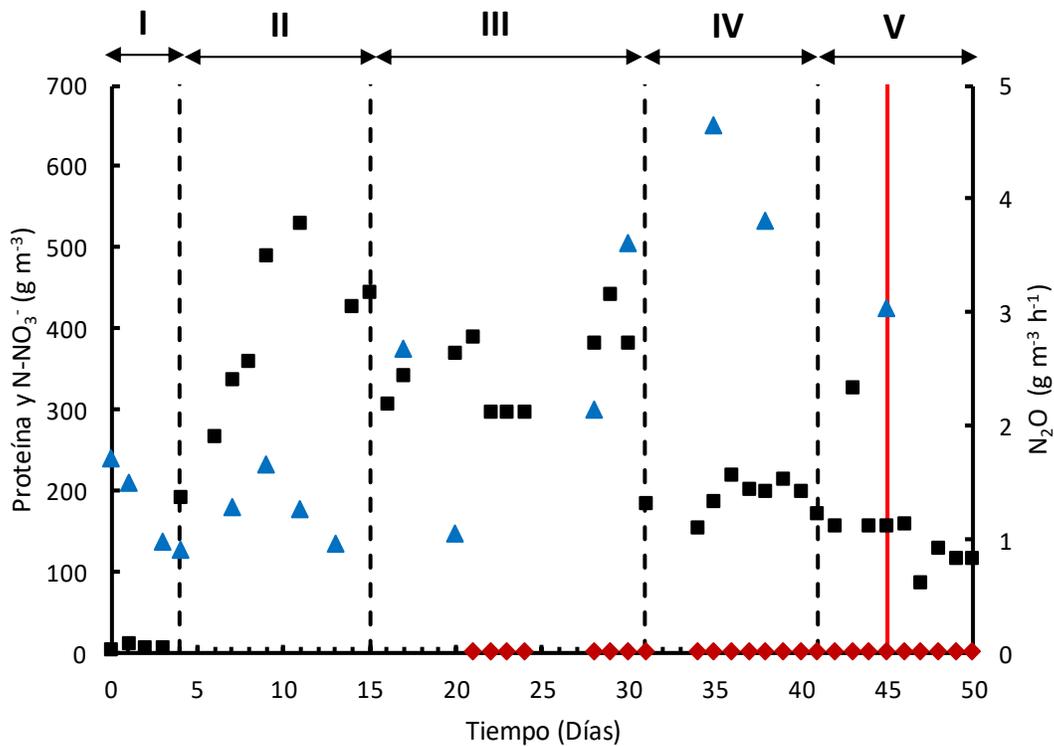
En relación con la producción de  $N_2O$  en el sistema, bajo las condiciones utilizadas en las etapas experimentales III, IV y V (con concentraciones promedio de  $N-NO_3^-$  de 373, 200 y 100  $g\ m^{-3}$ , respectivamente) no se detectó emisión de este gas de efecto invernadero (Figura 10). De acuerdo con López y col. (2017) la tasa de producción de  $N_2O$  se observó teniendo concentraciones de  $N-NO_3^-$  por debajo de  $\sim 55\ g\ m^{-3}$ , obteniéndose una tasa de producción máxima de  $N_2O$  ( $\sim 0.45\ g\ m^{-3}\ h^{-1}$ ) a una concentración de  $NO_3^-$  de  $\sim 225\ g\ m^{-3}$ . En dicho trabajo se utilizaron tasas de dilución de 0.0013 a  $0.0066\ h^{-1}$ , con una comunidad microbiana tanto de arqueas como bacterias. Por el contrario, en el presente trabajo solo se logró enriquecer una comunidad bacteriana (ver Sección 5.3.2). De acuerdo con Ettwig y col. (2010) y Gustavsson y la Cour Jansen (2011) la producción de  $N_2O$  se lleva a cabo por microorganismos desnitrificadores convencionales, diferentes a la comunidad que lleva a cabo el proceso de remoción anóxica de metano bajo condiciones desnitrificantes. Debe resaltarse que el  $N_2O$  es un gas de efecto invernadero con un potencial de calentamiento global  $\sim 300$  veces superior al  $CO_2$ , es decir,  $\sim 10$  veces mayor potencial de calentamiento global que el  $CH_4$  (López y col., 2013). Una de las fuentes principales de emisión del  $N_2O$  es el tratamiento de aguas residuales, siendo un intermediario en el proceso de desnitrificación heterotrófica (Guo y col., 2018). Estos procesos son potencialmente aplicables para remover el nitrógeno presente en las aguas residuales y en la fracción líquida del digestato (sin la producción de  $N_2O$ ), y simultáneamente lograr la remoción de metano producido en las plantas de tratamiento, evitando la quema o emisión directa a la atmósfera de este GEI que no es aprovechado para la generación de energía eléctrica o térmica. Esto evita el uso de especies químicas como donadores de electrones tradicionales

en la remoción de nitrógeno (ej. acetato o glicerol), teniendo un impacto en los costos y en la sustentabilidad del tratamiento de las aguas residuales.

**Tabla 5.** Flujos de nitrógeno en el reactor y balance de masa.

Fase experimental	$L_{N-NO_3^-}$ ( $gN-NO_3^- m^{-3} h^{-1}$ )	$R_{N-NO_3^-}$ ( $gN-NO_3^- m^{-3} h^{-1}$ )	$R_d$ ( $gN-NO_3^- m^{-3} h^{-1}$ )	$R_x$ ( $gN-NO_3^- m^{-3} h^{-1}$ )	$N-NO_3^-$ Recuperado (%) <sup>*</sup>
I	2.2	2.1	0.6	0.5	48 ± 18.4
II	6.9	3.8	0.4	0.4	21 ± 19.7
III	5.1	2.3	0.4	0.7	48 ± 27.4
IV	3.4	1.9	0.4	1.3	87 ± 12.6
V	1.7	0.9	0.2	0.9	120 ± 21.8

\*Calculado de acuerdo a la ecuación (12).



**Figura 10.** Concentración de  $N-NO_3^-$  (cuadrados), concentración de proteína (triángulos) y tasa de producción de  $N_2O$  (rombos) dentro del sistema OXANME. Líneas punteadas representan los cambios de concentración de  $N-NO_3^-$  en la entrada al sistema. Línea roja representa adición de inhibidor (BES).

Una vez conocida la tasa de consumo de  $\text{N-NO}_3^-$  y los flujos estimados de N dirigidos a producción de biomasa y a desnitrificación se realizó un balance de nitrógeno. El  $\text{N-NO}_3^-$  recuperado indica el porcentaje de N consumido que fue explicado por producción de biomasa y desnitrificación. La Tabla 5 muestra los porcentajes de  $\text{N-NO}_3^-$  recuperados que van de  $21 \pm 19.7$  al  $120 \pm 21.8\%$ . Esta variación se debe a que los datos de remoción de metano fueron altamente variables durante toda la operación del reactor. El metano es un gas hidrofóbico con muy baja solubilidad en el agua. Por lo tanto, estos sistemas están limitados por el transporte de  $\text{CH}_4$ , obteniendo altas variaciones en la remoción de metano. Para la fase experimental V se obtuvo un valor de  $120 \pm 21.8 \%$  de  $\text{N-NO}_3^-$  recuperado debido a la baja producción de  $\text{CO}_2$  así como al remanente de nitrato suplementado en la fase experimental anterior, aunado a que en esta etapa se añadió el inhibidor específico para arqueas y este pudo tener un efecto negativo en la comunidad microbiana limitando en consumo de este contaminante.

