



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DINÁMICA DE LA MICROBIOTA DURANTE LA OXIDACIÓN DE METANO Y SULFURO
DE HIDRÓGENO DESORBIDOS DE UN EFLUENTE ANAEROBIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ZULLY PALOMA RAMOS BAUTISTA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES
[Instituto de Ingeniería UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. HERMINIA LOZA TAVERA
[Facultad de Química](#)

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Septiembre, 2021



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.



Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Adalberto Noyola Robles, en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM

JURADO DE EXAMEN CONSTITUIDO POR:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez (Presidente)

Dr. Sergio Revah Moiseev (Vocal)

Dr. Leobardo Serrano Carreón (Vocal)

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Vocal)

Dr. Luis David Alcaraz Peraza (Secretario)



El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM que cuenta con certificado de conformidad otorgado por el organismo acreditado Certificación Mexicana, S.C., por haber implementado y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad de conformidad con los requisitos de la norma internacional ISO 9001:2015
No. de Certificado CMX C SGC 155 2017, válido en el período del 09 de noviembre de 2017 al 09 de noviembre de 2020

Soli Deo gloria

Agradecimientos

A mi amada Universidad, quien me dio los recursos y la infraestructura para poder realizar esta investigación.

Agradezco al CONACYT por el apoyo financiero dado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Adalberto Noyola por su gran ejemplo de hombre dedicado a la ciencia y dando la dirección y el total apoyo a la culminación de esta tesis.

Al Dr. Daniel de los Cobos, a la Maestra Margarita Cisneros, al Dr. Juan Manuel Morgan, quienes con su apoyo técnico y administrativo pudo salir adelante este trabajo con todos los contratiempos que hubo y de quienes siempre recibí un gran apoyo para encontrar soluciones.

A la Dra. Herminia Loza Tavera, la Dra. Maricarmen Quirasco por ser parte de mi comité tutorial y de quienes recibí apoyo extraordinario y me enseñaron mucho desde lo técnico hasta en lo personal.

Al Ing. Roberto Briones, al señor Ernesto, a la M. en C. Cindy Estrada, al Dr. Martín Vargas y a la M. en C. Patricia Ruiz por su valioso apoyo en las actividades del desarrollo experimental y siempre mostrando una amable disposición.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por apoyarme para presentar los resultados de este trabajo en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería León 2019

A mis padres, Rubén Ramos e Hilda Bautista por su gran apoyo incondicional y cariño, quienes me respaldaron en este proyecto, me alentaron a seguir cuando ya sentía que no podía y siempre haciéndose presente su gran amor por su hija.

A mi hermano Ulises Ramos que estuvo apoyándome en las buenas y en las malas, dándome ánimos a la distancia de miles de formas, y aun recordándome porque había iniciado este proyecto. Gracias por todo, hermano mío

A Jesús Ortega, Natalia Villamizar, Carlos Ortega, Aarón Flores, Nancy Nacimba, Michel Cruz, Melissa Gallardo, Isaac Nava, Yovany Cuetero, Fuad Alé porque fueron compañeros de trabajo entrañables y de quienes recibí apoyo, compartimos risas, pláticas, hasta lágrimas durante este trabajo.

A Sarahí Torres, Citlalli Mendoza, Tania Fernández, Lizbeth Álvarez, Itzel Pérez, Leonel Cortés, Guillermo Alvarado, Edgar Chavarría, Gerardo García, Marco Morales por darme ánimos y palabras de aliento cuando más lo necesité.

Al Señor Dios Todopoderoso, el que era, el que es, y el que ha de venir. Y siempre que aquellos seres vivientes dan gloria y honra y acción de gracias al que está sentado en el trono, al que vive por los siglos de los siglos (Apocalipsis 4:8-11). Él las creó y las conoce a la perfección. ¡Alabado seas!

*No a nosotros, oh Jehová, no a nosotros,
Sino a tu nombre da gloria,
Por tu misericordia, por tu verdad.*

Salmo 115: 1

Índice

Agradecimientos.....	5
Índice.....	7
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras	11
Índice de abreviaturas.....	15
Resumen	17
1 Introducción	19
2 Marco teórico.....	21
2.1 Biotecnología involucrada en el tratamiento de emisiones gaseosas.....	21
2.1.1 Biofiltros	22
2.2 Microorganismos participantes en la oxidación de metano y sulfuro de hidrógeno	25
2.3 Factores que influyen en la eficiencia de remoción del metano en biofiltros.....	29
2.4 Intervención del sulfuro de hidrógeno en la oxidación del metano	31
2.5 Herramientas de biología molecular para el estudio de comunidades microbianas en sistemas de biofiltros.	32
3 Justificación, Objetivos e Hipótesis.....	36
3.1 Justificación de la investigación y planteamiento del problema	36
3.2 Objetivos.....	37
3.2.1 Objetivo general.....	37
3.2.2 Objetivos específicos	37
3.3 Hipótesis	37
4 Metodología.....	38
4.1 Mención de los métodos utilizados.....	38
4.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos.	40
4.2 Procedimiento general de la investigación experimental.	41
4.2.1 Planta de tratamiento de agua residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales. (Fase 1 y 2)	41
4.2.2 Sistema de alimentación de aire en la fase experimental 3 (laboratorio).	44

4.2.3	Características del biofiltro y el empaque de composta	45
4.2.4	Parámetros de operación	47
4.3	Estudio de la comunidad microbiana.....	48
4.3.1	Generación del muestreo	48
4.3.2	Extracción de DNA.....	49
4.3.3	Cuantificación y determinación de la integridad del DNA mediante espectrofotometría y electroforesis	49
4.3.4	Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
4.3.5	Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés).	51
4.3.6	Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida.....	52
4.3.7	Corte, reamplificación y purificación de bandas para secuenciación	54
4.3.8	Secuenciación	55
4.3.9	Análisis de secuencias en <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	55
5	Resultados y Discusión	56
5.1	Primera etapa de operación (Fase 1).....	56
5.1.1	Resultados fisicoquímicos	56
5.1.2	Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés)	60
5.1.3	Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida.....	62
5.2	Segunda etapa de operación (Fase 2).....	66
5.2.1	Resultados fisicoquímicos	66
5.2.2	Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés)	70
5.2.3	Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida.....	72
5.3	Tercera Etapa de Operación (Fase 3).....	75
5.3.1	Resultados fisicoquímicos	75
5.3.2	Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés)	80

5.3.3	Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida.....	82
5.4	Evaluación General de la Operación.....	85
5.4.1	Parámetros fisicoquímicos.....	85
5.4.2	Análisis de secuencias.....	88
5.4.3	Coincidencia de los microorganismos identificados en cada fase experimental.....	99
6	Conclusiones y recomendaciones.....	106
6.1	Conclusiones.....	106
6.2	Recomendaciones.....	107
7	Bibliografía.....	108
8	Anexos.....	116
8.1	Cuantificación y determinación de la integridad del DNA mediante espectrofotometría y electroforesis.....	116
8.2	Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	118
8.3	Purificación de bandas.....	121
8.4	Índices de organización de las comunidades microbianas.....	123
8.5	Valores de Sorensen-Dice y su evolución a lo largo del tiempo.....	125

Índice de tablas

Tabla 2.1 Ejemplos de sistemas de tratamiento para corrientes gaseosas con metano	24
Tabla 2.2. Técnicas de Biología Molecular de primer acercamiento usadas en análisis de ecología microbiana en biofiltros.	33
Tabla 4.1 Características de la composta utilizada.....	46
Tabla 4.2 Parámetros de operación de las tres fases experimentales.....	47
Tabla 4.3. Cebadores que se utilizaron para las ampliaciones por PCR.	50
Tabla 4.4. Reactivo para la reacción de amplificación.	50
Tabla 4.5. Programa de tiempos y temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
Tabla 4.6. Medidas de los reactivos de las disoluciones de alta y baja concentración para generar el gradiente de concentración en el gel.	51
Tabla 5.1 Valores de pH y porcentaje de humedad de la composta al término de cada fase experimental. Las muestras se tomaron en 3 diferentes alturas donde 1 es el nivel más bajo del biofiltro, 2, el nivel intermedio y 4 el nivel más alto dentro del biofiltro.....	87
Tabla 5.2. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 1 (H_2S entrada $333 \text{ ppm}_v \pm 188$).	89
Tabla 5.3. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 2 ($[H_2S]$ promedio $783 \pm 317 \text{ ppm}_v$).	91
Tabla 5.4. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 3 (ausencia de $[H_2S]$).	93
Tabla 5.5 Coincidencias de bandas entre las diferentes fases experimentales. Se indica los días de operación.....	104
Tabla 8.1. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 1.....	116
Tabla 8.2. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 2.....	117
Tabla 8.3. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 3.....	118

Índice de figuras

Figura 2.1 Diferentes tecnologías para tratamiento de emisiones gaseosas.....	21
Figura 2.2. Esquema de un biofiltro.	22
Figura 2.3. Vías de oxidación del metano y asimilación del formaldehído. Abreviaturas: CytC, citocromo c; FADH, formaldehído deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa; pMMO, metano monooxigenasa particulada; sMMO, metano monooxigenasa soluble. Tomado de (Hanson et al., 1996).	26
Figura 2.4. Vía RuMP para la fijación de formaldehído. Tomado de (Hanson et al., 1996)...	26
Figura 2.5. Vía de la serina para fijación de formaldehído. Tomado de (Hanson et al., 1996).	27
Figura 2.6 Oxidación de compuestos reducidos de azufre por quimiolitótrofos del azufre. Tomado de (Madigan et al., 2015).	28
Figura 4.1. Etapas experimentales en las cuales variaron las concentraciones de H ₂ S.	38
Figura 4.2. Descripción de cada actividad experimental para las fases experimentales 1 y 2.	38
Figura 4.3. Descripción de cada actividad experimental para la fase experimental 3.	39
Figura 4.4. Técnicas utilizadas para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos.	39
Figura 4.5 Ejemplo del sistema de medición de la mezcla de CH ₄ , H ₂ S y aire con bolsas Tedlar y el Biogás 5000.	40
Figura 4.6. Planta de tratamiento de agua residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales.	42
Figura 4.7. Diagrama del proceso de desorción del biogás del agua residual.	43
Figura 4.8. Vista lateral del biofiltro y columna de desorción ubicada en la PTAR. En la columna de desorción sucede el proceso de separación del biogás del agua tratada por medio de un flujo de aire.	43
Figura 4.9. Diagrama del sistema de alimentación de la corriente gaseosa con metano de la fase experimental 3.	44
Figura 4.10. Fotografía del sistema de aire y biofiltración de la fase experimental 3. En A) se muestra el tanque de metano al 99.0%; en B) se muestra el compresor de aire y el controlador de la bomba peristáltica; y en C) se muestra las columnas humidificadoras, la bomba peristáltica y el mezclador de gases.	45
Figura 4.11. Fotografía y corte el recipiente utilizado para la biofiltración del gas desorbido.	46
Figura 4.12. Nucleadores que se utilizaron para tomar la muestra de composta.	48
Figura 4.13. Zonas de muestreo dentro del biofiltro.	49
Figura 4.14 Ejemplo de curvas de Lorenz para la determinación del índice de organización (Co) de comunidades microbianas	53

Figura 5.1 Porcentaje en volumen de CH ₄ en la entrada y salida de biofiltro por día y la concentración de entrada al biofiltro de H ₂ S (Fase Experimental 1: H ₂ S entrada 333± 188 ppm _v). Este gas no fue detectado a la salida. (Día 16, adición externa de metano).....	56
Figura 5.2 Gráfica que muestra la evolución de la capacidad de eliminación de metano y la concentración de H ₂ S medida ese día de la Fase Experimental 1 (H ₂ S entrada 333± 188 ppm _v).57	57
Figura 5.3. Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada. Este gráfico muestra la eficiencia de remoción de la Fase Experimental 1 (H ₂ S entrada 333± 188 ppm _v) y las líneas a cuatro valores de eficiencia.....	58
Figura 5.4. Temperatura de cada punto de muestreo de la Fase Experimental 1 (H ₂ S entrada 333± 188 ppm _v).....	59
Figura 5.5. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras de la Fase Experimental 1 (C1 a diferentes días), marcando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar. D00: Día 0, D40: Día 40, D53: Día 53 y D68: Día 68.....	62
Figura 5.6. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 1 Experimental.....	62
Figura 5.7 Dendrograma de distancias. Fase experimental 1 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los clústeres con similitud mayor a 0.7.....	64
Figura 5.8 Valores de Co de la Fase experimental 1.....	65
Figura 5.9 Porcentaje en volumen de CH ₄ en la entrada y salida de biofiltro por día y la concentración de entrada al biofiltro de H ₂ S. Fase experimental 2 (H ₂ S entrada 783 ppm _v ±317).....	66
Figura 5.10. Carga másica de entrada y capacidad de eliminación de CH ₄ y concentración de H ₂ S por día. Las gráficas de CM y CE se sobrepone a partir del día 7, indicando remoción del 100% en la fase experimental 2 (H ₂ S entrada ppm _v ±317).....	67
Figura 5.11. Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada en presencia de alto contenido de H ₂ S en la alimentación (H ₂ S entrada 783 ppm _v ±317).....	68
Figura 5.12 Temperaturas en los puntos de muestreo en cada día de la segunda fase experimental (H ₂ S entrada 783 ppm _v ± 317).....	69
Figura 5.13 Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras de la Fase Experimental 2 (C2) a diferentes días, indicando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar.D04: Día 04, D09: Día 09, D16: Día 16, D24: Día 24.....	71
Figura 5.14. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 2 Experimental.....	72
Figura 5.15. Dendrograma de distancias. Fase experimental 2 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los clústeres con similitud mayor a 0.7.....	73
Figura 5.16. Valores de Co de la Fase 2 experimental.....	74

Figura 5.17. Porcentaje en volumen de CH ₄ en la entrada y salida de biofiltro por día. Fase experimental 3 (sin H ₂ S).	75
Figura 5.18. Capacidad de eliminación de CH ₄ del biofiltro en diferentes días y horas de toma de muestra. En la Fase Experimental 3 (sin H ₂ S) se aumentó la toma de muestra de gas a 3 veces al día.	76
Figura 5.19 Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada. Este gráfico muestra la eficiencia de remoción de la Fase 3 (sin H ₂ S).	77
Figura 5.20. Valores de temperatura dentro del biofiltro y del ambiente por día y ciertas horas de la operación de la fase experimental 3 (sin H ₂ S). Las lecturas de los sensores 2.2 (centro) y 4.2 (centro) no son confiables a partir del día 23.	78
Figura 5.21 Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras de la Fase Experimental 3 (C3) a diferentes días, marcando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar. Las muestras del tiempo 00 no se pudieron analizar en el gel de DGGE. D05: Día 05, D14: Día 14, D22: Día 22 y D28: Día 28	81
Figura 5.22. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 3 Experimental.	83
Figura 5.23 Dendrograma de distancias. Fase experimental 3 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los grupos (clusters) con similitud mayor a 0.7.	83
Figura 5.24 Valores de C _o de la Fase 3 experimental.....	84
Figura 5.25 Comparación de los porcentajes de remoción de metano en cada fase experimental, mostrando las cargas másicas de entrada de metano.	86
Figura 5.26 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los geles de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 1 (H ₂ S entrada 333 ppm _v ± 188). Se encuentran señaladas las bandas que fueron cortadas y posteriormente secuenciadas. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®	88
Figura 5.27 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los geles de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 2, con H ₂ S entrada 783 ppm _v ± 317. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®	90
Figura 5.28 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los geles de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 3, donde no hubo presencia de H ₂ S. Se encuentran señaladas las bandas que fueron cortadas y posteriormente secuenciadas. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®	92
Figura 8.1. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 1 (C1) y para los diferentes puntos de muestreo.	119
Figura 8.2. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 1 (C1) y 2 (C2) y para los diferentes puntos de muestreo.....	119

Figura 8.3. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 2 (C2) y para los diferentes puntos de muestreo.	120
Figura 8.4. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 3 (C3) y para los diferentes puntos de muestreo.	120
Figura 8.5. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas con amplificaciones inespecíficas.	121
Figura 8.6. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas con amplificaciones inespecíficas.	121
Figura 8.7. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas después de la purificación con el kit QIAquick Gel Extraction kit. Los lugares donde no se aprecia la banda, significa que se perdió el reamplificación durante la purificación.	122
Figura 8.8. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas después de la purificación con el kit QIAquick Gel Extraction kit. Los lugares donde no se aprecia la banda, significa que se perdió el reamplificación durante la purificación.	122
Figura 8.9. Índices de organización de la comunidad de la fase 1 Experimental, gel 1.	123
Figura 8.10. Índice de organización de la comunidad de la fase 1 experimental de las semanas 0, 4 y 8.	123
Figura 8.11. Índice de organización de la comunidad de la fase experimental 2, gel 2.	124
Figura 8.12. Índice de organización de la comunidad de la fase experimental 2, gel 4.	124
Figura 8.13. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 1 Experimental.	125
Figura 8.14. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 2 Experimental.	125
Figura 8.15. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 3 Experimental.	126

Índice de abreviaturas

DNA Ácido desoxirribonucleico

RNA Ácido ribonucleico

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

CM Carga másica

CE capacidad de eliminación

J Coeficiente Jaccard

S_D Coeficiente Sorensen-Dice

CO₂ dióxido de carbono

ER eficiencia de remoción

TGGE, por sus siglas en inglés electroforesis en gel de gradiente de temperatura

DGGE, por sus siglas en inglés electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante

FCPyS Facultad de Ciencias Políticas y Sociales

C1 y F1 Fase Experimental 1

C2 y F2 Fase Experimental 2

C3 y F3 Fase Experimental 3

g gramos

GC guanina y citocinas

CH₄ metano

MMO metano monooxigenasa

pMMO metano monooxigenasa particulada

sMMO metano monooxigenasa soluble

μL microlitros

ng nanogramos

NO₃⁻ nitrato

N₂ nitrógeno

C_o Organización de la comunidad

pb pares de base

ppm_v partes por millón volumen

PTAR plantas de tratamiento de aguas residuales municipales

SSCP polimorfismo de conformación de cadena sencilla

RFLP polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal

PCR Polymerase chain reaction (En español, reacción en cadena de la polimerasa)

RuMP Ribulosa Monofosfato

SO₄²⁻ sulfato

H₂S sulfuro de hidrógeno

TRLV tiempo de retención de lecho vacío

UPGMA Unweighted pair group method using arithmetic averages

UASB up flow anaerobic sludge blanket

Resumen

En las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) que cuentan con reactores anaerobios, las reacciones bioquímicas producen biogás, una mezcla de CH₄ (metano), CO₂, N₂ y en menores cantidades gases como el sulfuro de hidrógeno (H₂S). La producción de biogás en plantas pequeñas (con flujos de agua tratada menores a 25 L/s) suele ser insuficiente para su aprovechamiento en la producción de energía eléctrica. En las PTAR anaerobias municipales se colecta aproximadamente el 60 – 80 % del gas metano producido en el tratamiento del agua residual, ya que el resto permanece disuelto en la fase acuosa, que posteriormente y una vez fuera del reactor, se desorbe de la fase acuosa sin control, emitiéndose a la atmósfera y sumando al inventario de gases de efecto invernadero.