El balance de masa indicó que en las fases experimentales III IV y V el flujo de  $\text{N-NO}_3^-$  dirigido a la desnitrificación fue menor en comparación con el flujo dirigido a la biomasa, debido a la tasa de dilución utilizada ( $0.0076 \text{ h}^{-1}$ ), favoreciéndose el enriquecimiento de bacterias con alta tasa de crecimiento específico. Es importante mencionar que la concentración de proteína también presentó una alta variación durante las cinco etapas experimentales (Figura 10), con un valor promedio de  $340 \pm 172 \text{ g m}^{-3}$  (concentraciones máxima y mínima de 650 y  $127 \text{ g m}^{-3}$ , respectivamente). Durante la operación del sistema se observó que la biomasa se acumuló dentro de las mangueras de purga y alimentación. También se observó

adhesión de biomasa en las paredes del reactor, como se muestra en la Figura 11. Por lo tanto, las variaciones observadas en la concentración de biomasa fueron atribuidas a este fenómeno, con el consecuente efecto sobre el balance de masa. Debido a que el metano es un gas poco soluble en agua, la adhesión de biomasa en la zona del espacio de cabeza del reactor se observó en todas las etapas experimentales, ya que en esa zona existe presencia de metano y puede ser captado por los microorganismos.



**Figura 11.** Adhesión y acumulación de la biomasa en el reactor durante el proceso OXANME. Las flechas indican los puntos de acumulación de biomasa más importantes.

### 5.3 Caracterización de las comunidades microbianas

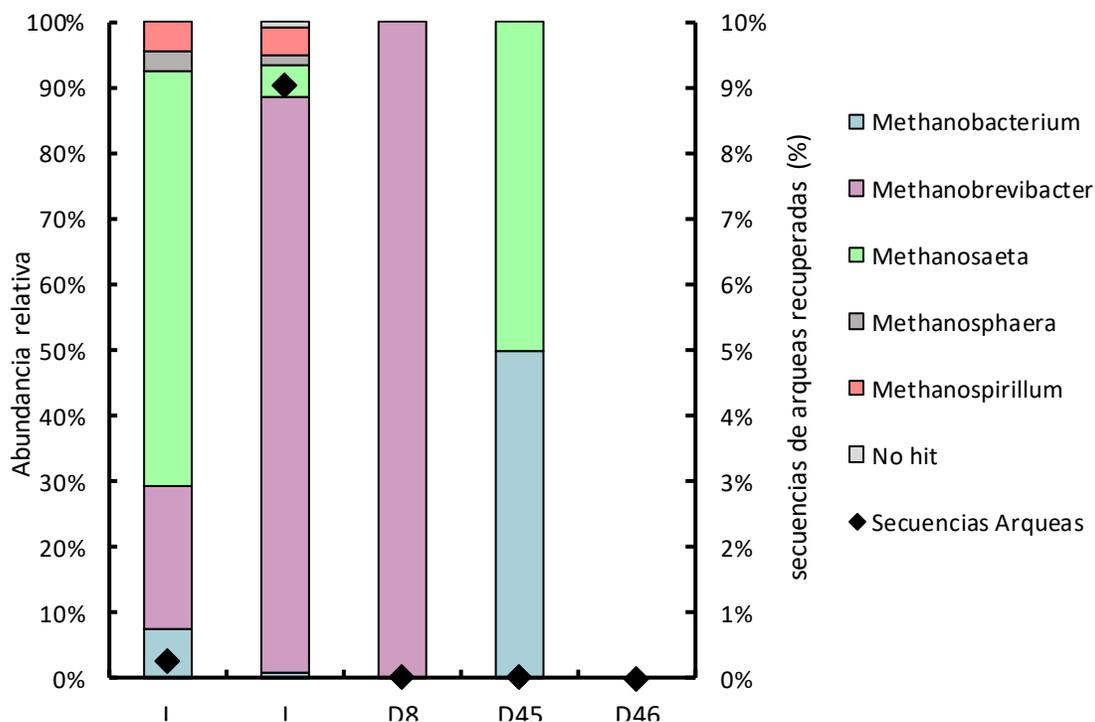
El análisis de las comunidades microbianas se llevó a cabo en cinco muestras de diferentes etapas de implementación del proceso OXANME. La primera muestra fue del lodo utilizado para llevar a cabo el enriquecimiento de microorganismos OXANME (L). La segunda muestra se tomó al finalizar la etapa de enriquecimiento de microorganismos OXANME en la botella operada en lote y con adición periódica de nitrato y CH<sub>4</sub> (I). La tercera muestra se tomó el día 8 de operación durante la etapa experimental II (D8). Finalmente, se tomaron dos muestras en la etapa experimental V, una antes de añadir inhibidor el día 45 de operación (D45) y la siguiente un día después de la adición del inhibidor (D46).

#### 5.3.1 Análisis de las comunidades arqueales

La Figura 12 presenta la abundancia relativa de los géneros de arqueas presentes en las cinco diferentes muestras tomadas durante el trabajo experimental, así como las secuencias de arqueas recuperadas. Se observó la presencia de arqueas capaces de llevar a cabo el proceso OXANME al final del proceso de enriquecimiento. Arqueas del orden Methanosarcinales y Methanomicrobiales pertenecientes al género de *Methanosaeta* y *Methanospirillum*, respectivamente, fueron identificadas. Ambos géneros están reportados dentro de los subgrupos de arqueas metanótrofas (ANME) ANME-1, ANME-2 en el proceso de oxidación anóxica de metano (Glass y Orphan, 2012).

Mientras que en el inóculo OXANME el porcentaje de secuencias de arqueas fue del 9.1%, en todas las muestras tomadas en el reactor este porcentaje fue de 0.003, 0.01 y 0%, respectivamente. Lo cual indicó claramente que bajo las condiciones de operación del reactor las arqueas no tuvieron un papel relevante en el proceso OXANME. Durante las cinco fases experimentales, el reactor se operó con TRH de 102 y 131 h, correspondientes con tasas de dilución de 0.0098 y 0.0076 h<sup>-1</sup> respectivamente. De acuerdo con Chen y col. (2014), la tasa de crecimiento de las arqueas (de forma general) es en torno a 0.00151 h<sup>-1</sup>. Por lo tanto, la prácticamente nula presencia de arqueas en el sistema se atribuyó a que las tasas de dilución aplicadas al reactor fueron mayores a la tasa de crecimiento reportada para arqueas, ocurriendo un lavado de arqueas del sistema. Sin embargo, el hecho de que ocurriera el proceso OXANME confirma que este proceso puede llevarse a cabo exclusivamente con bacterias. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Raghoebarsing y col. (2006), Ettwing y col. (2009) y Ettwing y col. (2010), quienes reportaron que el proceso OXANME puede llevarse a cabo exclusivamente con bacterias.

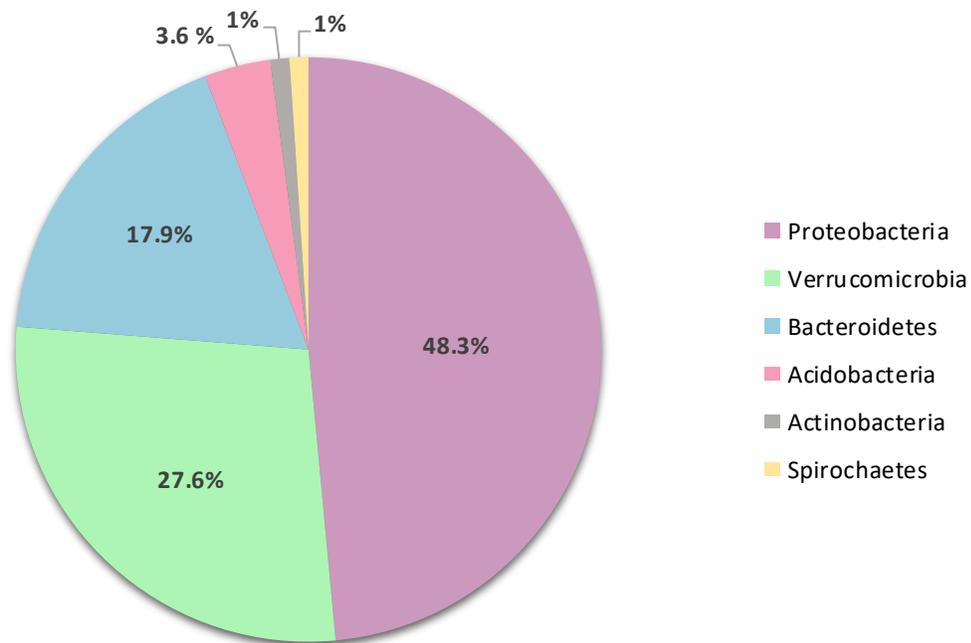
Por otra parte, la caracterización de arqueas confirmó los resultados de remoción de metano después de haber añadido BES, un inhibidor exclusivo de arqueas. Un día después de la adición de BES, la CE de metano se mantuvo en valores de 23.5 ± 3.2 g de CH<sub>4</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (sin diferencias significativas comparado con la remoción de metano observadas en las fases experimentales II, III y IV). Este resultado confirma que fueron las bacterias quienes llevaron a cabo el proceso de oxidación de metano.



**Figura 12.** Caracterización de los géneros de las poblaciones arqueales desde el inóculo inicial a las diferentes etapas experimentales.

### 5.3.2 Análisis de las comunidades bacterianas

La caracterización de filos y géneros de bacterias presentes en el lodo secundario a partir del cual se llevó a cabo el enriquecimiento de microorganismos OXANME se presenta en la Figura 13 y Tabla 6. El filo más abundante fue Proteobacteria, con una abundancia relativa del 48.3%, seguido de Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria y Spirochaetes con 27.6, 17.9, 3.6, 1 y 1%, respectivamente.



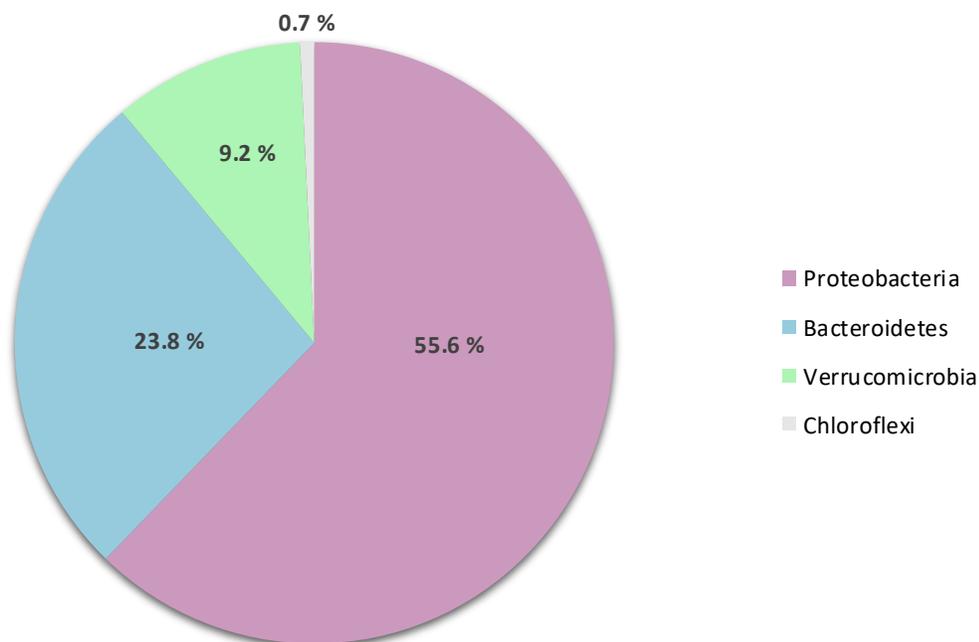
**Figura 13.** Abundancia relativa de los filos presentes en el lodo secundario.

En la Tabla 6 se presentan las bacterias identificadas en el lodo secundario con una abundancia relativa mayor al 1%. El género *Rhodanobacter* fue predominante, con una abundancia relativa del 25.8%. Las bacterias “LD29” y “OLB8” son no cultivables clasificadas dentro de la familia Chthoniobacteraceae y Saprospiraceae reportándose en artículos de muestras ambientales (Xu y col., 2018). De acuerdo con Nierychlo y col. (2019) las bacterias “OLB8” son heterótrofas aerobias. Estos resultados permiten una referencia a partir de la cual se pueden comparar las comunidades microbianas enriquecidas en el proceso de remoción de metano bajo condiciones desnitrificantes.

**Tabla 6.** Bacterias presentes en el lodo con una abundancia mayor al 1%.

<b>Dominio&gt;Filo&gt;Clase&gt;Orden&gt;Familia&gt;Género</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Rhodanobacteraceae; <i>Rhodanobacter</i>	25.8
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Chthoniobacterales; Chthoniobacteraceae; <i>LD29</i>	20.4
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Crocinitomicaceae; <i>Fluviicola</i>	10.6
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Thermomonas</i>	8.3
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Chthoniobacterales; Terrimicrobiaceae; <i>Terrimicrobium</i>	6.1
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Chitinophagales; Saprospiraceae; <i>OLB8</i>	5.5
Bacteria; Acidobacteria; Acidobacteriia; Solibacterales: Solibacteraceae; <i>Bryobacter</i>	2.1
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Defluviimonas</i>	1.4
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; <i>Hyphomicrobium</i>	1.3
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Chitinophagales; Chitinophagaceae; <i>Ferruginibacter</i>	1.2
Bacteria; Spirochaetes; Leptospirae; Leptospirales; Leptospiraceae; <i>Turneriella</i>	1

La caracterización de filos y géneros de bacterias presentes en el cultivo de enriquecimiento OXANME (día 96) utilizado para inocular el reactor en continuo se presenta en la Figura 14 y Tabla 7. El filo más abundante fue Proteobacteria, con una abundancia relativa del 55.6%, seguido de Bacteroidetes, Verrucomicrobia y Chloroflexi con una abundancia relativa de 28.8, 9.2 y 0.7%, respectivamente. Lo cual indicó que las condiciones anóxicas desnitrificantes en presencia de metano favorecieron el enriquecimiento del filo Proteobacteria. Es importante mencionar que el filo Verrucomicrobia, el cual está relacionado con la oxidación de metano (Dunfield y col., 2007; Wu y col., 2011), se encontró con una abundancia relativa del 9.2%.