El H₂S representa un riesgo para la salud de los trabajadores de estas plantas, provoca daños a las instalaciones por ser un gas corrosivo en presencia de oxígeno, y presenta mal olor que provoca molestias a la comunidad circundante. Por su parte, el CH₄ es un potente gas de efecto invernadero con un efecto 34 veces mayor que el CO₂. Para solucionar las emisiones no controladas de estos gases en pequeñas PTAR se propone el uso de biofiltros de composta.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la dinámica de las comunidades microbianas que se desarrollan en un biofiltro a escala piloto empacado con composta destinado a la oxidación de CH₄ y H₂S desorbidos de un efluente anaerobio municipal.

Esta investigación se realizó en tres fases experimentales donde se varió la concentración de H₂S que ingresó al biofiltro (Fase 1: [H₂S] promedio 333±188ppm_v; Fase 2: [H₂S] promedio 783±317 ppm_v; Fase 3: Ausencia de H₂S). La operación de la fase 1 duró 68 días, la fase 2, 24 días y la fase 3, 29 días. La variación de los tiempos de operación se debió a problemas con la PTAR donde se estaba desarrollando la experimentación. Para la fase 3 se tuvo que realizar un sistema de alimentación de CH₄ con el uso de un tanque de CH₄ al 99%.

Para la Fase 1, se obtuvo una capacidad de eliminación (CE) de CH₄ promedio de 16.7±6.2 g m⁻³ h⁻¹, en la cual la concentración de H₂S promedio de 333±188 ppm_v, teniendo una carga másica de entrada de CH₄ promedio de 22.0±9.2 g m⁻³ h⁻¹.y eficiencia de remoción promedio de 79.5 ±17.3%. Para la fase 2 (alimentación con concentración promedio de H₂S de 783±317 ppm_v), la CE de CH₄ promedio fue de 10.8±5.6 g m⁻³ h⁻¹ con una carga másica promedio de CH₄ máxima de 16.4±6.2g m⁻³ h⁻¹ y una eficiencia de remoción promedio de 88.9 ±29.3%. Para la fase experimental 3 en la cual hubo ausencia de H₂S, la CE de CH₄ promedio fue de 25.4±5.3g m⁻³ h⁻¹, teniendo una carga másica promedio máxima de 30.6±3.5g m⁻³ h⁻¹ y una eficiencia de remoción promedio 81.9 ±14.7%. Los perfiles microbianos identificados para cada fase experimental no evidenciaron grandes cambios, revelando que la comunidad microbiana era uniforme, sin gran impacto ante los cambios ambientales.

Se caracterizó la comunidad microbiana por medio de técnicas de rastreo de huella molecular (PCR-DGGE del gen 16S RNAr), identificando que el microorganismo *Chryseolinea soli* apareció en los diversos puntos de muestreo y entre las diferentes fases experimentales. Del mismo modo, se identificaron géneros microbianos encargados de la oxidación de metano (*Methylovorus*, *Methyloversatilis*, e *Hyphomicrobium*). No fue posible la identificación de microorganismos sulfoxidantes, en contraste con la total remoción del H₂S para las 2 fases experimentales que lo recibieron. Con base en el análisis de los datos experimentales y de la literatura, tal resultado se debe que el H₂S fue eliminado en los primeros centímetros del lecho, no alcanzando el nivel inferior de muestreo de la biomasa (nivel 2).

Los puntos de muestreo donde hubo mayor cambio en la comunidad microbiana se ubicaron en la parte central del biofiltro, de acuerdo con los cambios observados en el índice de Jaccard. En este trabajo fue muy notorio cómo la temperatura dentro del biofiltro varió respecto a la concentración de CH₄ alimentado. Este comportamiento fue más notorio en la Fase 3, la cual tuvo un mejor control del metano alimentado (2%v/v).

En este trabajo se pudo observar que el H₂S no afectó la comunidad microbiana en la mayor parte de la cama filtrante, puesto que es gas fue consumido rápidamente en la zona más baja (entrada) del biofiltro. Las variaciones en la capacidad de eliminación de metano se debieron a las fluctuaciones en la carga másica de entrada de este gas, particularmente a partir de 20 g m⁻³ h⁻¹. Ante un sistema mono-sustrato en la práctica, se logró establecer una amplia diversidad de microorganismos, sin predominio de metilótrofos.

1 Introducción

El consumo anual de agua en México es de 270 917 hm³, de acuerdo con la cifra del año 2018, del cual el uso doméstico y público representa el 14.4% de todo el país. Se producen aguas residuales municipales en un volumen de 7 410 hm³/año. En el año 2017 se aplicó algún tratamiento al agua residual municipal en un flujo del 135.6 m³/s en 2 526 plantas en todo el país, representando el 58% de las aguas residuales producidas al año (CONAGUA, 2018).

El tratamiento de agua residual municipal se puede realizar por medio de reactores anaerobios como *up flow anaerobic sludge blanket* (UASB). Existen ventajas en el proceso anaerobio como requerimientos bajos de energía, menor producción de lodos activados y producción de biogás (Shareefdeen y Singh, 2005).

En las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) que cuentan con reactores anaerobios, las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo producen biogás, una mezcla de metano (CH₄), nitrógeno (N₂) y dióxido de carbono (CO₂) (Noyola et al., 1988), a los que acompañan otros gases en concentraciones mucho menores, como el sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Noyola et al., 2006). La producción de biogás en las plantas suele ser insuficiente para la producción de energía eléctrica ya que se requeriría en la planta capacidades de tratamiento de flujos de agua residual mayores a 500 L/s para justificar la inversión necesaria (Noyola et al., 2016).

El H₂S representa un riesgo para la salud de los trabajadores de estas plantas, provoca daños a las instalaciones por ser un gas corrosivo en presencia de oxígeno, y presenta mal olor que provoca molestias a la comunidad circundante. Por su parte, el metano es un potente gas de efecto invernadero con un efecto 34 veces mayor que el CO₂ (Myhre et al., 2013), que en las plantas anaerobias tratadoras de agua residual de tipo municipal se colecta aproximadamente el 30-50% del gas metano producido. El resto permanece disuelto en la fase acuosa, sumando contaminantes a la atmósfera una vez fuera del reactor (Noyola et al., 2016).

Una forma de evitar la emisión a la atmósfera del metano disuelto en los efluentes anaerobios, es desorber el gas para luego darle un tratamiento adecuado, siendo la biofiltración una opción. En biofiltros escala laboratorio se ha investigado la influencia del H₂S en la oxidación del metano, reacción que puede verse inhibida por la disminución de pH del medio filtrante, ya que la oxidación de H₂S genera sulfatos y ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Barzgar et al., 2017). Del mismo modo, en investigaciones realizadas en un biofiltro escala laboratorio para el tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales, se ha

encontrado inhibición de microorganismos metanótrofos a partir de 750 ppm_v de H₂S (Ruiz Ruiz, 2017). En otro estudio se encontró que la velocidad de degradación de metano disminuye a partir de 200 ppm_v de H₂S en la corriente gaseosa a tratar (Sanchez Rodriguez, 2015).

Como ya se ha mencionado, en la biofiltración de emisiones gaseosas, la presencia de H₂S en el biogás provoca interferencias en el proceso de oxidación del CH₄ siendo uno de los mayores retos la inhibición de metanótrofos por medio de la presencia de H₂S en el biogás (Zhang et al., 2016). En un biofiltro escala piloto, la degradación del metano se vio disminuida en una concentración a 500 ppm_v de H₂S (Huete Chevez, 2017).

Existen técnicas de biología molecular que permiten la identificación de la comunidad microbiana y sus cambios involucrados en el tiempo y espacio de muestreo. Es importante conocer los cambios de las poblaciones microbianas ya que son las responsables de realizar la remoción de H₂S y CH₄. Con base en un mayor conocimiento de este proceso de biorremediación y de este modo identificar los límites de la oxidación de metano en presencia de H₂S en una escala piloto o industrial

Este proyecto tiene como objetivo estudiar la dinámica de las comunidades microbianas en un biofiltro con composta a escala piloto para la oxidación de CH₄ y H₂S, previamente desorbidos de agua residual municipal tratada por vía anaerobia, y relacionarla con la eficiencia de remoción de CH₄.

2 Marco teórico

2.1 Biotecnología involucrada en el tratamiento de emisiones gaseosas

Existen diversos procesos para realizar el tratamiento de gases contaminantes, como los biolavadores, los biofiltros percoladores y los biofiltros. Estos sistemas pueden tratar compuestos orgánicos volátiles (como metanol, aldehídos, acetatos, cetonas y algunos compuestos aromáticos) y compuestos inorgánicos (como sulfuro de hidrógeno y amoniaco). Con el transcurso del tiempo estos sistemas biológicos fueron amplificando su campo de acción con hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular como el metano y pentano, los cuales se consideran difíciles de degradar (Shareefdeen y Singh, 2005).

Tomando en cuenta la tasa de flujo del gas y la concentración de los contaminantes, las principales ventajas de los procesos biológicos son:

- Se pueden realizar en temperaturas entre 10-40°C y presión atmosférica (condiciones "suaves")
- Procesos de bajo costo, simples para operar y amigables con el ambiente,

Para poder utilizar sistemas biológicos, se recomienda un flujo de aire de $\sim(400-100\ 000)$ m³/h y concentración de contaminante de $\sim(0.1-7)$ g/m³ (Shareefdeen y Singh, 2005) (Figura 2.1). Otros factores que son importantes tomar en cuenta en este tipo de procesos son la temperatura, el contenido de oxígeno del gas residual, composición de la corriente gaseosa, contenido de agua, solubilidad del sustrato, programa de operación, servicios y requisitos de mantenimiento, entre otros. También se deben evaluar los costos de inversión y mantenimiento y los posibles impactos ambientales secundarios.

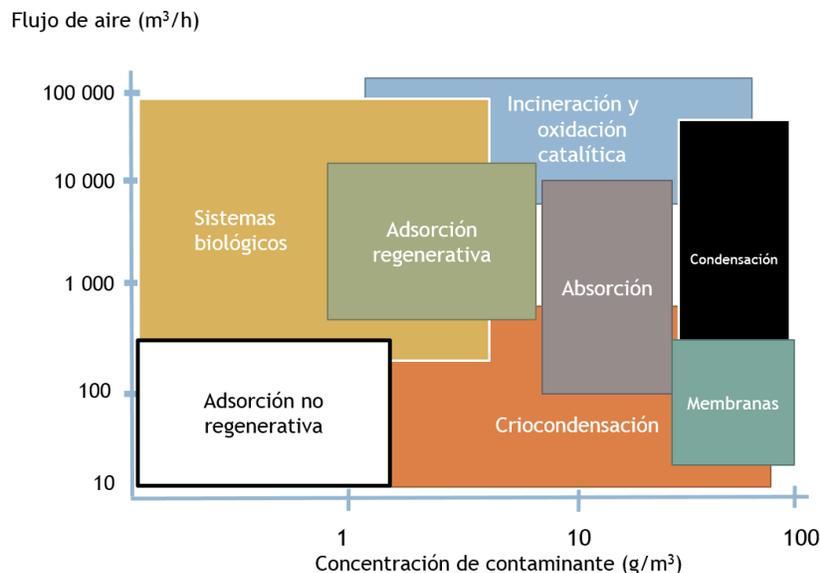


Figura 2.1 Diferentes tecnologías para tratamiento de emisiones gaseosas

2.1.1 Biofiltros

La mezcla de gases a tratar pasa a través de un lecho relleno húmedo donde habitan microorganismos en una biopelícula que consumirán el contaminante (Figura 2.2); la biopelícula depende de la densidad microbiana y de las condiciones del medio (temperatura, disponibilidad de nutrientes, humedad y pH). La diferencia entre los biofiltros y los biofiltros percoladores es la fase que pasa por el empaque en los biofiltros percoladores (mezcla de fase líquida y gaseosa) y en los biofiltros (fase gaseosa); el relleno en los biofiltros percoladores es de material inorgánico o plásticos inertes, mientras que en los biofiltros puede también ser de naturaleza orgánica (Delhoménie y Heitz, 2005).

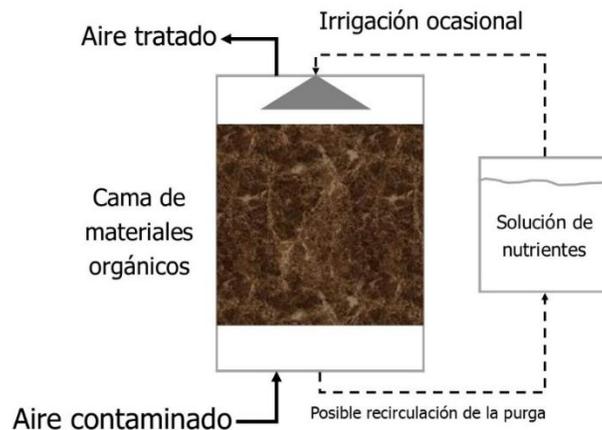


Figura 2.2. Esquema de un biofiltro.

En la biofiltración, la capacidad de degradación de microorganismos convierte los contaminantes a compuestos menos perjudiciales al ambiente, siendo ejemplo el metano y el sulfuro de hidrógeno convertidos a dióxido de carbono y iones sulfato, respectivamente (Nikiema et al., 2007). Asimismo, este proceso representa un método de eliminación de gases de menor costo comparado con otros procesos físicos, químicos o biológicos porque es un método que puede usarse en temperatura y presión ambientales (Delhoménie y Heitz, 2005; Noyola et al., 2006).

El empaque del biofiltro puede ser de materiales sintéticos o naturales, siendo la composta, en forma general, un material que ofrece una adecuada remoción de metano y un bajo costo (Gómez-Borraz, 2017; Ruiz Ruiz, 2017).

Dentro de las biotecnologías reportadas para la eliminación de metano se encuentra el uso de biofiltros y biofiltros de lecho escurrido, descartando los biolavadores por la baja solubilidad en agua de este gas. Para fines de este trabajo en la Tabla 2.1 se presentan algunos parámetros de rendimiento obtenidos en biofiltros con empaques de composta y con ciertas variaciones.

Para mejor comprensión de la Tabla 2.1 se presenta la definición de los parámetros usados comúnmente en la evaluación del funcionamiento de biofiltros:

- TRLV (Tiempo de retención de lecho vacío (min)): Está definido como el volumen de biofiltro sin empaque (vacío) dividido por el caudal de aire que ingresa al biofiltro, es decir es el tiempo en el que la corriente gaseosa permanece dentro del bioreactor.
- Eficiencia de remoción (%): Se define como la fracción del contaminante eliminado por el biofiltro en relación con lo alimentado (ecuación x).
- Carga másica de entrada ($\text{gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$): Representa la masa de contaminante que ingresa al biofiltro por unidad de volumen de lecho vacío, por unidad de tiempo.
- Capacidad de eliminación ($\text{gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$): Es la masa de contaminante degradada por unidad de volumen de lecho vacío por unidad de tiempo.

Tabla 2.1 Ejemplos de sistemas de tratamiento para corrientes gaseosas con metano

Empaque	TRLV (min)	Flujo	Concentración inicial (% v/v)	Eficiencia de remoción (%)	Carga másica de entrada (gCH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	Capacidad de eliminación	Presencia de H ₂ S (ppm _v)	Autores
Corteza de pino compostada	20-400	0.05-1.01 L/min	0.1-2.5	ER > 70 (Para TRLVs > 30 min)	0.1-49.8	NM	No	(Du Plessis et al., 2003)
Composta a partir de residuos municipales	100	0.02 L/min	9-10	100	43.5	1036 g m ⁻² d ⁻¹	No	(Pawłowska et al., 2011)
Composta	18	0.06 L/min	4	100.0 17.0	61	61 g m ⁻³ h ⁻¹ 9 g m ⁻³ h ⁻¹	500 750	(Sanchez Rodriguez, 2015)
Composta con restos de madera y perlita	4.4	1.34 L/min	0.01-2.40	76.5	39.2	30.1 g m ⁻³ h ⁻¹	No reportado	(Barcón et al., 2015)
Composta con materiales inorgánicos (esponja de poliuretano, vermiculita o Biobob)	42.8 29.5	variable	0.17-1.2	Mayor a 90	11-13	10.0-11.7 g m ⁻³ h ⁻¹	No	(Brandt et al., 2016)
Composta	20	0.1 L/min	~2	90	41.1	36.6 g m ⁻³ h ⁻¹	No	(Lebrero et al., 2016)
Composta de poda vegetal	23	15 L/min	2.7-4.3	75	57	40 g m ⁻³ h ⁻¹	100-800	(Huete et al., 2018)
Composta de poda vegetal	19	62 mL/min	<4.5%	<95	61-65	62 g m ⁻³ h ⁻¹ 37-68 g m ⁻³ h ⁻¹ 48-66 g m ⁻³ h ⁻¹	250 500 750	(Ruiz Ruiz, 2017)
Mezcla de turba y astillas de madera	NM	2.75 m ³ /min	7.0	70	91.4	64 g m ⁻³ h ⁻¹	No	(Turgeon et al., 2011)

Compostada: Mezclada con residuos orgánicos. **Perlita:** Vidrio volcánico amorfo expandible cuando recibe calor. **Vermiculita:** mineral formado por silicatos de hierro o magnesio. **Biobob:** Tipo de esponja doméstica comercial. **TRLV:** Tiempo de retención de lecho vacío. **NM:** No mencionado

2.2 Microorganismos participantes en la oxidación de metano y sulfuro de hidrógeno

Metanótrofos. - Estos microorganismos (Archea y Bacteria) oxidan el metano para obtener energía y asimilan el carbono como parte del material celular del microorganismo. Este tipo de proceso puede ocurrir tanto en ambientes anaerobios (teniendo como aceptor de electrones el ion nitrato (NO_3^-)) o en ambientes aerobios (Madigan et al., 2015).

El proceso de oxidación del metano comienza con la conversión a metanol a partir del metano por medio de la enzima metano monooxigenasa (MMO) (Figura 2.3). De esta enzima existen dos tipos dependiendo del tipo de metanótrofo (Grupo I y II, como se presenta más adelante): la particulada o asociada a la membrana citoplasmática (pMMO) y la soluble (sMMO). La enzima pMMO se encuentra en la membrana de la célula en condiciones suficientes de cobre, mientras que la enzima sMMO se presenta en el citoplasma y se expresa en condiciones limitadas de cobre (Bedard y Knowles, 1989; Lee, 2016). Se sabe que la enzima sMMO tiene un sitio activo Fe-Fe, mientras que en la enzima pMMO tiene un centro catalítico de cobre (Ross y Rosenzweig, 2016).

Con el tiempo se han planteado elementos básicos sobre la taxonomía asociados con características de los metanótrofos que incluyen: organización de la membrana intracitoplasmática, contenido de sustancia proteica específica de su DNA, vía de consumo de carbono (Figura 2.3) y la morfología microbiana tomando como referencia la contribución de R. Whittenburg y sus colaboradores quienes realizaron una subdivisión de microorganismos aislados en 1970 (Majdinasab y Yuan, 2017):

Grupo I:

- Tipo I: Microorganismos que procesan el intermediario aldehído por la vía de Ribulosa Monofosfato (RuMP) (Figura 2.4) con arreglos membranales cocoides. Se sabe que éstos pertenecen a la clase γ -proteobacteria. Ejemplos de este tipo son del género *Methylomonas* y *Methylobacter*.
- Tipo X: los cuales poseen bajos niveles de enzimas de la vía de la serina teniendo como base la ruta RuMP (Hanson et al., 1996; Madigan et al., 2015). En este grupo se encuentran los metanótrofos similares a *Methylococcus capsulatus*.

Grupo II:

- Tipo II: Microorganismos que siguen la ruta de serina (Figura 2.5) y tienen arreglos membranales del tipo vibrio. Además, pertenecen a la clase α -Proteobacteria. Ejemplo de estos microorganismos son de los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*.

- Tipo III: Del género *Methylocapsa*, se caracteriza por tener una estructura de la membrana intracitoplasmática empaquetada en paralelo sólo de un lado de la membrana celular. No expresa sMMO. (Dedysh et al., 2002).

Grupo III o Tipo IV: Este grupo incluye a los Verrucomicrobia (Kalyuzhnaya et al., 2015).

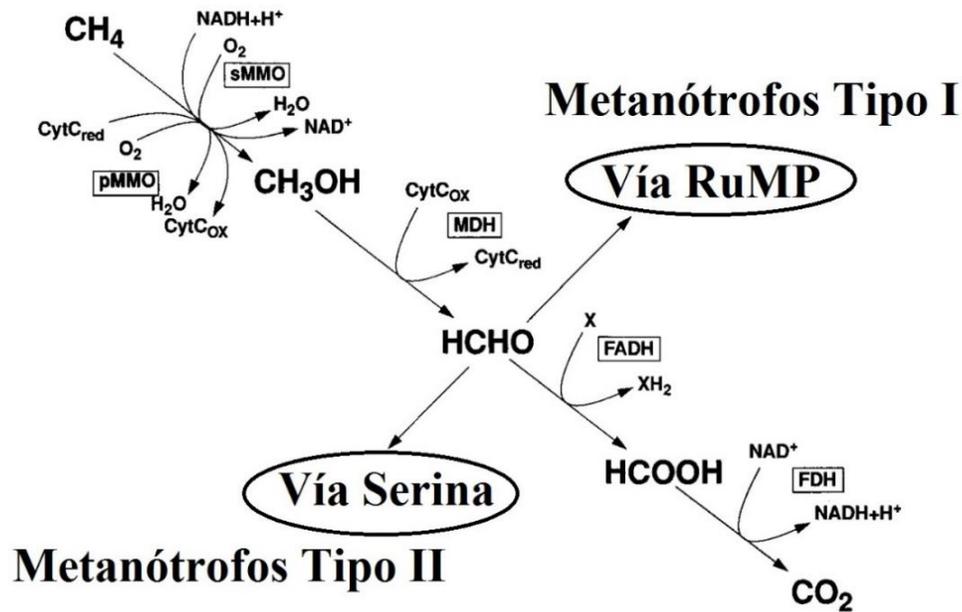


Figura 2.3. Vías de oxidación del metano y asimilación del formaldehído. Abreviaturas: CytC, citocromo c; FADH, formaldehído deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa; pMMO, metano monooxigenasa particulada; sMMO, metano monooxigenasa soluble. Tomado de (Hanson et al., 1996).

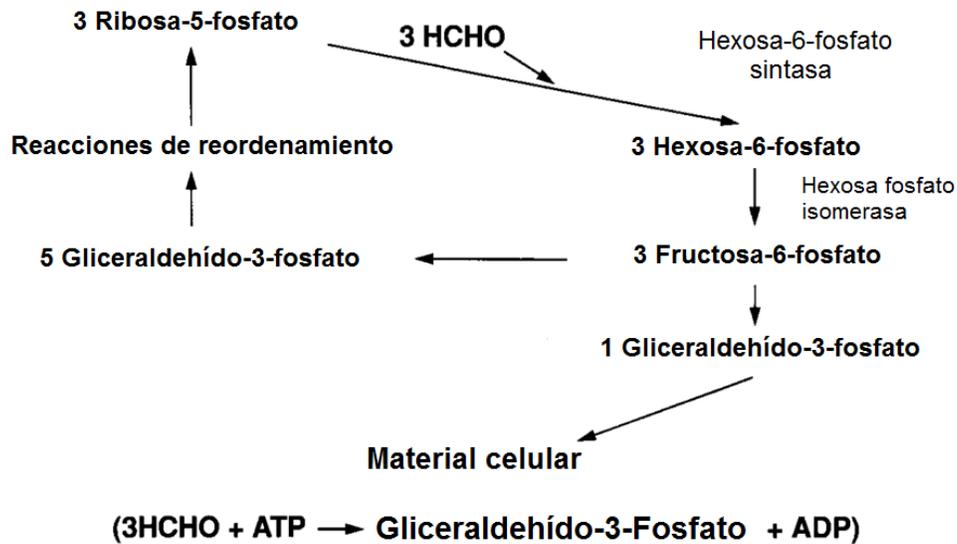


Figura 2.4. Vía RuMP para la fijación de formaldehído. Tomado de (Hanson et al., 1996).

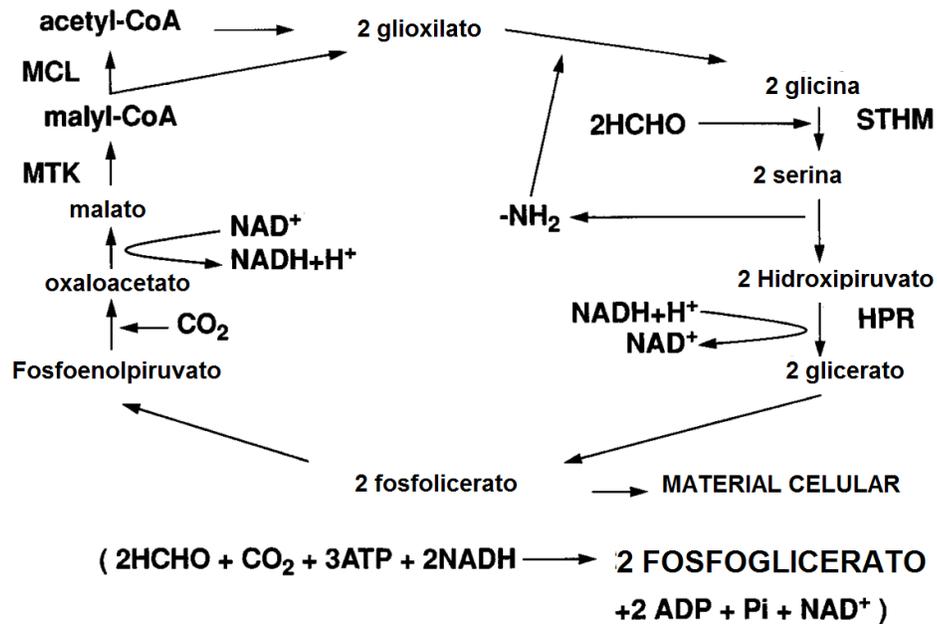


Figura 2.5. Vía de la serina para fijación de formaldehído. Únicas reacciones catalizadas por hidroximetil serina transferasa (STHM), hidroxipiruvato reductasa (HPR), malato tioquinasa (MTK) y malil coenzima A liasa (MCL) son identificadas. Tomado de (Hanson et al., 1996).

2.2.2. Sulfo-oxidantes. - Estos microorganismos oxidan compuestos reducidos de azufre (donadores de electrones) para proveerse de energía, tienen, por lo regular, como producto final iones sulfato. Los compuestos de azufre que comúnmente forman parte de la generación de energía son H₂S, S⁰ y S₂O₃²⁻. De lo anterior, se ha demostrado que existen al menos 3 rutas de oxidación del azufre (Figura 2.6). En general, las bacterias sulfooxidantes usan oxígeno molecular (O₂) como aceptor final de electrones, sin embargo, en ausencia, algunas especies como *Thiobacillus denitrificans* ocupan iones nitrato (NO₃⁻).

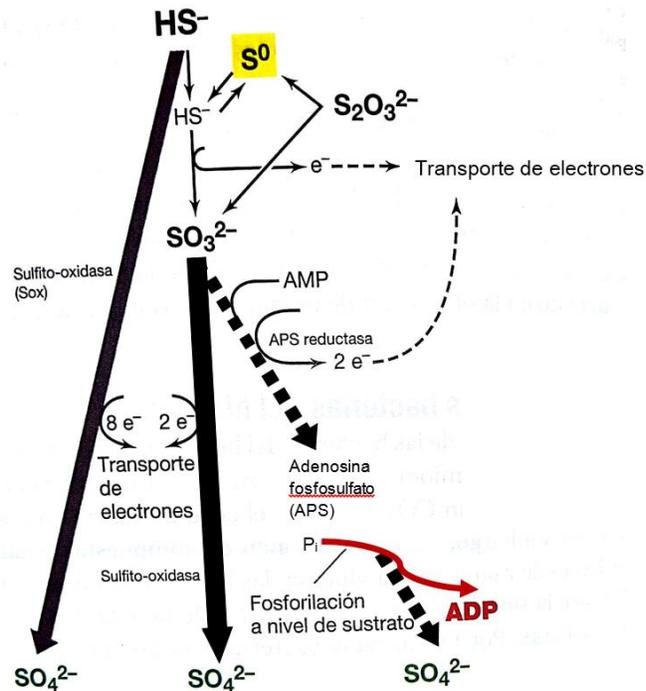


Figura 2.6 Oxidación de compuestos reducidos de azufre por quimiolitótrofos del azufre. Etapas en la oxidación de diferentes compuestos reducidos del azufre. Se conocen tres rutas diferentes. Compuestos involucrados: HS^- : sulfuro; S^0 : azufre; $S_2O_3^{2-}$: tiosulfato; SO_3^{2-} : sulfito y SO_4^{2-} : sulfato. Tomado de (Madigan et al., 2015).

Como se ve en la figura anterior, puede existir una ruta donde la oxidación es directa de H_2S a SO_4^{2-} , la cual se conoce como *sistema Sox*; otros quimiolitótrofos oxidan sulfito a sulfato por medio de la actividad inversa de la *fosfosulfato de adenosina-reductasa* (enzima esencial en las bacterias reductoras de sulfato); mientras que otros utilizan la ruta de la enzima *sulfito oxidasa*, la cual es la ruta que más ocupan estos microorganismos.

Las bacterias son ampliamente usadas en la biofiltración de gases desorbidos debido a su capacidad de sobrevivir en intervalos de pH amplios y su alta resistencia a sustancias tóxicas (Noyola et al., 2006) y entre los microorganismos más utilizados son *Chlorobium limicola*, *Xanthomonas sp. chain DY44*, *Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus ferrooxidans*.

2.3 Factores que influyen en la eficiencia de remoción del metano en biofiltros

Se han identificado las características principales para la supervivencia y desarrollo de los metanótrofos en los biofiltros que a continuación se describen.

Humedad: Este factor es determinante debido a que es con base en agua que se transportan los nutrientes a los microorganismos, incluido el metano, que debe pasar a fase disuelta. Esto debe mantenerse en un intervalo de 15-32% para permitir el flujo de metano y oxígeno sin que haya limitaciones (Boeckx et al., 1996).

Contenido bajo de humedad promueve la formación de canales de flujo preferenciales en el seno del biofiltro y reduce la actividad metabólica y absorción de los gases contaminantes. El crecimiento microbiano ocurre en valores de A_w de agua entre 0.85 y 0.99 (Morales, 1999). Para valores de 40% y 60% de humedad en materiales de composta se tienen valores de A_w correspondientes al intervalo de 0.97 y 0.997, los cuales se han reportado como óptimos para el metabolismo bacteriano (Morales et al., 2003). De acuerdo con Huete et al, 2008, porcentajes de humedad en la composta de 40% a 65% han sido considerados como adecuados para la operación de biofiltros.

Temperatura y pH:

Se reportan una temperatura de cultivo desde 20°C a 45°C en pH neutro, así como valores entre 25°C-30°C como intervalo de temperatura de actividad óptima en biofiltros de escala laboratorio (Gómez-Borraz, 2017); existe el reporte de aislamiento de metanótrofos en ambientes con condiciones extremas (Trotsenko y Khmelenina, 2002). Se conoce que la disminución de la temperatura en ambientes de metanótrofos (de 20°C a 10°C) causa una inhibición reversible que depende del tiempo de exposición a la menor temperatura (Gómez-Borraz et al., 2017).

Por otra parte, se han reportado que los metanótrofos tienen un crecimiento óptimo en valores de pH entre 6.6 y 7.0. Sin embargo, metanótrofos en suelo se han observado que a partir del valor de pH 6.3 la capacidad de eliminación de CH_4 se ve disminuida y llegando a valores entre 5.6 y 5.1 la oxidación no se produce (Majdinasab y Yuan, 2017).

Nutrientes

Es importante la adición de nutrientes necesarios al crecimiento de metanótrofos como nitratos (NO_3), fosfatos (PO_4^{3-}), metales traza (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Mo^{6+}), aun teniendo como sustrato principal el CH_4 y así tener un mayor consumo de este gas orgánico (Albanna et al., 2007).

Existe diversa información respecto al efecto que tiene compuestos de nitrógeno como iones amonio (NH_4^+) e hidroxilamina, los cuales son posibles inhibidores en el metabolismo metanótrofo. Fundamentos que respaldan esto son que el amonio tiene capacidad de ser oxidado por pMMO y sMMO, siendo un sustrato que entra en competencia en esta vía metabólica (Hanson et al., 1996); la hidroxilamina tiene efecto tóxico y mutagénico en las bacterias metanótrofas y el nitrito reduce en forma considerable la actividad metanótrofa (He et al., 2017).

El cobre tiene una influencia en la expresión de la naturaleza de la monooxigenasa, y en la morfología de la célula. En aquellos metanótrofos que expresan ambas formas de MMO-soluble y particulada- el cobre es un factor clave en la regulación de la expresión de los genes que codifican sMMO y pMMO, en particular para la segunda, así como la actividad de estas enzimas (Bedard y Knowles, 1989; Farhan Ul Haque et al., 2017). Estudios realizados en reactores demostraron que un aumento en la concentración de Cu^{2+} de 0.05 a 25 mM aumentó la q_{max} y K_s de las comunidades enriquecidas por un factor aproximadamente de 3. Además, las concentraciones altas de Cu^{2+} apoyaron coeficientes de diversidad más bajos y aparentemente promovieron el crecimiento de metanótrofos más adaptados como *Methylomonas*. Sin embargo, no se registró un efecto claro de la concentración de CH_4 sobre la estructura de la comunidad o sobre la cinética de biodegradación de las comunidades enriquecidas (Cantera et al., 2016).

Disponibilidad del O_2

En un estudio realizado por Hutton y ZoBell (1949), utilizando O_2 puro, se obtuvo un potencial máximo de oxidación de CH_4 en concentraciones de O_2 entre 10 y 40%; fuera de este intervalo se presenta la disminución del potencial de oxidación del CH_4 por lo que es importante mantener una suficiente disponibilidad de O_2 en el medio de reacción donde habiten los metanótrofos. Además, en valores de temperatura por encima de los 30°C se observó una menor remoción de metano por una menor solubilidad tanto del oxígeno como del metano (Gómez-Borraz, 2017).

2.4 Intervención del sulfuro de hidrógeno en la oxidación del metano

Un reto importante en la biofiltración del biogás es la inhibición de metanótrofos por medio de la presencia de H_2S en el biogás (Zhang et al., 2016). Se han hecho estudios particulares con ciertas especies de microorganismos y se ha encontrado que para *Methylocystis sp.* se afecta la capacidad de oxidación del metano al verse disminuida por la presencia de H_2S en una concentración de 0.025% (250 ppm_v), mientras que *M. album* se vio afectado hasta 0.050% (500 ppm_v) (Cáceres et al., 2014).

En investigaciones realizadas en el Instituto de Ingeniería de la UNAM se ha encontrado que el crecimiento de un cultivo metanótrofo se ve afectado a partir de 750 ppm_v de H_2S ; en un biofiltro escala laboratorio, la velocidad de degradación de metano y la resultante producción de CO_2 disminuye a partir de 200 ppm_v (Sanchez Rodriguez, 2015).

En otras pruebas con concentraciones mayores al 20% de metano, el H_2S no inhibe la oxidación de metano en residuos sólidos municipales, pero en bajas concentraciones (5%) sí se observó un efecto inhibitorio (Estrada et al., 2014). Asimismo, los metanótrofos tipo II presentaron mayor resistencia y abundancia que los tipo I, por ende, una mayor tolerancia al H_2S (Long et al., 2013).

La inhibición de la oxidación de metano por parte de la presencia de H_2S se ha determinado que ha sido por la hidrofobicidad del metano y la solubilidad en agua del H_2S , siendo que la comunidad microbiana se encuentra inmersa en la fase acuosa, por lo que es necesaria la transferencia de los compuestos gaseosos a la fase acuosa para que puedan ser consumidos por los microorganismos (Cáceres et al., 2014; Estrada et al., 2014). Por otro lado, también es necesario investigar cómo es que la comunidad microbiana cambia ante la variación de concentraciones de H_2S . Se han realizado estudios de la interacción entre organismos metanótrofos y sulfooxidantes en el monitoreo de biofiltros a escala laboratorio en el control de emisiones generadas en el tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales y se observó que el sulfuro de hidrógeno tiene un efecto negativo en la oxidación del metano, observándose este efecto a partir de 750 ppm_v. Del mismo modo, utilizando la técnica DGGE, Ruiz Ruiz (2017) no detectó la presencia de metanótrofos a partir de 750 ppm_v de H_2S .

Esta inhibición de oxidación de CH_4 es necesaria investigarla en escala piloto y determinar cómo la comunidad microbiana cambia para tener óptimos rendimientos de eliminación de biogás en presencia de H_2S .

2.5 Herramientas de biología molecular para el estudio de comunidades microbianas en sistemas de biofiltros.

Existen métodos de ecología microbiana los cuales permiten el estudio de las comunidades microbianas. Es importante este tipo de métodos debido a que no es necesario partir de un cultivo microbiano, el cual no se asemejaría a lo que se encuentre en el seno del biorreactor.