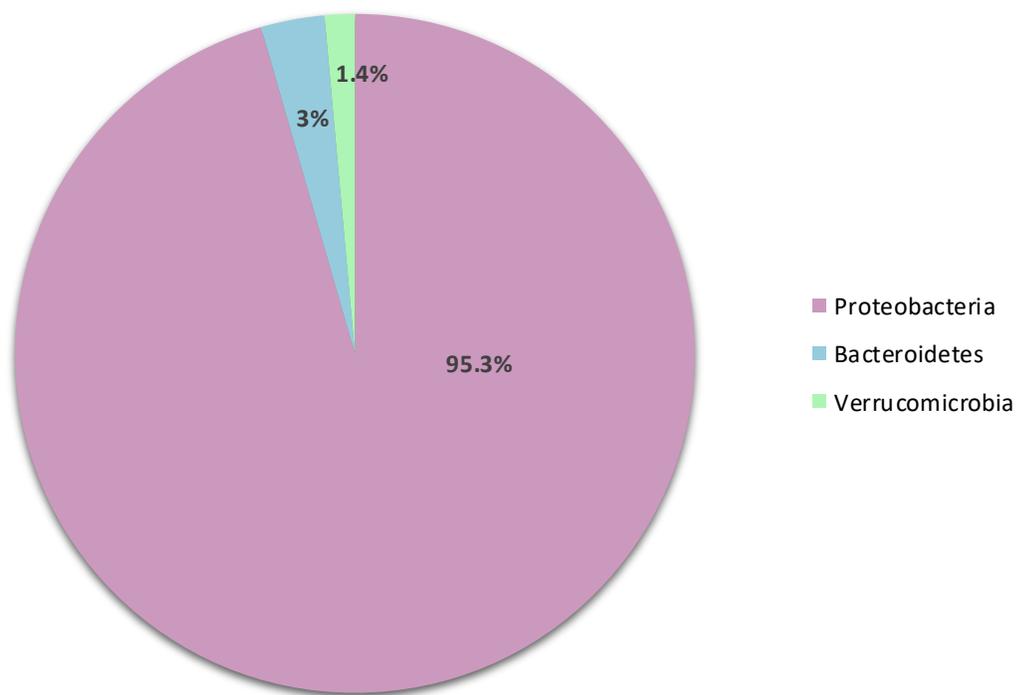
**Figura 14.** Abundancia relativa de los filios presentes el día 96 de enriquecimiento y aclimatación del cultivo OXANME.

A modo de resumen, en la Tabla 7 se muestran las bacterias identificadas con una abundancia relativa mayor al 1%. El género *Thermomonas* fue el más abundante con 17.8% de abundancia relativa, seguido de *Aquimonas*, *Sediminibacterium* y *Flavobacterium*, con abundancias del 6.6, 5.6 y 5.4%, respectivamente. Bacterias metanótrofas anaerobias capaces de utilizar nitrato como aceptor de electrones, tales como *Theromonas* y *Fluviicola*, se han reportado en la literatura (Mergaert y col., 2003; de Almeida y col., 2018). Las bacterias “28-YEA-48” y “BD1-7\_clade” son no cultivables clasificadas dentro de la familia Beijerinckiaceae y Spongiibacteraceae. Cho y Giovannoni (2004) reportaron la presencia de las bacterias “BD1-7\_clade” en muestras de agua de mar. Estos resultados confirmaron que la etapa de enriquecimiento de bacterias OXANME se llevó a cabo de forma exitosa.

**Tabla 7.** Caracterización bacteriana de la etapa de enriquecimiento y aclimatación con una abundancia mayor al 1%.

<b>Dominio&gt;Filo&gt;Clase&gt;Orden&gt;Familia&gt;Género</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Thermomonas</i>	17.8
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Rhodanobacteraceae; <i>Aquimonas</i>	6.6
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Chitinophagales; Chitinophagaceae; <i>Sediminibacterium</i>	5.6
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Flavobacterium</i>	5.4
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae; <i>28-YEA-48</i>	4.9
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Rubritaleaceae; <i>Luteolibacter</i>	4
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Crocinitomicaceae; <i>Fluviicola</i>	3.9
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; <i>Prostheco bacter</i>	2.4
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Aquabacterium</i>	2.2
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Cytophagales; Spirosomaceae; <i>Lacihabitans</i> .	1.8
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Acidovorax</i> .	1.5
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae; <i>Phenylobacterium</i> .	1.5
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; <i>Brevifollis</i> .	1.4
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Cellvibrionales; Spongiibacteraceae; <i>BD1-7_clade</i> .	1.4
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Rhodobacter</i> .	1.4
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Ottowia</i> .	1.3
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Cytophagales; Cytophagaceae; <i>Cytophaga</i> .	1.2
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Ramlibacter</i> .	1.2
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; <i>Aeromonas</i> .	1.2
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae; <i>Pedobacter</i> .	1.1
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingorhabdus</i> .	1.1
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Lysobacter</i> .	1

La caracterización de filos y géneros de bacterias presentes en la etapa experimental II se presenta en la Figura 15 y Tabla 8. El filo más abundante fue Proteobacteria, con un 95.3%, seguido de Bacteroidetes y Verrucomicrobia con una abundancia relativa de 3 y 1.4%, respectivamente. Durante esta etapa experimental la abundancia relativa de las Proteobacterias aumentó prácticamente al doble en comparación con la etapa de aclimatación y enriquecimiento de un 55.62 a un 95.34%.



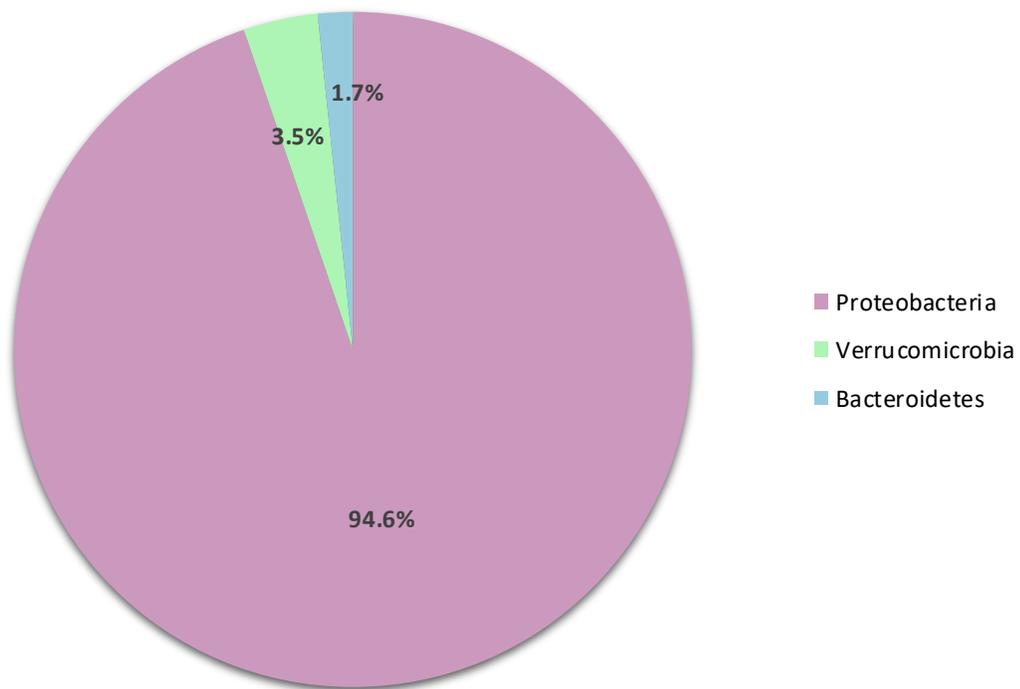
**Figura 15.** Abundancia relativa de los filos presentes en la etapa experimental II.