Los métodos de rastreo de huella molecular (*molecular fingerprinting methods*) se usan para la caracterización de organismos en muestras complejas de tal manera que se obtienen datos multivariados y multidimensionales como los patrones de bandas resultantes de la separación electroforética de proteínas o fragmentos de ácido nucleico. El objetivo principal en las técnicas de rastreo de huella molecular es agrupar los datos en grupos significativos. Esta operación por lo general se indica como reconocimiento de patrones. Para este reconocimiento, se utilizan algoritmos que pueden ser específicos para un campo de aplicación, y otros son independientes de la naturaleza de los datos tratados. La comprensión de los algoritmos de tratamiento de datos es fundamental para una comprensión exhaustiva de los resultados y sus aplicaciones prácticas. (Di Natale y Martinelli, 2019; Dijkshoorn et al., 2001).

Se utilizan varios métodos para el rastreo de huella molecular: electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE, por sus siglas en inglés), polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (RFLP, por sus siglas en inglés) y polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP, por sus siglas en inglés) (Campbell, 2017). En la Tabla 2.2, se presentan ejemplos de investigación que utilizaron las técnicas anteriormente mencionadas.

Tabla 2.2. Técnicas de Biología Molecular de primer acercamiento usadas en análisis de ecología microbiana en biofiltros.

Técnica	¿En qué se basa?	Investigación con biofiltros usando la técnica correspondiente	Ventajas	Desventajas
<p>DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante)</p>	<p>Diferencias en longitud y secuencia amplificando la secuencia específica del gen de la subunidad 16S RNAr. La separación de bandas se da por las diferencias de concentración de sustancias desnaturalizantes de DNA a lo largo del gel.</p>	<p>(Ruiz Ruiz, 2017)</p>	<p>1) Permite la separación química de secuencias de DNA clave sin necesidad de secuenciar toda el DNA contenido en la muestra. 2) Aplicable para fragmentos de DNA de cientos de pares de bases 3) Permite comparar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales. 4) Se puede recuperar el DNA de las bandas de los perfiles del gel para ser secuenciado.</p>	<p>1) Es posible que ocurra la co-migración de fragmentos de DNA, es decir que dos secuencias diferentes de DNA compartan una misma posición en el gel. 2) Equipo costoso y sustancias altamente tóxicas 3) No podrán detectarse microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad. 4) Debido a la microheterogeneidad en las secuencias ribosomales es posible que un microorganismo esté representado por varias bandas.</p>
<p>TGGE (Electroforesis en gel con gradiente de temperatura)</p>	<p>Diferencias en longitud y secuencia amplificando la secuencia específica del gen de la subunidad</p>	<p>(Purswani et al., 2014)</p>	<p>1) Se puede analizar RNA de cadena simple y proteínas 2) Técnica altamente sensible</p>	<p>1) Dificultades técnicas para mantener estables las condiciones experimentales 2) No podrán detectarse microorganismos que constituyan menos del 1% de la comunidad.</p>

	16S RNAr, pero la separación se da por diferencias de temperatura a lo largo del gel.			3) Debido a la microheterogeneidad en las secuencias ribosomales es posible que un microorganismo esté representado por varias bandas.
SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla)	Rastreo de mutaciones usada en el diagnóstico molecular basada en la migración electroforética del DNA.	(Mi et al., 2008)	1) Se puede distinguir entre dos secuencias de DNA muy similares 2) Uso preferible en inserciones o deleciones pequeñas	1) Detección de mutación sin aportar información acerca de la mutación concreta presente en el DNA. 2) Si se trata de fragmentos largos de DNA (> 200 pb), el método se vuelve insensible a algunas mutaciones
T-RFLP (Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal)	Mide diversidad de genes individuales. Refleja variantes que difieren en la secuencia del DNA según las diferencias en los sitios de corte de las enzimas de restricción.	(Maestre et al., 2009)	1) Altamente reproducible utilizando la misma combinación enzima-sonda 2) Proporciona marcadores codominantes	1) Para detectar diferencias entre poblaciones, es necesario disponer de numerosas sondas, lo que se traduce en mayor inversión de tiempo y dinero. 2) Proceso largo y laborioso 3) Se requiere grandes cantidades de DNA (10 µg por ensayo) y de buena calidad

Para el presente trabajo se eligió la técnica de PCR-DGGE del gen 16S ribosomal porque permite realizar evaluaciones de varias muestras de diferentes posiciones del biofiltro y tomadas en tiempos diferentes y después poder escindir las bandas de los geles y mandar a secuenciar.

Una vez obtenido el patrón de bandeo de los geles, se requiere un método analítico para interpretar los resultados. El método analítico más utilizado (análisis de *clúster* o patrones) implica la comparación por pares de bandas, seguido de su agrupación en función de la similitud y su posterior representación en una estructura similar a un árbol denominada dendrograma. (Dijkshoorn et al., 2001). Así, es posible realizar un análisis comparativo de todos los patrones de bandas generados por distintas muestras, además como determinar la similitud o distancia existentes entre los distintos perfiles de DGGE. Este tipo de análisis resulta muy conveniente cuando se estudia la estructura y dinámica de las comunidades microbianas. En general, el software de estos programas hace cálculos de matrices usando el coeficiente de correlación de Pearson, o utiliza los coeficientes de Dice o Jaccard. Por otra parte, los dendogramas se construyen a partir de algoritmos como UPGMA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*) o *Neighbor Joining*. En cuanto al análisis de los perfiles de DGGE de comunidades microbianas, es posible calcular los índices matemáticos de riqueza, diversidad y dominancia (Fernández Suárez y Le Borgne, 1987).

El análisis UPGMA es un método de agrupamiento (*clustering*) para datos binarios mediante el cual se utilizan similitudes por pares de patrones de DGGE para inferir un dendrograma que representa estas distancias en forma gráfica. Una matriz binaria se traduce en una matriz de distancia que representa las similitudes de los patrones DGGE utilizando un coeficiente de similitud. Varios autores han utilizado diferentes coeficientes de similitud, en este trabajo utilizamos los coeficientes de Dice (Schäfer y Muyzer, 2001).

3 Justificación, Objetivos e Hipótesis

3.1 Justificación de la investigación y planteamiento del problema

En la práctica de la ingeniería ambiental se conoce, hasta ciertos detalles, la forma de diseñar y operar los procesos de biorremediación desde la perspectiva entrada – salida (caja negra). Sin embargo, es necesaria la investigación a mayor profundidad desde una perspectiva biológica para mejorar los rendimientos de los procesos de biorremediación por la interrelación que existe entre los factores fisicoquímicos y biológicos.

En los reactores anaerobios existen emisiones gaseosas contaminantes por lo que una opción para su control es el uso de la biofiltración. En este tipo de sistemas se puede aprovechar la capacidad de degradación de microorganismos y convertir esos contaminantes a compuestos menos perjudiciales al ambiente. Un ejemplo es el metano y el sulfuro de hidrógeno que son convertidos a dióxido de carbono y iones sulfato, respectivamente (Nikiema et al., 2007), los cuales son menos perjudiciales al ambiente. Asimismo, para instalaciones de pequeño porte, este proceso representa un método de eliminación de gases de menor costo comparado con otros procesos físicos, químicos o biológicos porque es un método que puede usarse en temperatura y presión ambientales (Noyola et al., 2006)

Uno de los mayores retos en los sistemas de biofiltración en PTAR es la inhibición de metanótrofos por medio de la presencia de H_2S en el biogás (Zhang et al., 2016). En trabajos realizados en el Instituto de Ingeniería de la UNAM se ha investigado la interacción entre organismos metanótrofos y sulfooxidantes en el monitoreo de biofiltros para el control de emisiones generadas en el tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales. En biofiltros escala laboratorio, la velocidad de remoción de CH_4 asociada a la producción de CO_2 , se ve disminuida a partir de 200 ppm_v de H_2S , mientras que, a nivel de microcosmos, el crecimiento de los metanótrofos se ve limitado a partir de 750 ppm_v (Ruiz Ruiz, 2017; Sanchez Rodriguez, 2015).

Con base en lo anterior, es necesario profundizar en el estudio del efecto inhibitorio del H_2S en la oxidación del CH_4 y en la identificación de un equilibrio dinámico entre las diferentes comunidades de microorganismos metanótrofos y sulfooxidantes, en condiciones de una planta real. Con esta información se avanzará en la mejora de los métodos de biofiltración de emisiones gaseosas de las plantas tratadoras de agua residual municipal. El modelo idóneo para realizar esta investigación es una planta de escala piloto.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Estudiar la dinámica de las comunidades microbianas en un biofiltro con composta a escala piloto para la oxidación de CH_4 y H_2S desorbidos de agua residual municipal tratada por vía anaerobia y relacionarla con la eficiencia de remoción de CH_4 .

3.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la comunidad de metanótrofos y sulfooxidantes por medio de técnicas de rastreo de huella molecular en un biofiltro a escala piloto, en el cual se variará la concentración de H_2S .
- Determinar el cambio cualitativo de la comunidad metanótrofa durante el proceso de biofiltración al variar la concentración de H_2S .
- Relacionar la eficiencia del biofiltro con la diversidad microbiana contenida en cuatro puntos en el material de empaque del biofiltro

3.3 Hipótesis

En un biofiltro empacado con composta, la disminución de la remoción de CH_4 cuando se ingresa una concentración de H_2S mayor a 500 ppm_v se relacionará con cambios temporales y espaciales en la comunidad microbiana, en particular con los microorganismos metanótrofos.

4 Metodología

4.1 Mención de los métodos utilizados

Este experimento tuvo 3 fases experimentales (Figura 4.1) en las cuales el parámetro principal que cambió entre fases fue la presencia de H₂S en la corriente gaseosa alimentada al biofiltro. Las fases 1 y 2 se realizaron en la planta de tratamiento de agua residual de la facultad de Ciencias Políticas y Sociales con las emisiones propias del sistema en dos temporadas y la Fase 3 se realizó en la azotea del edificio 5 del Instituto de Ingeniería con una mezcla controlada metano – aire al 2%. Para la Fase experimental 1, el biogás tuvo una concentración de H₂S entre 400 y 500 ppm_v; para la fase 2, la concentración de H₂S fue mayor a 500 ppm_v y la fase 3, el biogás no tuvo H₂S.

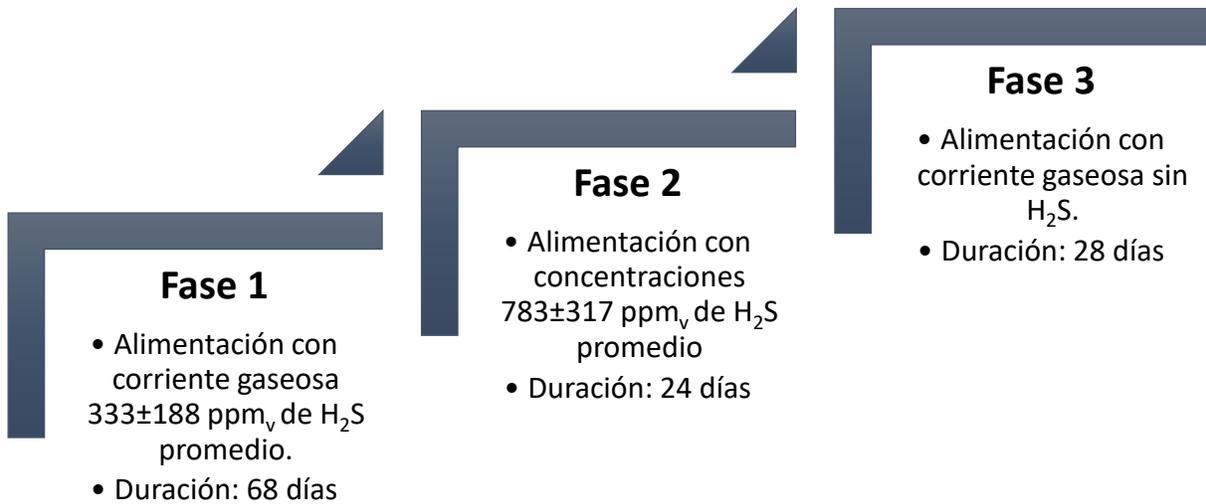


Figura 4.1. Etapas experimentales en las cuales variaron las concentraciones de H₂S.

Para las fases experimentales 1 y 2 (en la planta de tratamiento) se realizaron las siguientes actividades que se enuncian en el siguiente cuadro:

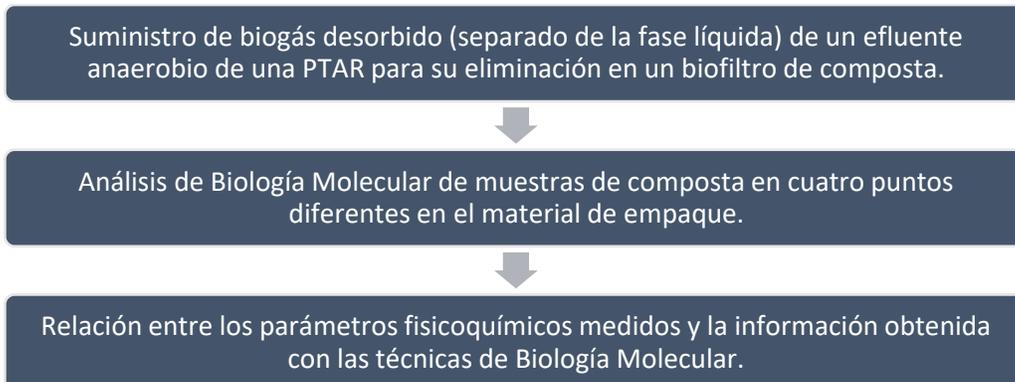


Figura 4.2. Descripción de cada actividad experimental para las fases experimentales 1 y 2.

Para la fase experimental 3 (en condiciones de laboratorio) se realizaron las siguientes actividades indicadas en el siguiente cuadro:

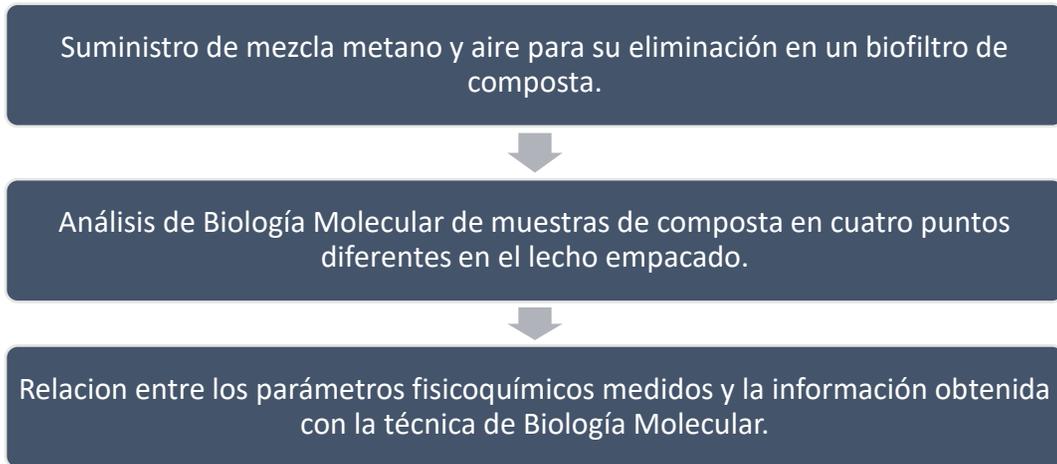


Figura 4.3. Descripción de cada actividad experimental para la fase experimental 3.

Para analizar el efecto del suministro de biogás en el sistema de biofiltración, se realizaron las mediciones en el sistema de biofiltración, y se muestran en la Figura 4.4. Las técnicas empleadas en este proyecto se describen en los siguientes párrafos:

Suministro de biogás en el biofiltro	Análisis de Biología Molecular	Relación parámetros fisicoquímicos e información obtenida con las técnicas de Biología Molecular
<ul style="list-style-type: none"> •Medición de concentraciones de CH₄ y H₂S que ingresó y salió del biofiltro •Determinación de porcentaje de remoción y capacidad de eliminación de CH₄ •Determinación de humedad de la composta •Determinación de pH de composta •Medición de temperatura en los puntos de muestreo del biofiltro •Medición de flujo de aire ingresado 	<ul style="list-style-type: none"> •Extracción de DNA de la muestra de composta <ul style="list-style-type: none"> • Determinación de cantidad y calidad de DNA genómico obtenido por espectroscopía •Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento 16S V3-V5 con grapa de GC •Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y corte de bandas •Reamplificación de bandas cortadas con cebadores normales. <ul style="list-style-type: none"> •Purificación de producto de PCR mediante electroforesis de agarosa •Envío a secuenciar por método Sanger 	<ul style="list-style-type: none"> •Análisis del perfil de bandas de DGGE, obteniendo coeficientes S_D y J. •Comparación de secuencias con la información en BLAST en la base 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archea). •https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi •Obtención de dendrogramas a partir del perfil de bandedo.

Figura 4.4. Técnicas utilizadas para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos.

4.1.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos.

Las mediciones de las concentraciones de CH₄ y H₂S a la entrada y a la salida del biofiltro se realizaron diariamente usando bolsas Tedlar (5 L de capacidad) para acumular volumen suficiente para su análisis, con el analizador de gases portátil Biogas 5000 (Landtec, EUA). Con ello se determinó la concentración de metano, sulfuro de hidrógeno, CO₂ y O₂ (Figura 4.5).



Figura 4.5 Sistema de medición de la mezcla de CH₄, H₂S y aire con bolsas Tedlar y el Biogás 5000.

El desempeño del biofiltro se determinó en términos de carga másica de entrada (CM), capacidad de eliminación (CE) y eficiencia de remoción (ER) para el CH₄ y H₂S.

$$CM = \frac{F * C_i}{V}$$

$$CE = \frac{F(C_i - C_f)}{V}$$

$$ER = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

Donde:

CM: Carga másica de entrada ($\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

CE: Capacidad de eliminación ($\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)

ER: Eficiencia de remoción (%)

F: Flujo del gas ($\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$)

C_i : Concentración de entrada del gas (g m^{-3})

C_f : Concentración de salida del gas (g m^{-3})

V: Volumen de lecho empacado del biofiltro (m^3)

Determinación de humedad de la composta: Se realizó al final de cada fase, mediante el método de gravimetría, Se colocaron 50 g de composta en una charola, se ingresó al horno a una temperatura de 110°C y se dejó ahí durante 24 horas. Posteriormente se realizó el cálculo de la cantidad de agua en la muestra de composta de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M_i - M_f)}{M_i} \times 100$$

Donde:

M_i : Masa de composta húmeda (g)

M_f : Masa de composta seca (g)

Determinación de pH de composta: A las muestras de término de cada fase, se les realizó una mezcla de composta y agua 1:1 la que se dejó en agitación durante 30 minutos. La masa de composta que se tomó fue 20 g. Después de este tiempo, se filtró el agua y se midió el pH con un potenciómetro (HANNA® instruments, USA).

4.2 Procedimiento general de la investigación experimental.

4.2.1 Planta de tratamiento de agua residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales. (Fase 1 y 2)

La planta de tratamiento se encuentra al costado noreste de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales (FCPyS) enfrente de Tienda UNAM (Figura 4.6). El caudal que trata esta planta es de 1.6 a 1.8 L/s. Para el tratamiento del agua tiene un reactor UASB, seguido de un sistema aerobio de tipo secuencial. Para el desarrollo del trabajo experimental, se instaló una columna alimentada por una fracción del efluente anaerobio, con el fin de

desorber el metano disuelto y el sulfuro de hidrógeno y así generar la corriente de alimentación al biofiltro empacado con composta.



Figura 4.6. Planta de tratamiento de agua residual de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales.

En la Figura 4.7 se observa el diagrama del proceso del tratamiento del caudal de agua tratada. En el punto 1 se ubica la salida del efluente (agua tratada) del reactor UASB. En el punto 2 se ubica la bomba centrífuga sumergible, para alimentar la columna de desorción con una fracción del efluente del reactor con un flujo de 15 L/min (punto 3; Figura 4.7), donde se realiza el proceso de separación de la fase gaseosa de la fase líquida (desorción). En el punto 4 se ubican las columnas para reducir el contenido de H_2S presente en la corriente desorbida; y en el punto 5, en el biofiltro, se realiza (Figura 4.7) el proceso de oxidación biológica del CH_4 y del H_2S por parte de los metanótrofos y sulfo-oxidantes.

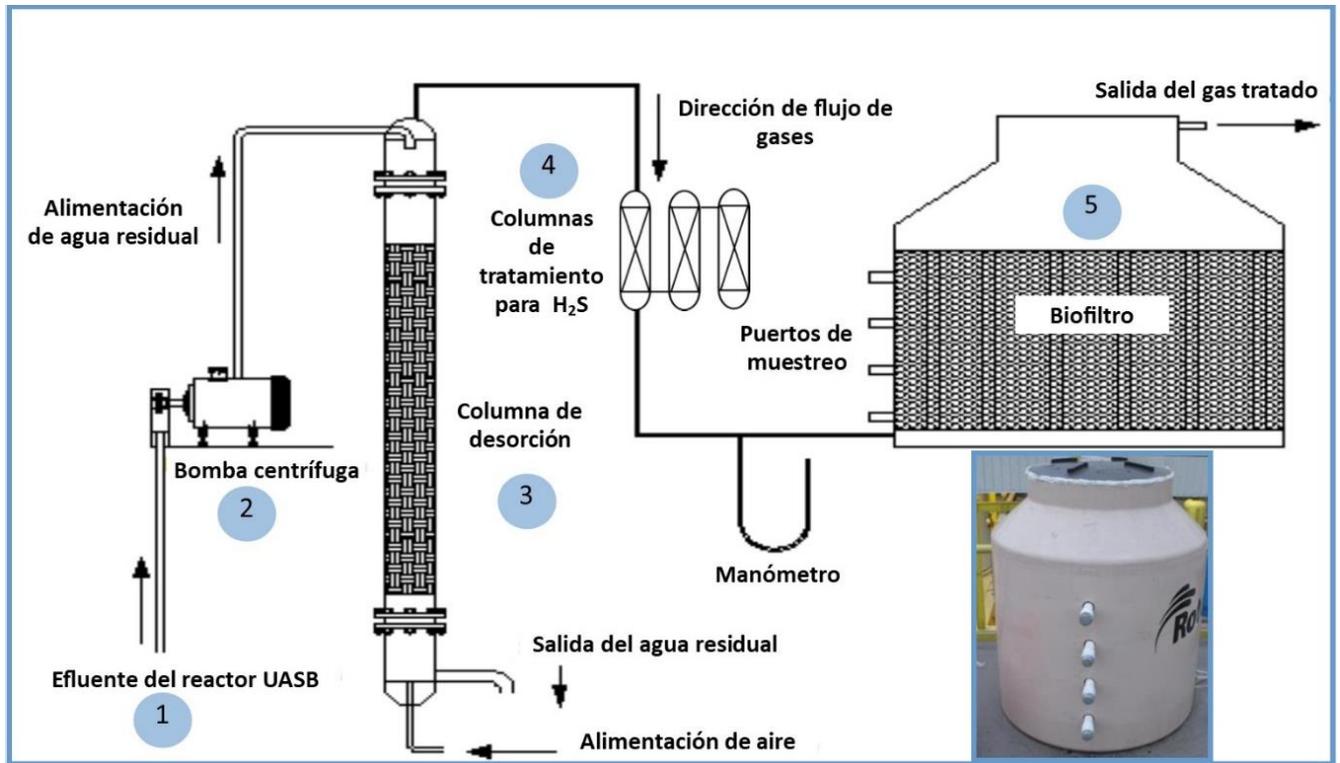


Figura 4.7. Diagrama del proceso de desorción del biogás del agua residual.

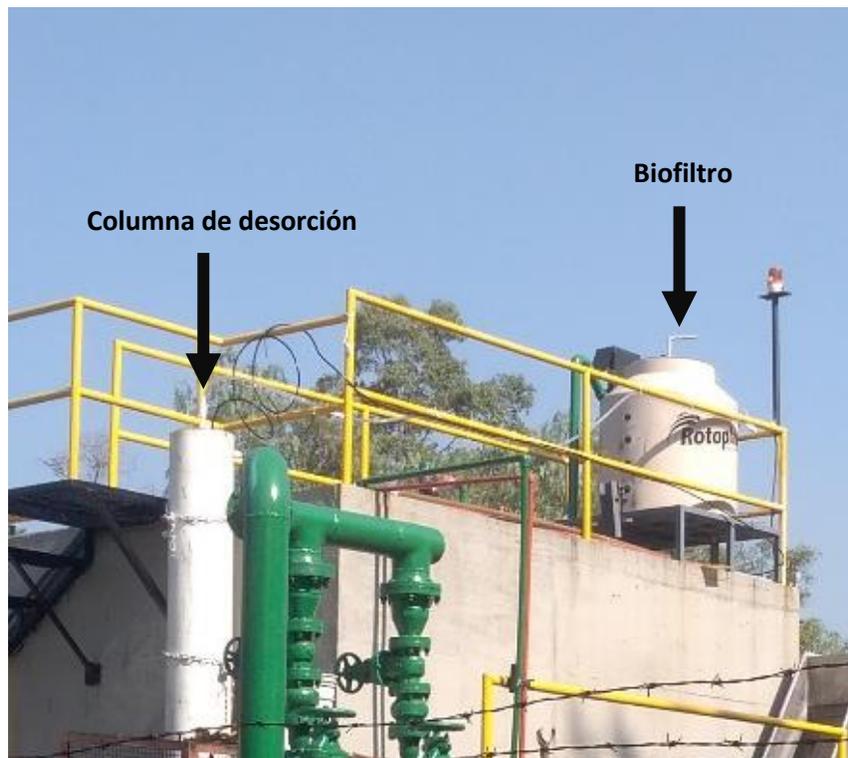


Figura 4.8. Vista lateral del biofiltro y columna de desorción ubicada en la PTAR. En la columna de desorción sucede el proceso de separación del biogás del agua tratada por medio de un flujo de aire.

4.2.2 Sistema de alimentación de aire en la fase experimental 3 (laboratorio).

Para la Fase Experimental 3, debido a fallas en el sistema eléctrico de la PTAR de FCPyS, se requirió mover el sistema de biofiltración a la azotea del edificio 5 del Instituto de Ingeniería. El nuevo sistema consistió en lo siguiente:

Un tanque de metano al 99.0%, del cual se reguló el flujo con una bomba peristáltica de potencia con un cabezal del número 18 para poder obtener la mezcla de metano entre 2.5-2.0%. En la Figura 4.9 se puede observar la línea amarilla que indica el recorrido del flujo del gas metano. El aire fue alimentado por medio de un compresor portátil (Alita AI-80, capacidad de 80 l/min) y regulado por un rotámetro.

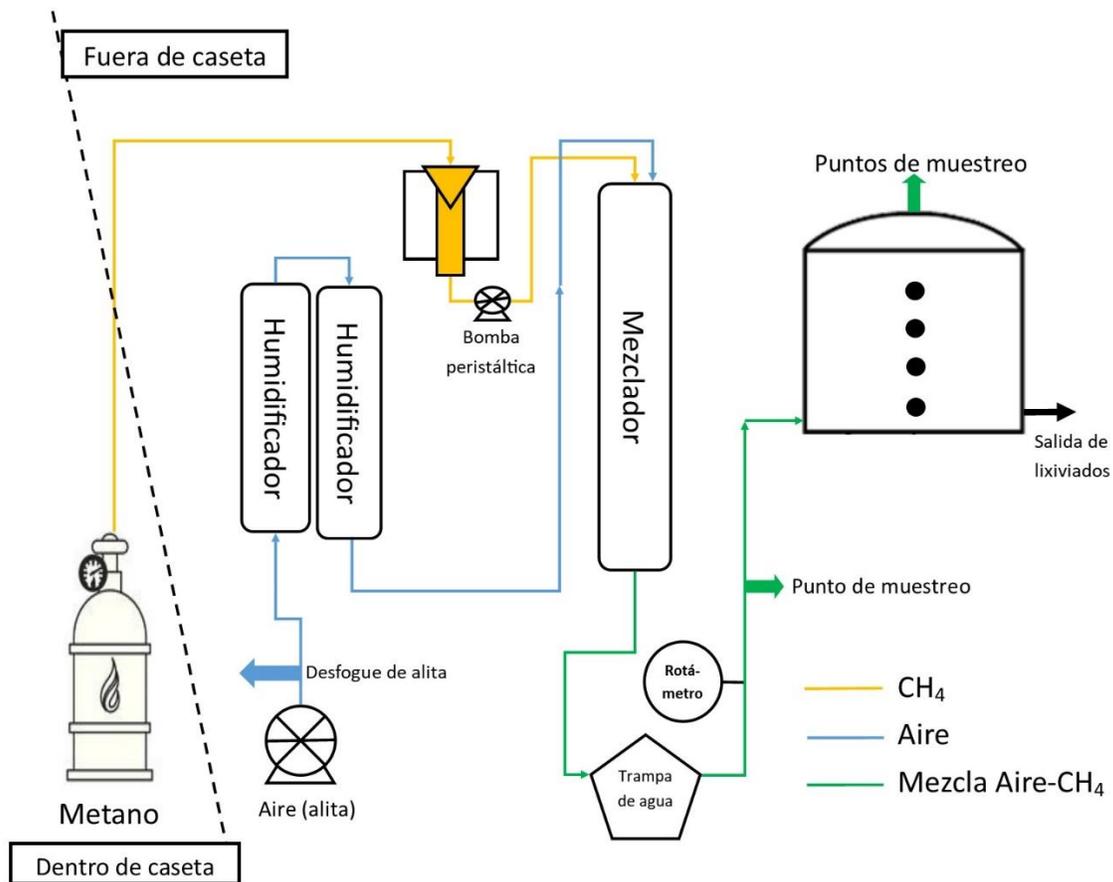


Figura 4.9. Diagrama del sistema de alimentación de la corriente gaseosa con metano de la fase experimental 3.

El aire fue conducido hacia unas columnas con agua para que el aire estuviera saturado de humedad al alimentar al biofiltro. La trayectoria del aire se muestra en la línea de color azul. El aire humidificado y el gas metano se mezclaban en otra columna (Figura 4.10-C, mezclador).

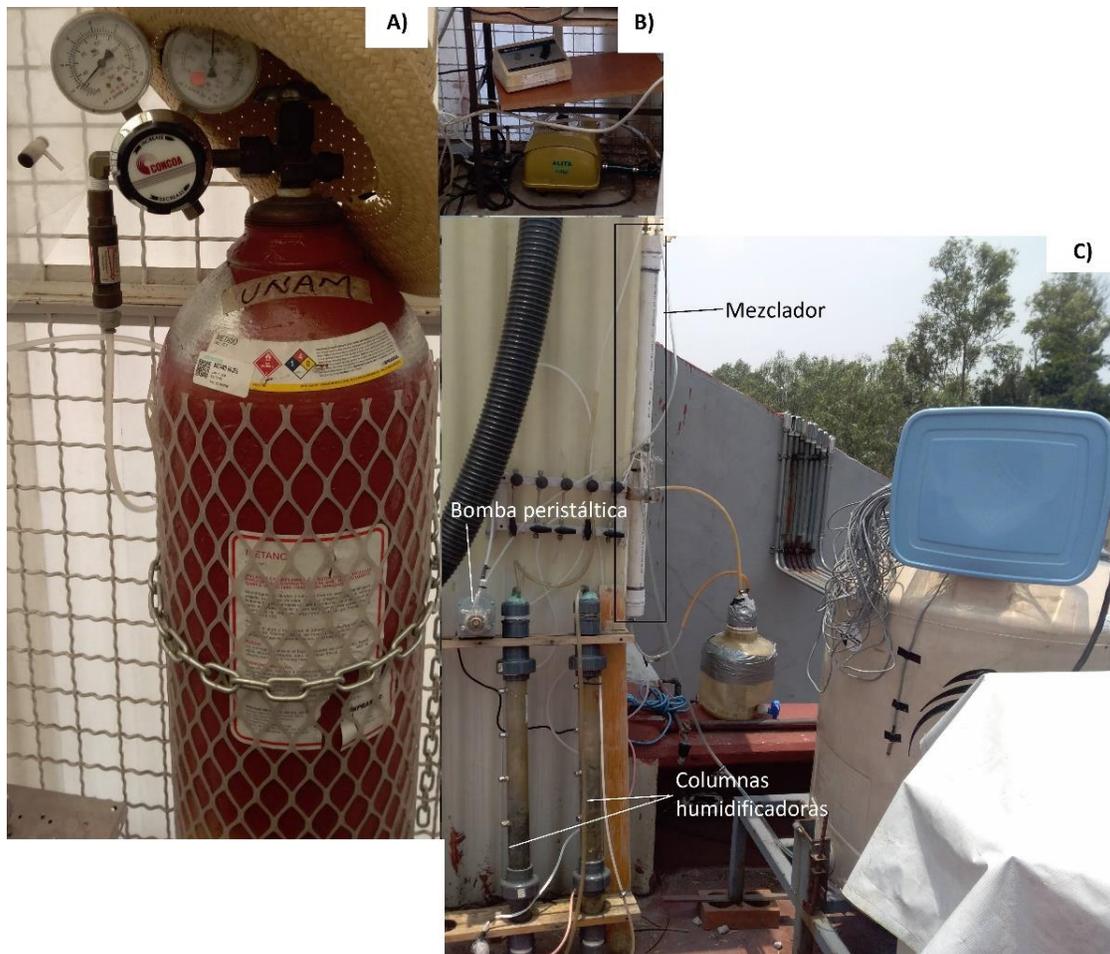


Figura 4.10. Fotografía del sistema de aire y biofiltración de la fase experimental 3. En A) se muestra el tanque de metano al 99.0%; en B) se muestra el compresor de aire y el controlador de la bomba peristáltica; y en C) se muestra las columnas humidificadoras, la bomba peristáltica y el mezclador de gases.

4.2.3 Características del biofiltro y el empaque de composta

El biofiltro es un recipiente tipo tinaco comercial de polietileno de baja densidad de 500 L nominales. Tiene 85 cm de diámetro y 60 cm de altura en su sección recta; la tapa mide 55 cm de diámetro (Figura 4.11). El volumen de lecho empacado es de 282.6 L (0.2826 m^3). El material de empaque es composta de la Planta de Composta de Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. En la Tabla 4.1 se encuentran las características de la composta utilizada en este trabajo.

Tabla 4.1 Características de la composta utilizada.

Materiales de origen	Porosidad (%)	Área superficial específica (m² m⁻³)	Referencias
Restos de poda, pasto, madera, arbustos, hojas y basura orgánica	50	2880	(Gómez-Borraz, 2017; Ruiz Ruiz, 2017)

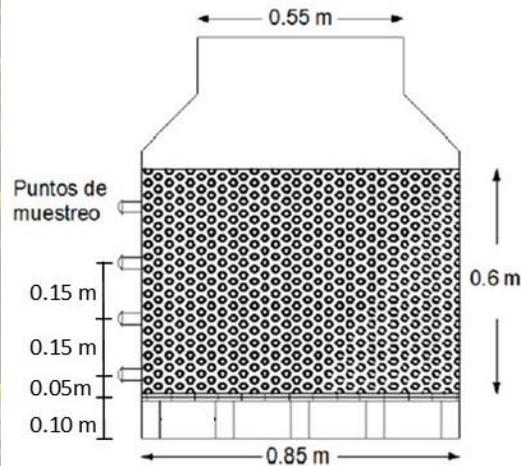


Figura 4.11. Fotografía y corte el recipiente utilizado para la biofiltración del gas desorbido.

En este trabajo se mencionan tres tipos de composta:

1. Composta fresca, la cual apenas comenzó su proceso de compostaje dentro de un intervalo de tiempo aproximado de 1 o 2 semanas.
2. Composta madura, la cuales el material orgánico que tenía más de 6 meses de estar en el proceso de formación de composta.
3. Composta aclimatada, la que se encontraba en el biofiltro de la PTAR y había tenido contacto con biogás durante seis meses en un experimento anterior.

Para iniciar cada fase experimental se mezclaron en una proporción 1:1:4:

- 1 costal de composta fresca,
- 1 costal de composta aclimatada y
- 4 costales de composta madura

El biofiltro que se operó previamente, y que fue fuente de composta aclimatada (alimentada con metano al 2% durante 168 días), tenía un volumen aproximado de 282 L, por lo que esta composta se guardó en 6 costales para mezclarla con la composta fresca y madura para las diferentes etapas de operación. La composta fresca es necesaria para evitar la compactación de la composta y de este modo no generar canales preferenciales donde el flujo de aire avanzaría.

Estas mezclas se realizan porque la composta madura y fresca aún no tienen una comunidad microbiana adaptada para el proceso de oxidación de metano.

4.2.4 Parámetros de operación

En todas las fases experimentales la alimentación de metano diluido fue menor a 2.5% v/v en mezcla con aire. El tiempo de retención de lecho vacío (TRLV) fue de 22.7 minutos. En la Tabla 4.2 se muestran los parámetros de operación de las tres fases experimentales.

Tabla 4.2 Parámetros de operación de las tres fases experimentales

	Fase 1	Fase 2	Fase 3
TRLV (min)	22.7	22.7	22.7
% CH₄	1.3±0.6	1.0±0.6	1.9±0.2
H₂S (ppm_v)	333±188	783±317	0
Duración de experimento	68 días Septiembre- noviembre, 2018	24 días Noviembre- diciembre, 2018	28 días Junio-julio, 2019

En la primera fase de operación, el biofiltro fue alimentado con una corriente gaseosa proveniente del desorbedor, la cual pasó por el pretratamiento con limadura de hierro y después se cambió a utilizar disolución Lo-cat. El objetivo fue reducir la cantidad de sulfuro de hidrógeno, de acuerdo con el protocolo experimental mencionado.