A modo de resumen, en la Tabla 8 se muestran las bacterias identificadas con una abundancia relativa mayor al 1%. El género *Pseudomonas* fue el más abundante, con 51.4% de abundancia relativa, seguido de *Dechloromonas*, *Aeromonas* y *Azospira*, con abundancias del 7.9, 7.3 y 4.8%, respectivamente. De acuerdo con Hernandez y col. (1991), el género *Pseudomonas* puede utilizar el nitrato como aceptor final de electrones en condiciones anaerobias, en un proceso desnitrificante.

**Tabla 8.** Caracterización bacteriana de la etapa experimental II con una abundancia mayor al 1%.

<b>Dominio&gt;Filo&gt;Clase&gt;Orden&gt;Familia&gt;Género</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i>	51.4
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Dechloromonas</i>	7.9
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; <i>Aeromonas</i>	7.3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Azospira</i>	4.8
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; <i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	2.6
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; <i>Citrobacter</i>	2.6
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Alicyclophilus</i>	1.9
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Dysgonomonadaceae; <i>Dysgonomonas</i>	1.5
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Pleomorphomonadaceae; <i>Hartmannibacter</i>	1.3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Variovorax</i>	1.3
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingopyxis</i>	1

La caracterización de filos y géneros de bacterias presentes antes de la adición del inhibidor (BES) se presenta en la Figura 16 y Tabla 9. El filo más abundante fue Proteobacteria con una abundancia relativa del 95.6%, posteriormente Bacteroidetes y Verrucomicrobia con 3.5 y 1.7 %, respectivamente. De acuerdo con Lee y col. (2009) el filo Verrucomicrobia está relacionado con la oxidación de metano, debido a que la estructura interna de la célula puede alojar la enzima metano monooxigenasa que se encuentra en los metanotrofos.



**Figura 16.** Abundancia relativa de los filos presentes en el reactor antes de añadir el inhibidor BES.

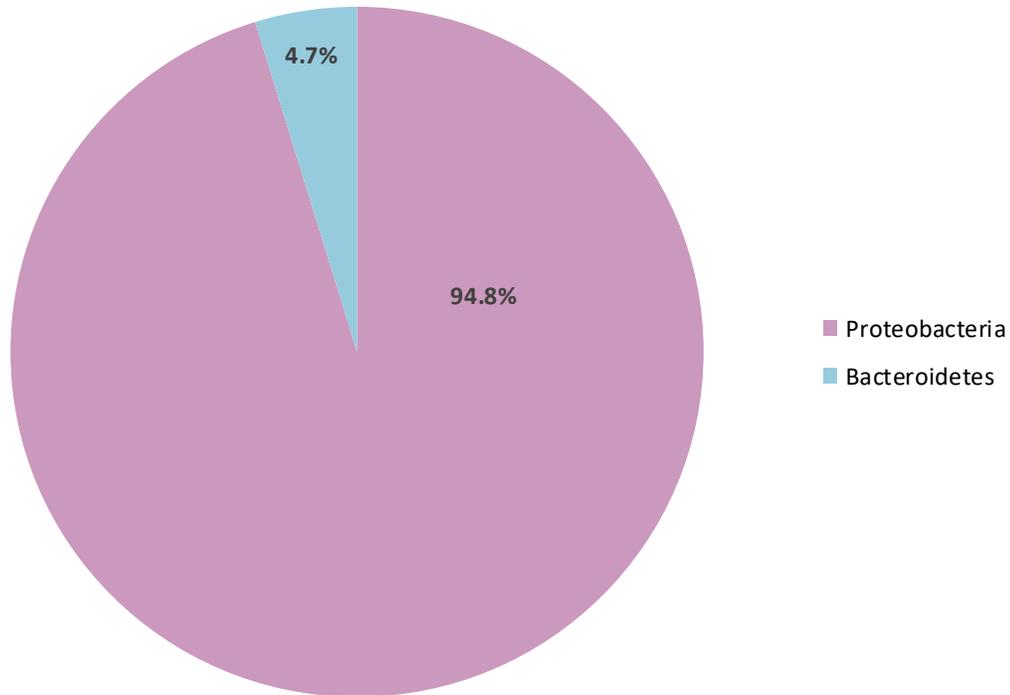
A modo de resumen, en la Tabla 9 se muestran las bacterias identificadas con una abundancia relativa mayor al 1%. El género *Pseudomonas* fue el más abundante, con 67.3% de abundancia relativa, seguido de *Thauera*, *Comamonas* y *Lacunisphaera*, con abundancias del 8, 4.7 y 3.5%, respectivamente. Es relevante mencionar que la oxidación de metano se lleva a cabo por la clase de Gammaproteobacterias (Metanotrofos tipo I, II y X) (Danilova y Dedysh, 2014; Hanson y Hanson, 1996).

**Tabla 9.** Caracterización bacteriana del reactor antes de añadir el inhibidor BES con una abundancia mayor al 1%.

<b>Dominio&gt;Filo&gt;Clase&gt;Orden&gt;Familia&gt;Género</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i>	67.3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Thauera</i>	8
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Comamonas</i>	4.7
Bacteria; Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Opitutales; Opitutaceae; <i>Lacunisphaera</i>	3.5
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Alicyciphilus</i>	2.3
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingopyxis</i>	2.2
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Diaphorobacter</i>	1.5
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Azospira</i>	1.1
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Dechloromonas</i>	1

La caracterización de filos y géneros de bacterias presentes después de la adición del inhibidor (BES), tomando en cuenta los microorganismos identificados con una abundancia relativa mayor al 1%, se presenta en la Figura 17 y Tabla 10. Bajo esta

condición sólo se obtuvieron dos filos: Proteobacteria, con una abundancia relativa de 94.8% y Bacteroidetes con 4.7%.



**Figura 17.** Abundancia relativa de los filos presentes en el reactor después de añadir el inhibidor BES.

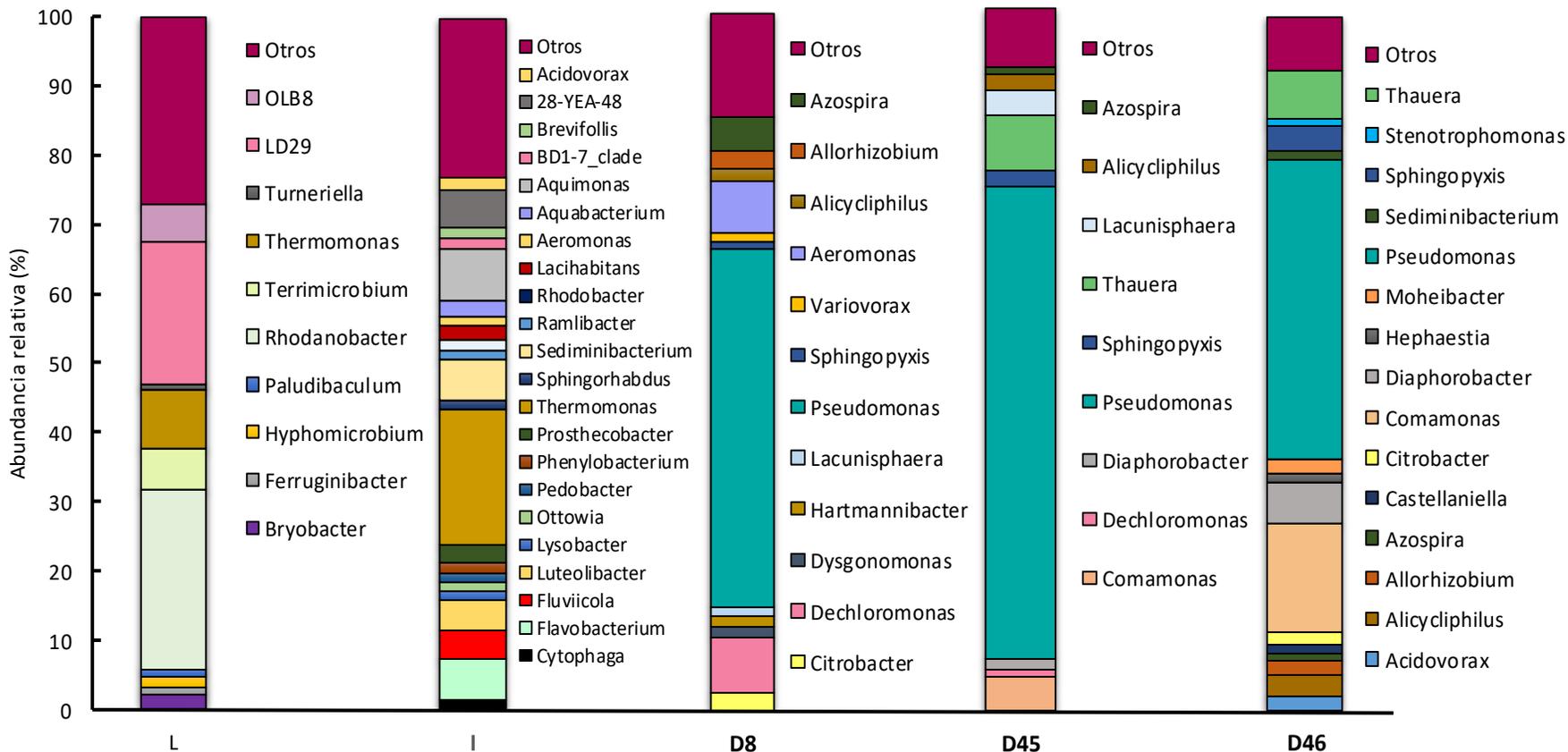
A modo de resumen, en la Tabla 10 se muestran las bacterias identificadas con una abundancia relativa mayor al 1%. El género *Pseudomonas* fue el más abundante, con 43.3% de abundancia relativa, seguido de *Comamonas*, *Thauera* y *Diaphorobacter* con abundancias del 15.7, 6,9 y 6.1%, respectivamente. Es importante mencionar también el género *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* ya que esta reportado como una bacteria desnitrificante.

**Tabla 10.** Caracterización bacteriana del reactor después de añadir el inhibidor BES con una abundancia mayor al 1%.

<b>Dominio&gt;Filo&gt;Clase&gt;Orden&gt;Familia&gt;Género</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i>	43.3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Comamonas</i>	15.7
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Thauera</i>	6.9
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Diaphorobacter</i>	6.1
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Sphingopyxis</i>	3.7
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Alicyclophilus</i>	3.2
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; <i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	2.1
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Flavobacteriales; Weeksellaceae; <i>Moheibacter</i>	2
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Acidovorax</i>	1.9
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; <i>Citrobacter</i>	1.7
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Chitinophagales; Chitinophagaceae; <i>Sediminibacterium</i>	1.3
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteri; Betaproteobacteriales; Burkholderiaceae; <i>Castellaniella</i>	1.2
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Hephaestia</i>	1.2
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; <i>Stenotrophomonas</i>	1.1
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteriales; Rhodocyclaceae; <i>Azospira</i>	1.1

En la Figura 18 se muestra la caracterización bacteriana de las cinco diferentes muestras a modo de resumen, conforme a las abundancias relativas a nivel género y tomando en cuenta los microorganismos identificados con una abundancia relativa mayor al 1% (los identificados por debajo de este valor fueron agrupados en la categoría de “otros”). Los resultados de los análisis mostraron que el inóculo inicial fue diferente a la comunidad enriquecida en el reactor. Los géneros dominantes en

el inóculo inicial fueron *Rhodanobacter*, “LD29” y *Thermomonas* mientras que en la biomasa enriquecida predominaron *Pseudomonas*, *Thauera* y *Azospira*. En las muestras del lodo secundario (L) y la aclimatación del cultivo de enriquecimiento OXANME (I), se identificó la presencia de bacterias pertenecientes a los géneros *Thermomonas* y *Pseudoxanthomonas*. De acuerdo con la literatura, estos géneros están relacionados con la reducción de nitrato a nitrito y la reducción de nitrito a óxido nitroso, respectivamente. En las siguientes etapas, estos géneros no tuvieron una abundancia relativa significativa, por lo que se puede atribuir que por esta razón no se obtuvieron emisiones de N<sub>2</sub>O durante la operación del reactor. Durante las últimas tres etapas referentes a la etapa experimental II (D8), antes y después de la adición del inhibidor para arqueas (BES) (D45 y D46) respectivamente, se tuvo un enriquecimiento en el género *Pseudomonas*, este género se caracteriza por contar con diferentes especies que llevan a cabo el proceso OXANME. De igual forma, los géneros *Alicyclophilus* y *Azospira* fueron enriquecidos durante toda la operación del reactor, teniendo una gran importancia en el proceso desnitrificante, y concretamente en la reducción de nitrato en el medio (Mechichi y col., 2003; Bae y col., 2007). Con referencia a la oxidación de metano, se observó la presencia del género *Sphingopyxis*. De acuerdo con Lee y col. (2012), este género se relaciona con la eliminación simultánea de metano y compuestos de azufre volátiles. Para las muestras tomadas antes y después de la adición del inhibidor, se enriqueció el género *Comamonas*. De acuerdo con Gumaelius y col. (2001), este género puede reducir al nitrato a nitrógeno gas. Estos resultados indicaron que las comunidades bacterianas estuvieron enriquecidas con bacterias específicas capaces de llevar a cabo el proceso de oxidación anóxica de metano bajo condiciones desnitrificantes.



**Figura 18.** Evolución de las comunidades bacterianas desde la muestra de lodos hasta la última etapa experimental con una abundancia relativa mayor al 1% los identificados debajo de este valor fueron agrupados en la categoría de “otros”.