En la siguiente etapa de experimentación (fase 2), el biofiltro fue alimentado con una corriente gaseosa proveniente de la columna de desorción, sin tratamiento para eliminar H₂S, por lo que se alimentó con la mayor concentración de este gas. El empaque del biofiltro fue cambiado por una nueva carga de la mezcla de composta previamente definida, esto para retomar el tiempo 0 donde la composta no ha recibido perturbación con CH₄ y H₂S.

En la tercera etapa de operación, ya no en la planta de tratamiento, la alimentación al biofiltro fue realizada con una mezcla de metano y aire para obtener una concentración entre 2.5-2.0%, sin H₂S. El empaque del biofiltro estuvo constituido de una nueva mezcla de composta ya presentada.

4.3 Estudio de la comunidad microbiana

4.3.1 Generación del muestreo

Se tomó como muestra inicial de la mezcla de composta previamente descrita, directamente dentro del biofiltro con un nucleador de PVC (Figura 4.12) con una longitud de 60 cm. El dispositivo contaba con dos huecos de longitud de 17 cm separados entre sí por 15 cm. El volumen aproximado de toma de muestra es de 48.5 cm³.

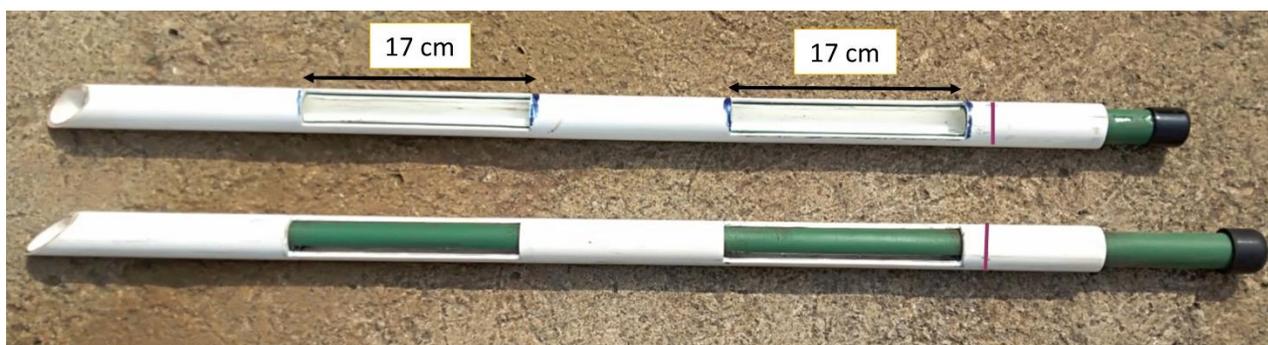


Figura 4.12. Nucleadores que se utilizaron para tomar la muestra de composta. La marca en color morado muestra hasta donde se ingresaba dentro del biofiltro. Arriba, compartimientos de muestreo abiertos, para toma de muestra; abajo, cerrados, para introducción y extracción.

En la Figura 4.13, se puede observar los puntos de muestreo del biofiltro a lo largo de las tres fases experimentales. Los lugares de toma de muestra se establecieron en dos alturas distintas del biofiltro en el centro y la orilla del biofiltro, donde:

- 4.2 corresponde al nivel más alto en el centro del biofiltro.
- 4.1 corresponde al nivel más alto y cercano a la pared del biofiltro.
- 2.2 corresponde al nivel bajo en el centro del biofiltro.
- 2.1 corresponde al nivel bajo y cercano a la pared del biofiltro.

Los puntos de muestreo se definieron de este modo para tener una mayor cobertura del cambio de la comunidad microbiana respecto al espacio. La frecuencia de toma de muestra fue una vez por semana. Se tomaron aproximadamente 50 mL de composta. Las muestras de composta se conservaron a 4°C hasta su análisis.

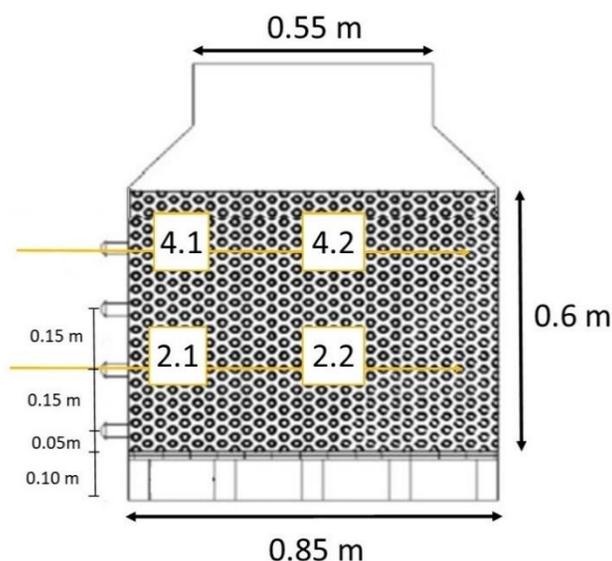


Figura 4.13. Zonas de muestreo dentro del biofiltro.

4.3.2 Extracción de DNA

Se extrajo el DNA de la composta usando el Kit Power Soil Extraction de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron muestras entre 0.100-0.250 g de composta para la extracción.

4.3.3 Cuantificación y determinación de la integridad del DNA mediante espectrofotometría y electroforesis

Para conocer la concentración de ácidos nucleicos se leyó la disolución de DNA en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 midiendo la absorbancia en una longitud de onda de 260 nm (se utilizó como blanco el disolvente de la extracción, reactivo C6 del kit de extracción).

Las proteínas absorben en una longitud de onda de 280 nm, por lo que se utilizó un cociente de absorbancias (A_{260}/A_{280}) para determinar la interferencia de contaminantes. Los cocientes del DNA y el RNA puros son aproximadamente de 1.8 y 2.0, respectivamente, por lo tanto un valor <1.7 indica contaminación por presencia de proteínas en la muestra (Cabrol et al., 2010).

Las mediciones de absorbancias en la longitud de onda en 230 nm óptimas para una muestra de DNA puro son entre 1.5-2.2; valores menores a 1.5 indican presencia de sales, carbohidratos y fenoles (Matlock, 2015; Regalado, 2005).

Se realizó una electroforesis al DNA extraído en geles de agarosa al 0.8% teñidos con GelRed® a 78V durante 30 minutos.

4.3.4 Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

De las extracciones realizadas, se llevaron a cabo reacciones de amplificación con la enzima polimerasa (PCR) para amplificar los fragmentos deseados de DNA. Los cebadores utilizados son universales para amplificar la región V3-V5 del gen RNA ribosomal 16S del dominio *Bacteria* (Yu et al., 2004) (Tabla 4.3). El cebador directo tendrá una pinza de guaninas y citosinas para usarlo en la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). En la Tabla 4.4 se muestran los reactivos que se usaron para cada reacción individual de PCR de 15 o 22 μ L.

Tabla 4.3. Cebadores que se utilizaron para las amplificaciones por PCR.

Cebadores	Especificidad teórica	Secuencia 5'-3'	Región amplificada	Tamaño del amplicón (pb)
BAC 341f BAC 907r	Universal	CCT ACG GGA GGC AGC AG CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	Región V3-V5 del gen 16S RNAr	550

Tabla 4.4. Reactivo para la reacción de amplificación.

Reactivo	Concentración final
Amortiguador de PCR (2X)	1X
MgCl₂ (3 mM)	1.5 mM
Mezcla de dNTP (400 μM c/u)	200 μ M
Cebadores (c/u)	0.5 μ M
DNA molde	Entre 10 y 20 ng
Taq polimerasa	1x
H₂O	Lo necesario para el volumen final
Volumen final	15 o 22 μ L

El programa de PCR utilizado fue el que se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Programa de tiempos y temperatura para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Desnaturalización inicial	94°C durante 5 minutos	
Desnaturalización	94°C durante 1 minuto	22 ciclos (Se aplicó una disminución de 0.5°C por ciclo terminado)
Alineamiento	57°C durante 45 segundos	
Extensión	72°C durante 45 segundos	
Desnaturalización	94°C durante 1 minuto	8 ciclos
Alineamiento	46°C durante 45 segundos	
Extensión	72°C durante 45 segundos	
Extensión final	72°C durante 5 minutos	
Conservación	4 °C	

Obtenidos los amplificadores, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.4% teñidos con GelRed[®] a 82V durante 35 minutos a todas las muestras amplificadas, para verificar la presencia de los amplicones y que éstos tuvieron el tamaño correcto comparándolo con el marcador de peso molecular (GeneRuler[®]).

4.3.5 Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, por sus siglas en inglés).

La separación de secuencias distintas presentes en los amplicones se realizaron de acuerdo con el procedimiento del equipo DCODE (Bio-Rad, EUA).

La electroforesis se realiza en un gel de poliacrilamida al 6% con un gradiente de desnaturación (urea/formamida) entre 30 y 60%. La composición del gel se muestra en la tabla 4.6.

Tabla 4.6. Medidas de los reactivos de las disoluciones de alta y baja concentración para generar el gradiente de concentración en el gel.

Reactivo	30%	60%
Bis-acrilamida 40% (mL)	2.7	2.7
TAE 50X (mL)	0.36	0.36
Glicerol puro (mL)	0.36	0.36
Urea (g)	2.268	4.536
Formamida (mL)	2.16	4.32
Volumen total (mL)	18	18

Se prepararon geles de 16x16 cm con un volumen aproximado de 30 mL y una capacidad de 20 muestras corridas simultáneamente. Cada muestra consistió en 10µL de amplificado de PCR y 2.5 µL de amortiguador de carga 5X. Las electroforesis se realizaron a 82V durante 15 horas.

Terminado el proceso de electroforesis, los geles de poliacrilamida se tiñeron durante 40 minutos con una solución de colorante SYBR® Gold (1:10 000) diluido a 0.32X; al pasar este intervalo de tiempo los geles se visualizaron en un fotodocumentador Aplegen Omega Lum G Gel Documentation System y se tomaron fotografías para su posterior análisis.

4.3.6 Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida

A partir de las fotografías de los geles de la DGGE, se utilizó el software Quantity One® 1.0 para identificar cada una de las bandas en cada carril del gel.

La información obtenida del software Quantity One se convirtió en matrices de presencia/ausencia para calcular los índices de similitud y de organización de la comunidad microbiana a partir de los perfiles de bandas generados en cada gel.

Con la matriz obtenida, se calcularon los índices y coeficientes para determinar características de las comunidades microbianas mediante la gestión de recursos microbianos (MRM, por sus siglas en inglés), los cuales son:

- **Índice de similitud Sorensen-Dice (S_D) y Jaccard (J):** Estos índices son utilizados para la comparación de comunidades con atributos similares. A partir de datos cualitativos, es decir la ausencia y presencia de bandas se puede representar distintos grados de perturbación en el ambiente. Estos índices son los más utilizados y los valores obtenidos de este cálculo van de 0 a 1, donde 1 expresa total similitud (Cruz et al., 2014). Las ecuaciones para calcular estos índices son las siguientes:

$$S_D = \frac{2n_{AB}}{n_A + n_B}$$

$$J = \frac{n_{AB}}{n_A + n_B - n_{AB}}$$

Donde

n_A = Número de bandas en el carril A (muestra 1)

n_B = Número de bandas en el carril B (muestra 2)

n_{AB} = Número de bandas que coinciden en ambos carriles (columnas en el gel de poliacrilamida)

Estos índices permiten conocer la similitud que existan entre las muestras comparadas, entre más cercanos sean los valores a 1, más similares son. Estos valores permiten conocer cómo se van dando los cambios a través del tiempo y entre diferentes puntos de muestreo en el mismo día de muestreo y así conocer cómo el ingreso de biogás en

el biofiltro va cambiando las comunidades microbianas. Para este trabajo se escogió el índice de Jaccard porque no sobreestima la similitud entre muestras.

- **Índice de organización de la comunidad (C_o , *community organization*).** Este índice describe la uniformidad existente en la comunidad microbiana. Este valor se obtiene a partir de los valores de intensidad reportados por el programa Quantity ONE® está correlacionado con el coeficiente de Gini, un valor que describe la uniformidad en una comunidad microbiana por medio de la medición del área normalizada de Lorenz y la línea de uniformidad perfecta (Figura 4.14). Valores de Gini mayores indican que una comunidad tiene un alto nivel de desigualdad (menor uniformidad) (Marzorati et al., 2008; Wittebolle et al., 2009). Co tiene valores porcentuales entre 0 y 100 y se calcula como el coeficiente de Gini multiplicado por 100. La uniformidad puede influir en la estabilidad del funcionamiento del ecosistema. Valores de C_o bajos (entre 20-25) indican una alta uniformidad, es decir en la comunidad microbiana estudiada tiene mayor probabilidad de presentar alguna especie tolerante a una perturbación en comparación con una baja uniformidad; valores de C_o intermedios (entre 45-60) indican que son comunidades balanceadas, las cuales tienen un gran potencial de adaptarse a los cambios ambientales; mientras que altos valores de C_o (>80) indican una comunidad altamente especializada (Carballa et al., 2011).

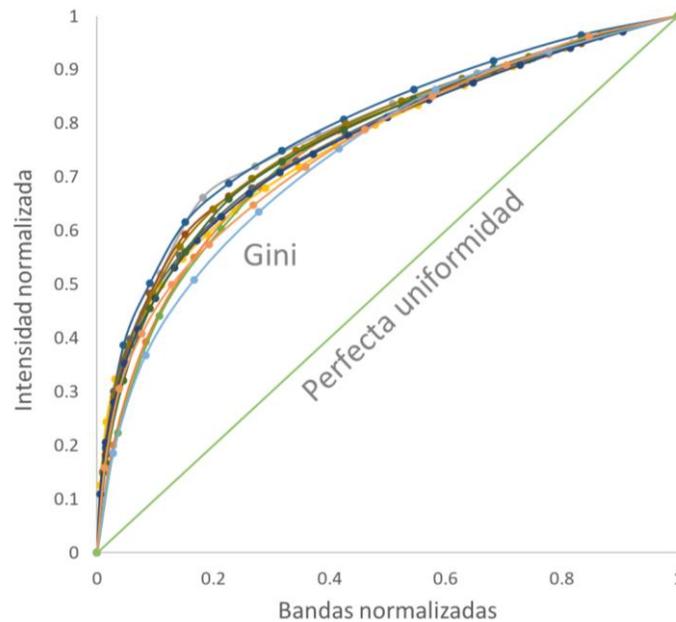


Figura 4.14 Ejemplo de curvas de Lorenz para la determinación del índice de organización (C_o) de comunidades microbianas

- **Construcción de dendogramas:** Para la construcción de las agrupaciones de perfiles de bandas se utilizó el análisis UPGMA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*). Este es un método de agrupamiento (*clustering*) de datos binarios, mediante el cual se utilizan similitudes por pares de patrones de DGGE, para inferir un dendrograma, el cual represente estas distancias en forma gráfica. Una matriz binaria se traduce en una matriz de distancia que representa las similitudes de los patrones DGGE utilizando un coeficiente de similitud. Varios autores han utilizado diferentes coeficientes de similitud; en este trabajo se utilizaron los coeficientes de Dice (Schäfer y Muyzer, 2001). El coeficiente de Dice es otro coeficiente de similitud, también llamado Sorensen-Dice, ya antes descrito. Se decidió utilizar el método de agrupamiento por medio de UPGMA que proporciona los grupos más plausibles y se ve menos afectado por las muestras que son atípicas. (Bio-Rad, 1996).

4.3.7 Corte, reamplificación y purificación de bandas para secuenciación

Se realizaron corte de bandas que tuvieron una mayor intensidad y definición en el gel. Se resuspendieron en 30 μ L de agua y se traspasaron a un tubo de 0.2 ml. Se agitó durante 20 segundos y se pusieron en incubación a 36°C durante 50 minutos.

Se realizó la reamplificación del DNA resuspendido con cebadores sin grapa de GC con el programa descrito en la Tabla 4.5.

Se realizó electroforesis en agarosa al 1.5% depositando todo el producto de PCR producido y se realizó un corte de bandas del amplicón de 600 pb. Posteriormente se utilizó el kit QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, no. Cat. 28706, EUA). En el paso del lavado con el amortiguador PE se dejó incubar durante 5 minutos. Para la elución del DNA, se realizó una incubación de 5 minutos en la columna.

Después de realizar la purificación se realizó una electroforesis en agarosa al 1.5%, para comprobar la integridad y determinar la concentración del producto de PCR purificado, con el programa ImageLab y la escalera de DNA 100pb de GoldBio cat. No. D001.

4.3.8 Secuenciación

Para la secuenciación por método Sanger, los productos purificados debían tener una concentración mayor a 25 ng/μl en un volumen mayor de 15 μL. Estos productos se mandaron con una muestra de primer 341F (concentración de 10 pM) a Macrogen Inc en Seúl, Corea del Sur.

4.3.9 Análisis de secuencias en *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)

Después de recibir las secuencias, se realizó un alineamiento y un rasurado de las secuencias recibidas para obtener mejores resultados en la búsqueda en la plataforma de BLAST en la base de datos de las 16S RNA ribosomal (Bacteria and Archea). Los resultados que se obtuvieron en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y que se tomaron en cuenta para el análisis de resultados fueron las que obtuvieron un porcentaje de cobertura (Query cover) mayor a 80% y un porcentaje de identidad mayor al 80%.

5 Resultados y Discusión

5.1 Primera etapa de operación (Fase 1)

5.1.1 Resultados fisicoquímicos

En la Figura 5.1 se pueden observar las concentraciones de metano de entrada y salida junto con los valores de concentración de entrada de H₂S. A la salida la concentración fue de 0 ppm_v para el H₂S en todas las mediciones. La alimentación de metano al biofiltro fue irregular, ya que provenía del efluente de la PTAR que trabajaba a condiciones reales. Los valores de entrada presentaron un intervalo entre 0.3 y 3% de metano (promedio 1.3±0.6% v/v). El día 16 destaca un valor extremo [CH₄] (8.4% v/v), resultado de un intento por regular la concentración de metano con ayuda de un cilindro con metano al 99%, ante una falla técnica que presentó la planta de tratamiento. El arreglo no pudo ser controlado y fue retirado. Como se verá más adelante, esta entrada provocó un incremento de la temperatura dentro del biofiltro.

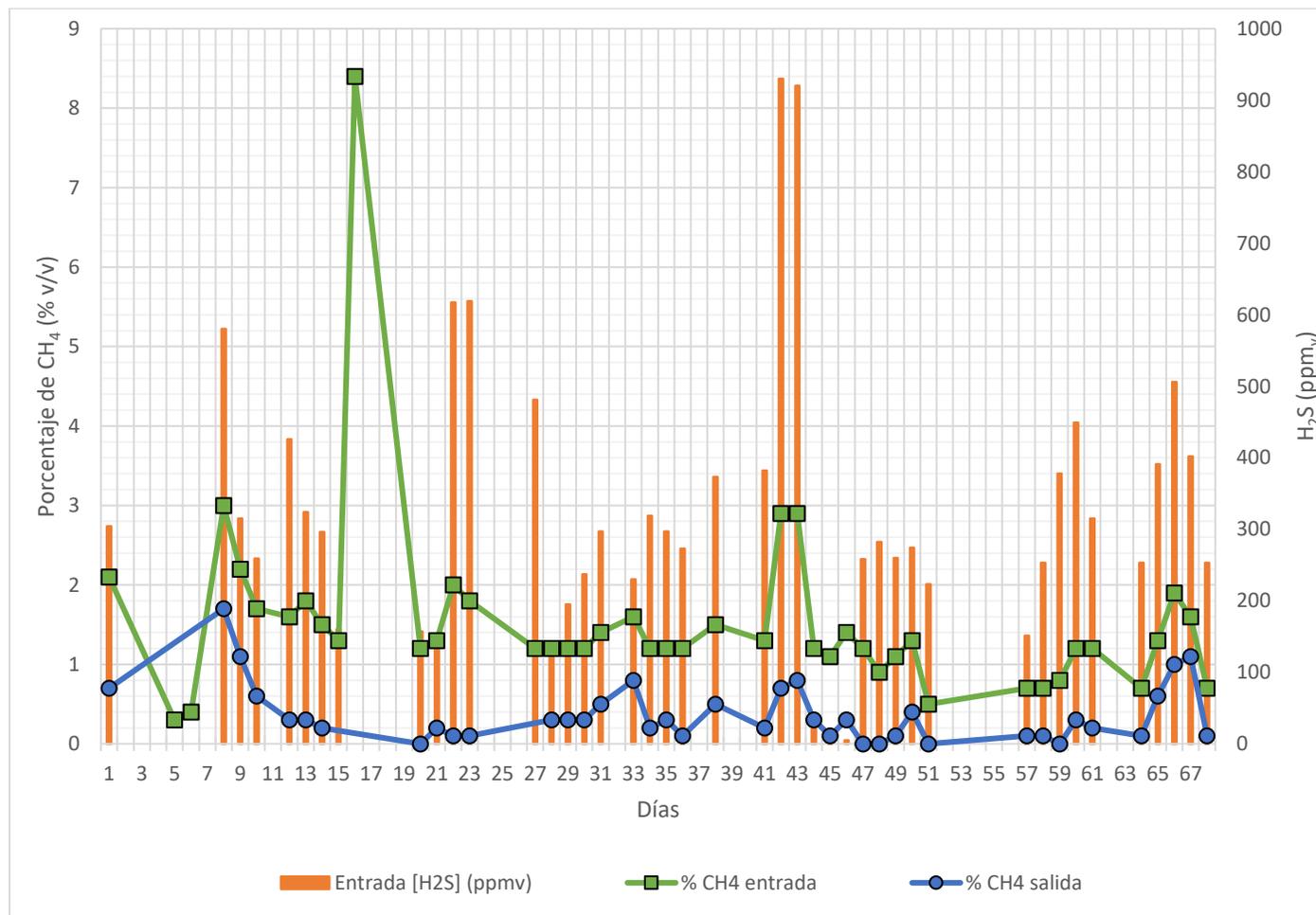


Figura 5.1 Porcentaje en volumen de CH₄ en la entrada y salida de biofiltro por día y la concentración de entrada al biofiltro de H₂S (Fase Experimental 1: H₂S entrada 333± 188 ppm_v). Este gas no fue detectado a la salida. (Día 16, adición externa de metano).

En la Figura 5.1 también se muestra la concentración de H₂S que ingresó al biofiltro, destacando dos días con valores muy elevados (930 y 920 ppm para los días 42 y 43 respectivamente). La Figura 5.2 por su parte presenta la capacidad de eliminación de metano durante la fase de experimentación.

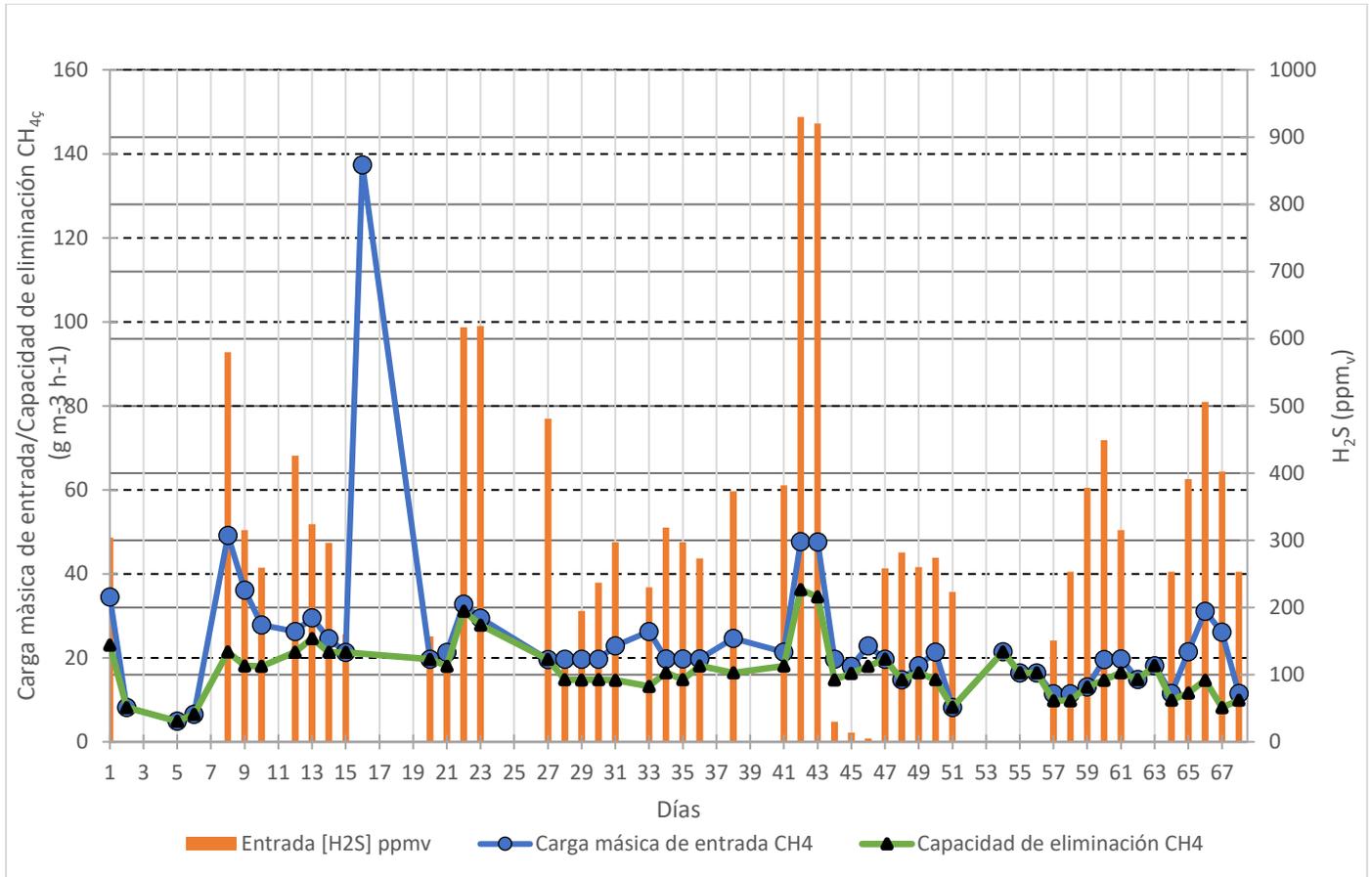


Figura 5.2 Gráfica que muestra la evolución de la capacidad de eliminación de metano y la concentración de H₂S medida ese día de la Fase Experimental 1 (H₂S entrada 333± 188 ppmv).

La primera semana (días 2, 5 y 6) se registró una capacidad de eliminación menor a 10 g m⁻³ h⁻¹ de metano, lográndose incrementar para el día 08. La concentración de H₂S ese día fue de 580 ppm_v, y parece provocar una ligera disminución de la CE de metano en el día 09 y 10.

Posteriormente, se recupera esta actividad y se mantiene así (por arriba de los 20 g m⁻³ h⁻¹) hasta el día 21, cuando se presenta un ligero descenso, que es superado al registrarse el incremento de la CE de metano hasta 32 g m⁻³ h⁻¹ en el día 22, cuando se presenta una concentración de H₂S de 619 ppm_v. Este hecho parece afectar de nuevo la CE, ya que vuelve a reducirse a valores de 15 g m⁻³ h⁻¹ y ligeramente superiores, correspondiendo en esos días con una concentración de H₂S inferior a 400 ppm_v. Tales condiciones

incrementaron la CE a los valores más altos registrados en esta fase, alrededor de $35 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para los días 42 y 43, lo cual coincide con un incremento en la concentración de metano a la entrada, 2.9%. Sin embargo, en esos mismos días, la concentración de H_2S fue de 930 y 920 ppm_v , lo que afectó la capacidad de eliminación, reduciéndola hasta $14.8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Durante el resto de este experimento, se presentaron variaciones en ambos parámetros sin una correlación clara. Al final, en los días 67 y 71, se identifica una disminución de la CE (por debajo de $10 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) a pesar de un incremento en la concentración de metano a la entrada, debido a que la concentración de H_2S alcanza las 500 ppm_v en su correspondiente día anterior.

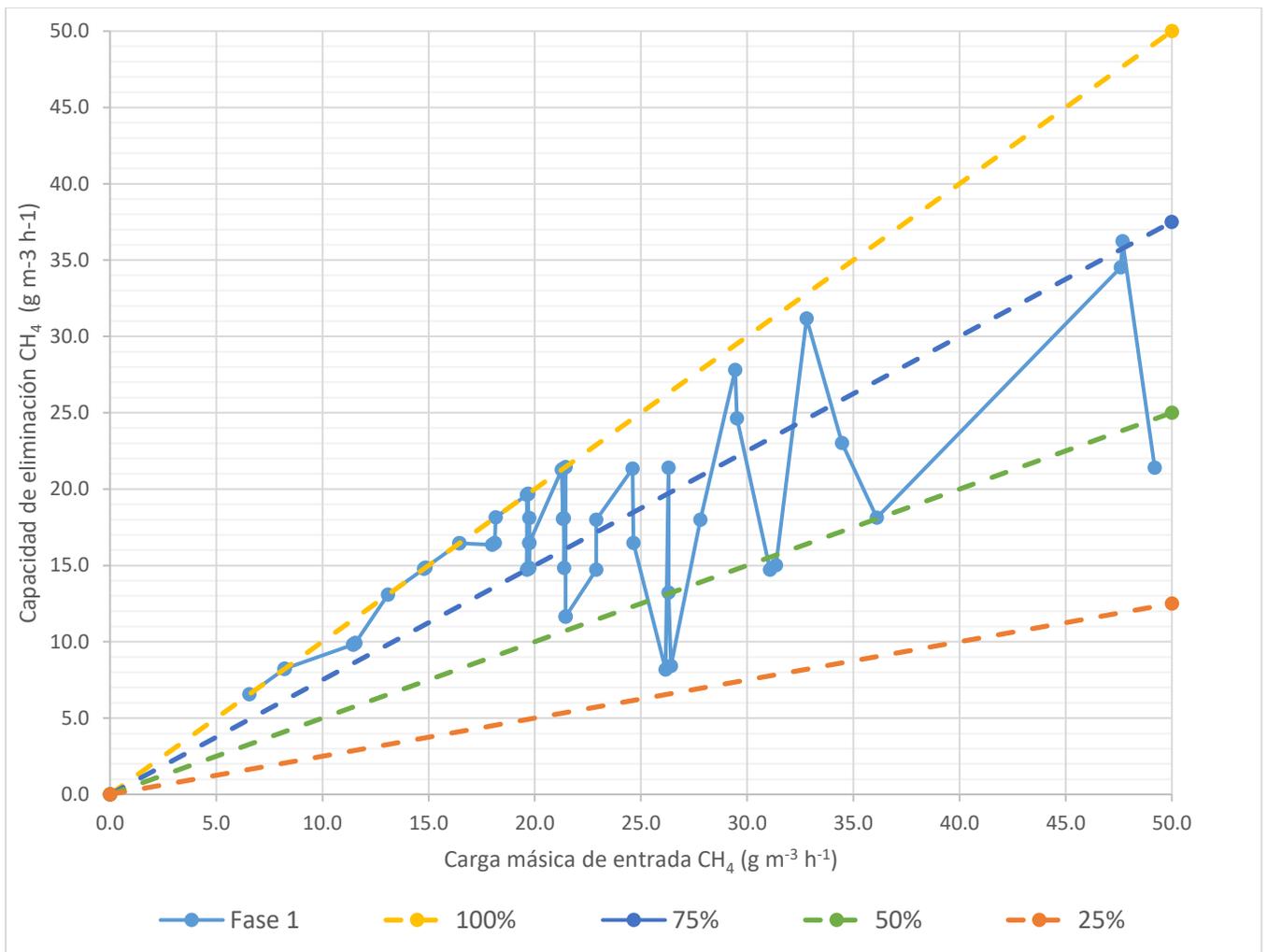


Figura 5.3. Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada. Este gráfico muestra la eficiencia de remoción de la Fase Experimental 1 (H_2S entrada $333 \pm 188 \text{ ppm}_v$) y las líneas a cuatro valores de eficiencia.

En la figura 5.3, se puede observar el comportamiento de la capacidad de eliminación de CH₄ dependiendo de la carga másica de entrada de CH₄. Se muestra que en valores de carga másica de metano menores a 20 g m⁻³ h⁻¹ (1.2% v/v), la remoción del biofiltro fue del 100%. Para valores superiores, la remoción se vuelve irregular rondando entre 50% y 75% de remoción. La menor capacidad de eliminación en la Figura 5.3 (carga alimentada de 26 g m⁻³ h⁻¹) se obtuvo en los últimos días de la experimentación con [H₂S] = 402 ppm_v.

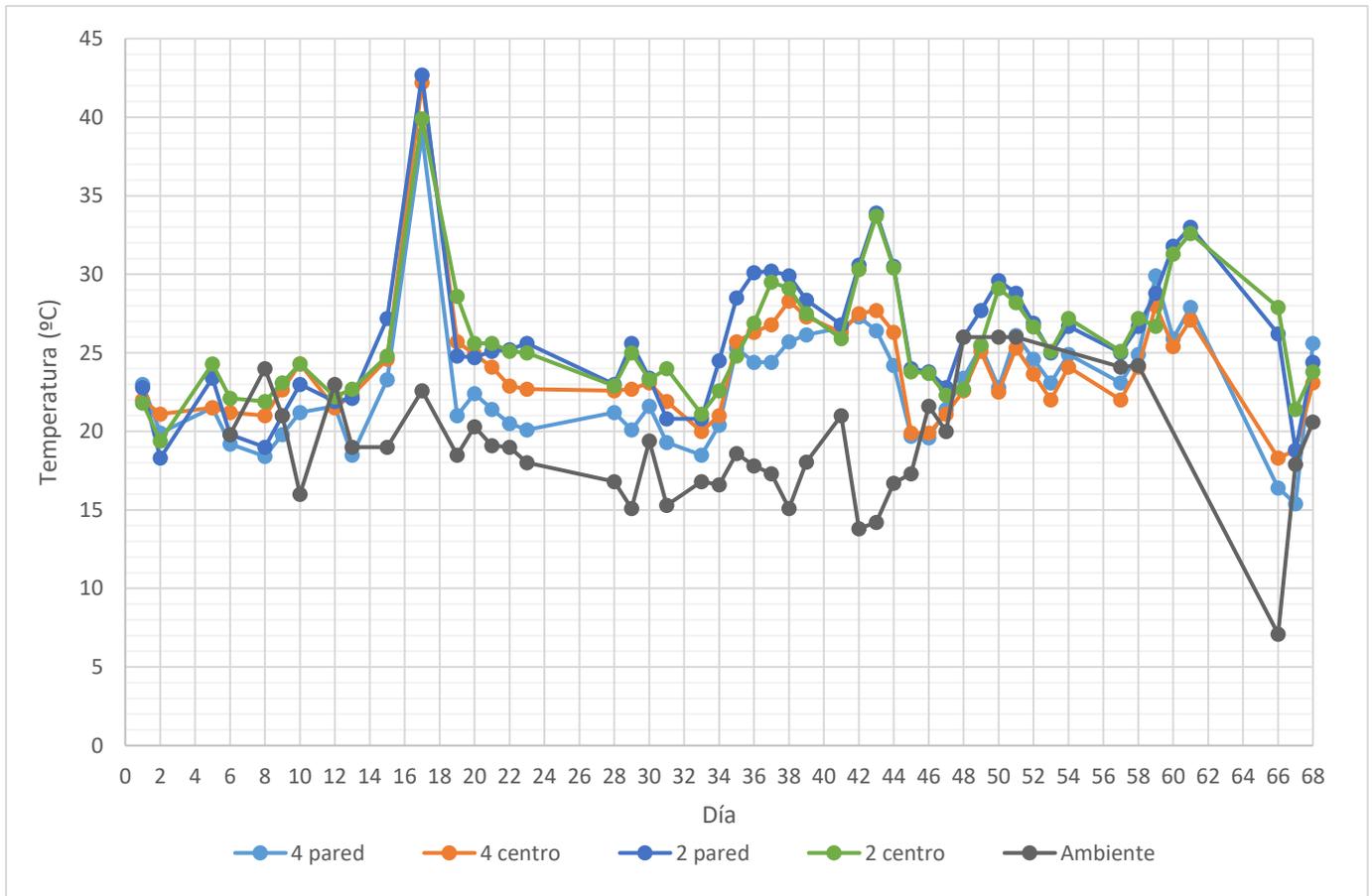


Figura 5.4. Temperatura de cada punto de muestreo¹ de la Fase Experimental 1 (H₂S entrada 333± 188 ppm_v).

En la Figura 5.4, se pueden observar los cambios de temperatura dentro del biofiltro en los 4 puntos de muestreo a lo largo de la experimentación. Las tomas de temperatura se realizaban entre 10 y 11 de la mañana. En general se observa que los puntos dentro del biofiltro se encontraron a mayor temperatura que la del ambiente. Como ya fue mencionado, el día 16 se alimentó metano de un tanque sin el debido control, lo que provocó una alta concentración de metano a la entrada durante ese día y una alta

¹ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

temperatura (43°C) registrada al día siguiente (día 17). En ese día, el aumento de temperatura fue más notorio en el punto 2 de la pared y el punto 4 del centro. Otro punto que destaca en valor de temperatura alto es el del día 43, que corresponde con el mayor valor de capacidad de eliminación presentado en esta fase, derivado a su vez por un alto contenido de metano en la corriente alimentada (2.9%). Es de destacar que el incremento se registra en el nivel 2 (pared y centro), no así en el nivel 4. También debe señalarse que ese incremento vino acompañado por una baja temperatura ambiente, de 14°C. El incremento de temperatura se encuentra asociado a la actividad de los microorganismos en la oxidación de metano, observándose un aumento proporcional de temperatura respecto a la concentración y carga másica de entrada de CH₄ (Huete et al., 2018).