## 6. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

En este trabajo se implementó un proceso OXANME el cual tiene importantes repercusiones en el ciclo de carbono y nitrógeno (sin la producción de  $N_2O$ ) en el contexto de tratamiento de aguas residuales, a partir de un lodo activado aerobio secundario. El proceso en continuo estudiado en un reactor de tanque agitado presentó una capacidad de remoción promedio de  $32.1 \pm 11.7 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , correspondiente con una eficiencia de remoción de  $4.1 \pm 1.5\%$  utilizando un tiempo de retención del gas de 50 min. Se tuvo una concentración promedio de  $O_2$  disuelto en el reactor de  $0.035 \text{ g m}^{-3}$ , con esta baja concentración se puede inferir que el metano fue el donador de electrones al inicio del proceso, descartando su oxidación por vía aerobia. Se estudiaron diferentes concentraciones de nitrato, con tasas de remoción de  $N-NO_3^-$  de 0.9 a  $3.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con un TRH de 131 h referente a una tasa de dilución de  $0.0076 \text{ h}^{-1}$ , sin estimular la formación de  $N_2O$  en el proceso OXANME (información que es escasa en la literatura). Se caracterizaron las comunidades arqueales y bacterianas en diferentes etapas experimentales. Se identificó que el proceso OXANME puede llevarse a cabo solo con la actividad de bacterias, ya que la abundancia relativa de las arqueas fue prácticamente cero para las etapas de operación del reactor. Se caracterizaron las bacterias con abundancias relativas representativas, de acuerdo con su filo y género durante todo el trabajo experimental, para las etapas de operación en continuo se identificaron géneros importantes como: *Pseudomonas*, *Sphingopyxis*, *Alicyclophilus* y *Azospira* asociándolas con su función en el proceso de oxidación anóxica de metano (OXANME) con base en la literatura.

Se propone como trabajo a futuro caracterizar el desempeño del proceso OXNAME bajo condiciones no ideales, utilizando diferentes TRH para favorecer el crecimiento de arqueas en el sistema, de igual forma se sugiere la adición de un soporte de biopelícula para incrementar la concentración de biomasa en el sistema y favorecer la oxidación biológica. El trabajo a futuro también puede considerar el  $H_2S$  en el proceso, actuando como donador de electrones simultáneamente con el metano para la reducción de nitrato. Los objetivos de la tesis se cumplieron aclarando las interrogantes fundamentales del proceso OXANME, demostrando que el  $CH_4$  es el donador de electrones en el proceso de reducción de nitrato y no el metanol, bajo las condiciones estudiadas no se estimuló la emisión de  $N_2O$  durante el proceso y se identificó que el proceso OXANME puede llevarse exclusivamente con la actividad de las bacterias.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bae H S, Rash B A, Rainey F A, Nobre M F, Tiago I, da Costa M S, Moe W M (2007) Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7): 1521-1526.
- Bailey K, Kon S, Dickens F, O'brien J R P, King E, Rimington C, Todd B K A (1986) *Biochemical. Engineering Fundamentals*. 984.
- Banco Mundial (BIRF) (2019) Emisiones de metano (kt de equivalente de CO<sub>2</sub>). <https://datos.bancomundial.org/indicador/EN.ATM.METH.KT.CE?end=2012&start=2005>
- Baron S (1996) Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)- *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>
- Barragán-Trinidad M, Carrillo-Reyes J, Buitrón G (2017) Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresource Technology* 244:100-107.
- Bratina B J, Brusseau G A, Hanson R S (1992) Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylotrophic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(4): 645-648.
- Chen X, Guo J, Shi Y, Hu S, Yuan Z, Ni B J (2014) Modeling of simultaneous anaerobic methane and ammonium oxidation in a membrane biofilm reactor. *Environmental Science & Technology*, 48(16): 9540-9547.

- Cho J C, Giovannoni S J (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*.70(1): 432-440.
- Daelman M R, van Voorthuizen E M, van Dongen U G, Volcke E I, van Loosdrecht M C (2012) Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Research* 46(11): 3657-3670.
- Danilova O V, Dedysh S N (2014) Abundance and diversity of methanotrophic Gammaproteobacteria in northern wetlands. *Microbiology*, 83(1-2): 67-76.
- de Almeida Fernandes L, Pereira A D, Leal C D, Davenport R, Werner D, Mota Filho, C R, de Araujo J C (2018) Effect of temperature on microbial diversity and nitrogen removal performance of an anammox reactor treating anaerobically pretreated municipal wastewater. *Bioresource Technology*. 258: 208-219.
- Delhoménie M C, Heitz M (2005) Biofiltration of air: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(1-2): 53-72.
- Doorn M R J, Towprayoon S, Manso V S, Irving W, Palmer C, Pipatti R, Wang C. (2006) Directrices del IPCC de 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. Capítulo 6 Tratamiento y eliminación de aguas residuales: 6.7.
- Dunfield P F, Yuryev A, Senin P, Smirnova A V, Stott M B, Hou S, Wang J (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature*, 450 (7171): 879-882.

Environmental Protection Agency (EPA) The Methane to Markets Partnership (2010): 3-4 [https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-01/documents/usg\\_2010\\_accomplishments.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-01/documents/usg_2010_accomplishments.pdf)

Environmental Protection Agency (EPA). Greenhouse Gas Emissions (2017). <https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gases>.

Ettwig K F, Shima S, Van De Pas-Schoonen K T, Kahnt J, Medema M H, Op Den Camp H J, Strous M (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology* 10(11): 3164-3173.

Ettwig K F, Van Alen T, van de Pas-Schoonen K T, Jetten M S, Strous M (2009) Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(11): 3656-3662.

Ettwig K F, Butler M K, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers M M, Schreiner F, Dutilh B E, Zedelius J, Beer de D, Gloerich J, Wessels H J C T, Alen T, Luesken F, Wu M L, Pas-Schoonen K T, Op den Camp H J M, Janssen-Megens E M, Francoijs K, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten M S M, Strous M (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464(7288): 543-548.

European Chemical Agency ECHA (2019) Substance information methane. <https://echa.europa.eu/substance-information//substanceinfo/100.000.739>

Franklin M P, Hu Y, Singh K A, Tailakov V O (2006) Directrices del IPCC de 2006 para los inventarios nacionales de gases de efecto invernadero. Capítulo 4 Emisiones Fugitivas: 4.32.

Ghobadi J, Ramirez D, Khoramfar S, Jerman R, Crane M, Hobbs K (2018) Simultaneous absorption of carbon dioxide and nitrogen dioxide from simulated flue gas stream using gas-liquid membrane contacting system. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 77: 37-45.

Glass C, Silverstein J (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* 32(3): 831-839.

Glass J, Orphan V J (2012) Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Frontiers in Microbiology* 3: 61.

Gumaelius L, Magnusson G, Pettersson B, Dalhammar G (2001) *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3): 999-1006.

Guo G, Wang Y, Hao T, Wu D, Chen G H (2018) Enzymatic nitrous oxide emissions from wastewater treatment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 12(1): 10.

- Gustavsson D J I y la Cour Jansen J (2011) Dynamics of nitrogen oxides emission from a full-scale sludge liquor treatment plant with nitrification. *Water Science and Technology*, 63(12): 2838-2845.
- Hanson R S, Hanson T E (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 60(2): 439-471.
- Haroon M F, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Tyson G W (2013) Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*. 500(7464): 567-570.
- Hatamoto M, Kimura M, Sato T, Koizumi M, Takahashi M, Kawakami S, Yamaguchi, T (2014) Enrichment of denitrifying methane-oxidizing microorganisms using up-flow continuous reactors and batch cultures. *Plos One*. 9(12).
- He Z, Cai C, Wang J, Xu X, Zheng P, Jetten M S, Hu B (2016) A novel denitrifying methanotroph of the NC10 phylum and its microcolony. *Scientific Reports* 6: 32241.
- Hernandez D, Dias F M, Rowe J J (1991) Nitrate transport and its regulation by O<sub>2</sub> in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 286(1): 159-163.
- Houbron E, Torrijos M, Capdeville B (1999) An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science and Technology* 40(8): 115-122.
- IPCC (2013) Glosario [Planton, S. (ed.) En: Cambio Climático 2013. [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/08/WGI\\_AR5\\_glossary\\_ES.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/08/WGI_AR5_glossary_ES.pdf)

- Islas-Lima S, Thalasso F, Gomez-Hernandez J (2004) Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research* 38(1): 13-16.
- Jiang H, Chen Y, Jiang P, Zhang C, Smith T J, Murrell J C, Xing X H (2010) Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal* 49(3): 277-288.
- Jin, Y., Ding, D., Feng, C., Tong, S., Suemura, T, Zhang, F. (2012). Performance of sequencing batch biofilm reactors with different control systems in treating synthetic municipal wastewater. *Bioresource Technology*, 104, 12-18.
- Kennes C, Thalasso F (1998) Waste gas biotreatment technology. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology* 72(4): 303-319.
- Khan F I, Ghoshal A K (2000) Removal of volatile organic compounds from polluted air. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries* 13(6): 527-545.
- Kim S, Lee K B (2019) Impregnation of hydrotalcite with  $\text{NaNO}_3$  for enhanced high-temperature  $\text{CO}_2$  sorption uptake. *Chemical Engineering Journal* 356: 964-972.
- Knittel, K, Boetius A (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* 63: 311-334.
- Knowles R (1982) Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1): 43.

- Knowles R (2005) Denitrifiers associated with methanotrophs and their potential impact on the nitrogen cycle. *Ecological Engineering* 24(5): 441-446.
- Lee K C, Webb R I, Janssen P H, Sangwan P, Romeo T, Staley J T, Fuerst J A (2009) Phylum Verrucomicrobia representatives share a compartmentalized cell plan with members of bacterial phylum Planctomycetes. *BMC Microbiology* 9(1): 5.
- Lee J H, Kim T G, Cho K S (2012) Isolation and characterization of a facultative methanotroph degrading malodor-causing volatile sulfur compounds. *Journal of Hazardous Materials*, 235: 224-229.
- López J C, Quijano G, Souza T S, Estrada J M, Lebrero R, Muñoz R (2013) Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: state of the art and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(6): 2277-2303.
- López J C, Porca E, Collins G, Pérez R, Rodríguez-Alija A, Muñoz R, Quijano G (2017) Biogas-based denitrification in a biotrickling filter: influence of nitrate concentration and hydrogen sulfide. *Biotechnology and Bioengineering* 114(3): 665-673.
- Lowry O H, Rose rough N J, Farr A L, Randall R J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- McCarty, P L. (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals. *Chemistry and Microbiology*. 95: 107-112.

- Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G (2003) *Alicycliphilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing  $\beta$ -proteobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1): 147-152.
- Mergaert J, Cnockaert M C, Swings J (2003) *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly ( $\epsilon$ -caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6): 1961-1966.
- Modin O, Fukushi K, Yamamoto K (2007) Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research* 41(12): 2726-2738.
- Morero, B, Campanella E A (2013) Simulación del Proceso de Absorción Química con Soluciones de Aminas para la Purificación Biogás. *Información tecnológica*, 24(1): 25-32.
- Muñoz R, Daugulis A J, Hernández M, Quijano G (2012) Recent advances in two-phase partitioning bioreactors for the treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances* 30(6): 1707-1720.
- Muñoz R, Malhautier L, Fanlo J L, Quijano G (2015) Biological technologies for the treatment of atmospheric pollutants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95(10): 950-967.
- Murrell J C, Radajewski S (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Research in Microbiology* 151(10):807-814.

- Nauhaus K, Treude T, Boetius A, Krüger M (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental microbiology*. 7(1): 98-106.
- Neumann R B, Moorberg C J, Lundquist J D, Turner J C, Waldrop M P, McFarland J W, Euskirchen E S, Edgar C W, Turetsky M R (2019) Warming effects of spring rainfall increase methane emissions from thawing permafrost. *Geophysical Research Letters* 46(3): 1393-1401.
- Nierychlo M, Andersen K S, Xu Y, Green N, Albertsen M, Dueholm M S, Nielsen P H (2019) Species-level microbiome composition of activated sludge - introducing MiDAS 3 ecosystem-specific reference database and taxonomy. *BioRxiv*.
- Noyola A, Morgan-Sagastume J M, Lopez-Hernandez, J E (2006) Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. *Reviews in Environmental Science and Bio/technology* 5(1): 93-114.
- Peng Y, Zhu, G (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(1): 15-26.
- Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene structure and expression* 1577(3): 355-376.
- Quijano G, Romera J, Bonilla-Morte L M, Figueroa Gonzalez I (2017) Two phase partitioning bioreactors for treatment of volatile hydrocarbons. *Biodegradation*

and bioconversion of hydrocarbons 225-258. Springer Science + Business Media Singapore.

Quintero Ramírez, R. (1993). Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones.

Raghoebarsing A A, Pol A, Van de Pas-Schoonen K T, Smolders A J, Ettwig K F, Rijpstra W I C, Strous M (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440(7086): 918-921.

Revah S, Morgan-Sagastume J M (2005) Methods of odor and VOC control. In: *Biotechnology for odor and air pollution control*, Springer :29-63.

Rocha-Rios J, Bordel S, Hernández S, Revah S (2009) Methane degradation in two-phase partition bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 152(1): 289-292.

Scheller S, Goenrich M, Boecher R, Thauer R K, Jaun B (2010) The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane *Nature* 465(7298): 606.

Schnelle Jr K B, Dunn R F, Ternes M E (2015) *Air pollution control technology handbook*. CRC Press.

Semrau J D, DiSpirito A A, Yoon S (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4): 496-531.

Shareefdeen Z (2005) *Biotechnology for odor and air pollution control*. Springer Science & Business Media.

Warneke S, Schipper L A, Matiasek M G, Scow K M, Cameron S, Bruesewitz D A, McDonald, I R (2011) Nitrate removal, communities of denitrifiers and adverse

effects in different carbon substrates for use in denitrification beds. *Water Research* 45(17): 5463-5475.

Wu M L, Ettwig K F, Jetten M S, Strous M, Keltjens J T, Niftrik L V (2011) A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus '*Methylomirabilis oxyfera*' *Biochemical Society Transactions*. 243-248.

Xu Z, Te S H, He Y, Gin, K Y H (2018) The characteristics and dynamics of cyanobacteria-heterotrophic bacteria between two estuarine reservoirs-tropical versus sub-tropical regions. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2531.

Zhu B, Bradford L, Huang S, Szalay A, Leix C, Weissbach M, Lueders T (2017) Unexpected diversity and high abundance of putative nitric oxide dismutase (Nod) genes in contaminated aquifers and wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(4): e02750-16.