5.1.2 Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés)

El gel que a continuación se muestra es del 6% de poliacrilamida en gradiente desnaturizante 30-60% para la fase experimental 1.

La Figura 5.5 corresponde a la primera fase experimental alimentando el biofiltro con una carga másica promedio de entrada de metano $17.3 \pm 12.1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, una CE promedio de metano 16.7 ± 6.2 y concentración promedio de H₂S 333 ± 188 .

De la Fase 1 se cortaron 24 bandas, aunque en la imagen se puede observar un mayor número de bandas. Sin embargo, hubo complicaciones para realizar su corte, como la dificultad para mantener la integridad de la banda o para realizar la extracción y purificación del DNA correspondiente; esto limitará la identificación de microorganismos.

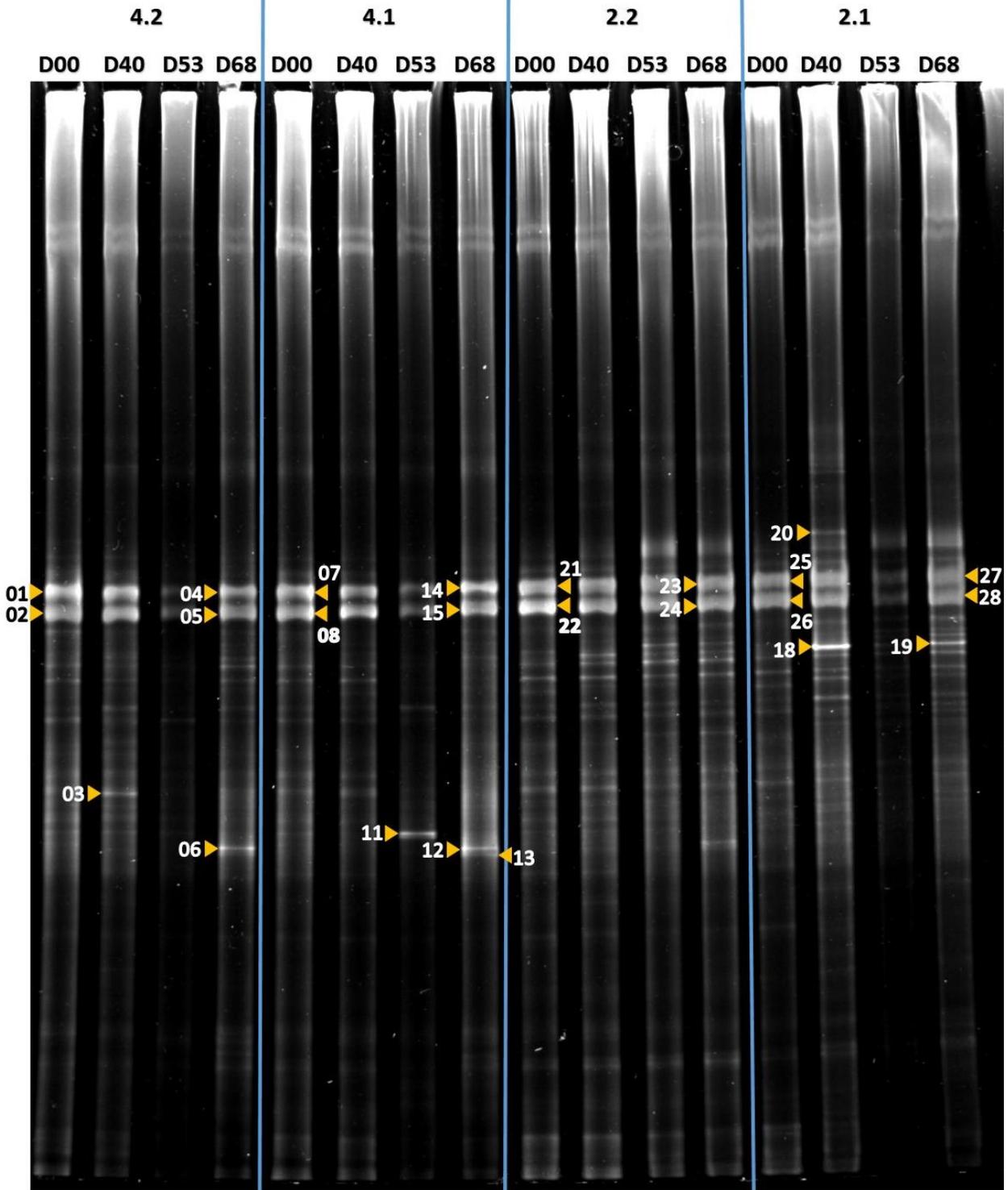


Figura 5.5. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras² de la Fase Experimental 1 (C1 a diferentes días), marcando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar. D00: Día 0, D40, Día 40, D53: Día 53 y D68: Día 68.

5.1.3 Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida

Para esta sección se presentan los valores del índice de Jaccard, análisis de dendogramas y los índices de organización de la comunidad (C_o) obtenidos del perfil de bandeado de la Figura 5.5 para la fase experimental 1.

Los valores del índice de Jaccard se comparan entre diferentes tiempos de muestreo manteniendo el mismo sitio de muestreo (cuadrantes en la diagonal central; el valor 1.00 indica mismo sitio y mismo tiempo), así como en diferentes puntos de muestreo con los mismos tiempos de muestreo (cuadrantes en el triángulo derecho de la diagonal central). Por esta razón hay espacios en color blanco, pues no se realizaron las comparaciones entre diferentes tiempos en diferentes puntos de muestreo. Cada valor Jaccard es un número entre 0 (sin similitud alguna) y 1 (patrones 100% idénticos), y los valores en las tablas fueron señalados con colores para una mejor apreciación, donde los valores de 1.0 se encuentran de color verde (total similitud) y los valores menores a 0.20 se encuentran en rojo (muy baja similitud).

Jaccard		4.2				4.1				2.2				2.1			
		D00	D40	D53	D68												
4.2	D00	1.00	0.54	0.25	0.28	0.52				0.39				0.50			
	D40		1.00	0.35	0.40		0.68				0.61				0.39		
	D53			1.00	0.38			0.27				0.21				0.23	
	D68				1.00				0.42				0.38				0.34
4.1	D00					1.00	0.72	0.27	0.60	0.67				0.42			
	D40						1.00	0.25	0.48		0.72				0.37		
	D53							1.00	0.23			0.21				0.22	
	D68								1.00				0.37				0.26
2.2	D00									1.00	0.73	0.47	0.35	0.34			
	D40										1.00	0.55	0.42		0.46		
	D53											1.00	0.69			0.54	
	D68												1.00				0.55
2.1	D00													1.00	0.53	0.44	0.37
	D40														1.00	0.48	0.53
	D53															1.00	0.61
	D68																1.00

Figura 5.6. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeado de la DGGE de la fase 1 Experimental.

En la Figura 5.6, muestran que para el punto 4.2³ se notó una mayor diferencia entre perfiles de bandas entre el día 00 y 53 con valores de $J=0.25$, lo cual refleja que hasta el

² Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

³ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

día 53 hubo una afectación por el gas alimentado y esto se refleja en el tipo de microorganismos encontrados, punto presentado más adelante. Otra explicación para este cambio tan marcado entre los niveles 4 y 2, es el posible desarrollo de otro tipo de poblaciones microbianas porque ya no se ejerció presión de selección por el gas agregado, dando lugar a poblaciones no consumidoras de CH₄ y H₂S. Para el punto 4.1 se presentó una mayor diferencia entre perfil de bandas entre el día 53 y 68, este último con J=0.23. Para el punto 2.2 se notó una mayor diferencia entre perfil de bandas entre el día 00 y 68 con valores de J=0.35. Para el punto 2.1 se notó una mayor diferencia entre perfil de bandas entre el día 00 y 68 con valores de J=0.37. De estos resultados se puede observar que el nivel más bajo de muestreo (nivel 2) presentó menores variaciones en el perfil de bandeo que el nivel 4. Con ello se infiere que en el nivel 2 se desarrolló una comunidad microbiana más robusta y resistente tanto a las variaciones en la concentración de entrada de CH₄, H₂S como en la temperatura (Figura 5.4), siendo éstas últimas mayores en el nivel 2 que en el nivel 4. Lo anterior se refuerza al observar los valores de Jaccard más pequeños en las muestras del día 53 para el nivel 2.2 comparado con los niveles 4.1 y 4.2 (J=0.21 en ambos casos). Que se haya observado esa mayor diferencia hasta el día 53 y no en el día 68 (J=0.37 y 0.38 para 4.1 y 4.2) podría explicarse porque la carga másica de metano promedio que entró después del día 53 disminuyó de un 24±13 gm⁻³ h⁻¹ (promedio calculado del día 40 hasta el día 53) a 18±6 gm⁻³ h⁻¹ (promedio calculado del día 54 hasta el día 68). Además, en la Figura 5.2 se observa un pico de entrada de metano en los días 42 y 43 que representó una carga de 48 g m⁻³ h⁻¹ (2.9% v/v) y después del día 53 ya no hubo cargas másicas de entrada tan altas. Finalmente, el análisis de la variación del índice de Jaccard en un mismo punto a lo largo del tiempo de experimentación indica que el nivel 2 presentó menores cambios (punto 2.1 de 0.53 en el día 40, a 0.37 en el día 68; punto 2.2 de 0.73 a 0.35 en los mismos días) comparado con el nivel 4 (punto 4.1 de 0.72 a 0.60, con un valor intermedio de 0.27 en el día 53; punto 4.2 de 0.54 a 0.28 en los días 40 y 68).

Análisis de dendrogramas.- Para la construcción del dendrograma, se tomó como punto de partida la similitud más grande en el patrón de imágenes. Esto se realizó para hacer un análisis comparativo de todos los patrones de bandas generados y determinar la similitud o distancia existentes entre los distintos perfiles de DGGE.

Cada valor de coeficientes de similitud es un número entre 0 (sin similitud alguna) y 1 (patrones 100% idénticos). En el dendrograma de la fase experimental 1 (Figura 5.7) se puede observar una similitud mayor a 0.70 entre los perfiles de bandeo expuestos. Se observan 8 grupos (*clústeres*), donde las muestras que formaron *clústeres* aislados fueron

4.1⁴ y 4.2 del día 53 (*clústeres* 1 y 2) así como 4.1 y 4.2 del día 68 (*clústeres* 5 y 6) debido a que la similitud fue menor al 0.7 en comparación con las otras bandas. Como se había mencionado en la sección de análisis de los valores de Jaccard, se encontró que el nivel 4 fue el que tuvo mayor diferencia entre sí a lo largo del tiempo, en comparación con el nivel 2, de nuevo reforzando una mayor capacidad de cambio. Es importante mencionar que este nivel presentó menor humedad que el nivel 2 (el porcentaje de humedad del nivel 4 fue de 41.9% y 51.7% para el nivel 2) (Tabla 5.1) siendo uno de los parámetros que afectan a una comunidad microbiana y reflejándose en el perfil de bandeado

Las muestras 2.1 de los días 40 y 68 forman el clúster 3; las muestras 2.1 del día 53 y las muestras del punto 2.2 de los días 53 y 68, forman el clúster 4; el resto de los *clústeres* se forman por los días 00 y 40 donde se observó que no hubo gran cambio, debido a que la alimentación de CH₄ fue un poco menor que del periodo de días 40-68, donde predomina el establecimiento de las muestras del día 00 y 40 en el clúster donde no hubo una mayor evolución en cuanto a la diversidad de la comunidad.

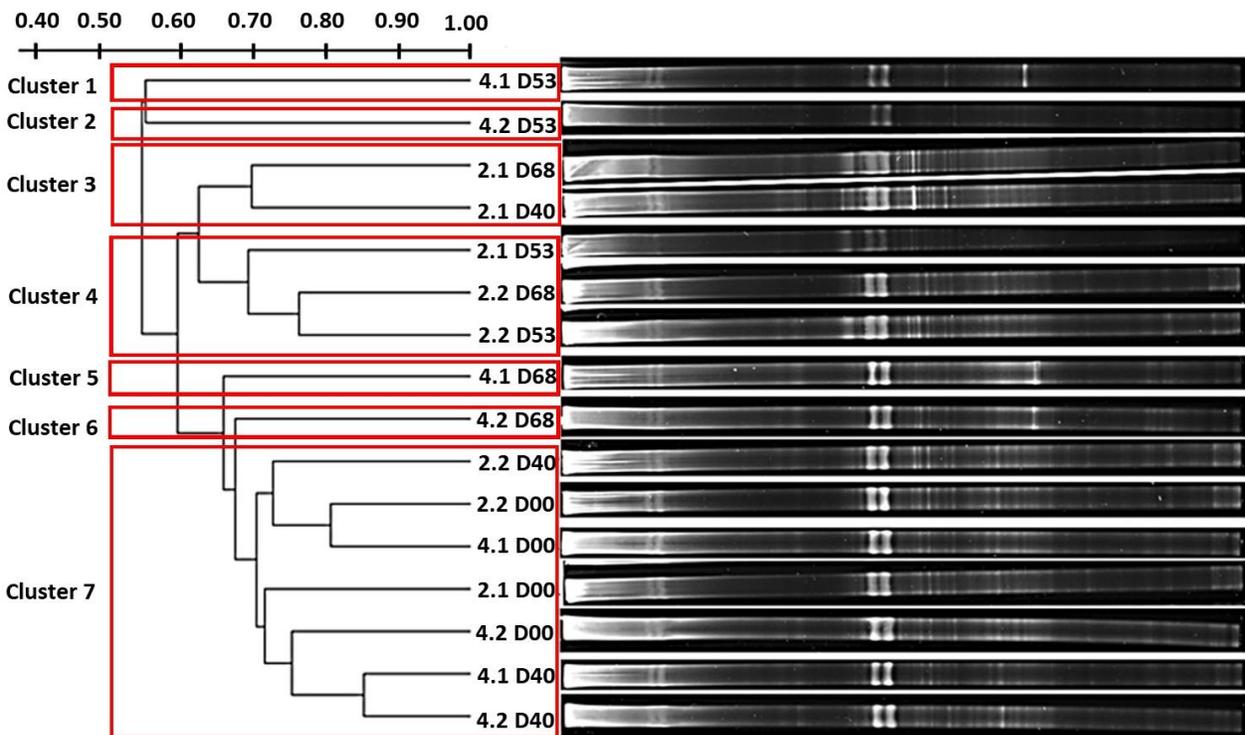


Figura 5.7 Dendrograma de distancias. Fase experimental 1 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los clústeres con similitud mayor a 0.7.

⁴ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

Índices de organización de la comunidad. - Se determinaron los índices de organización de la comunidad (C_o). Los gráficos utilizados para el cálculo se encuentran en el Anexo (sección 7.5). Los valores obtenidos de C_o se encuentran dentro del intervalo de lo que se considera una comunidad equilibrada (0.45-0.60), la cual es capaz de lidiar con cambios en las condiciones ambientales. Los valores de C_o bajos (0.20-0.25) indican una comunidad altamente uniforme y, valores altos (0.80) indican una comunidad altamente especializada por lo que se podrían necesitar tiempos de recuperación más largos para contrarrestar un estrés repentino (Carballa et al., 2011).

En la Figura 5.8 se presentan los valores de C_o de la fase 1 experimental (carga másica de entrada de CH_4 promedio $22.0 \pm 9.2 \text{ gm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $[\text{H}_2\text{S}]$ promedio $333 \pm 188 \text{ ppm}_v$). Los resultados obtenidos de organización de la comunidad microbiana para esta fase experimental determinan que se encuentra en un punto intermedio entre una comunidad equilibrada y uniforme, dándole características que permiten que tenga una adecuada adaptación a los cambios ambientales. Aparentemente, el periodo de alimentación del gas (68 días) no permitió que la comunidad microbiana se volviera aún más uniforme. El índice C_o confirma que el nivel 2 presentó menores variaciones en su comunidad microbiana a lo largo del experimento, si se compara con el nivel superior.

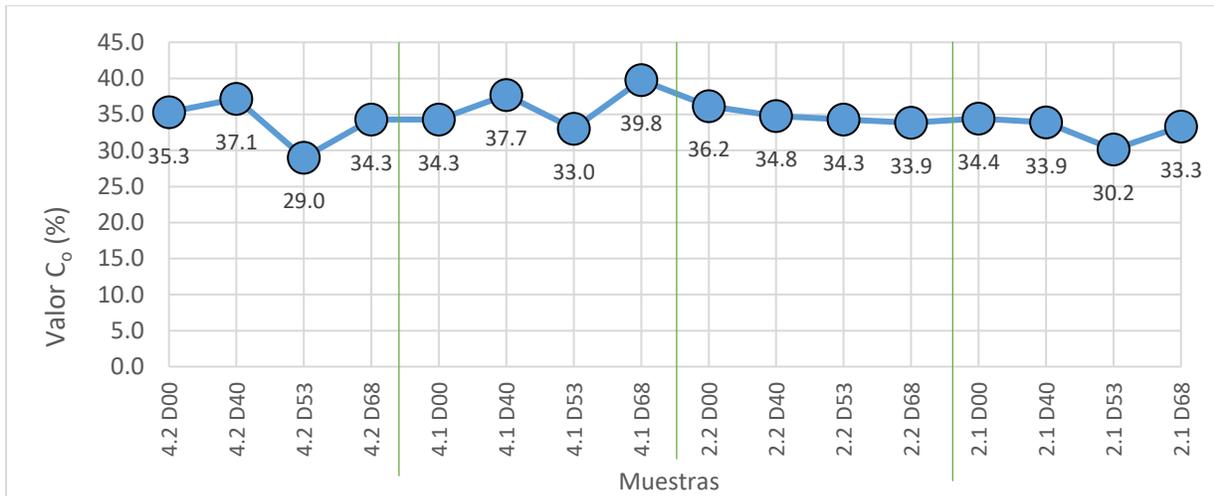


Figura 5.8 Valores de C_o de la Fase experimental 1.

5.2 Segunda etapa de operación (Fase 2)

5.2.1 Resultados fisicoquímicos

Esta fase se operó durante 24 días, sin periodo previo de adaptación para las mayores concentraciones de H_2S , con varios valores por arriba de 1000 ppm_v. La concentración de salida de metano en los primeros 3 días sugiere que el sistema no arrancó de inmediato (Figura 5.9). El porcentaje de alimentación de metano fue alto en los primeros tres días, para luego reducirse el resto de la fase, con valores incluso menores a 0.5%. En esas condiciones, el efecto de la alta concentración de H_2S no pudo ser puesto en evidencia, ya que la remoción de metano y sulfuro de hidrógeno fue total (Figura 5.9).

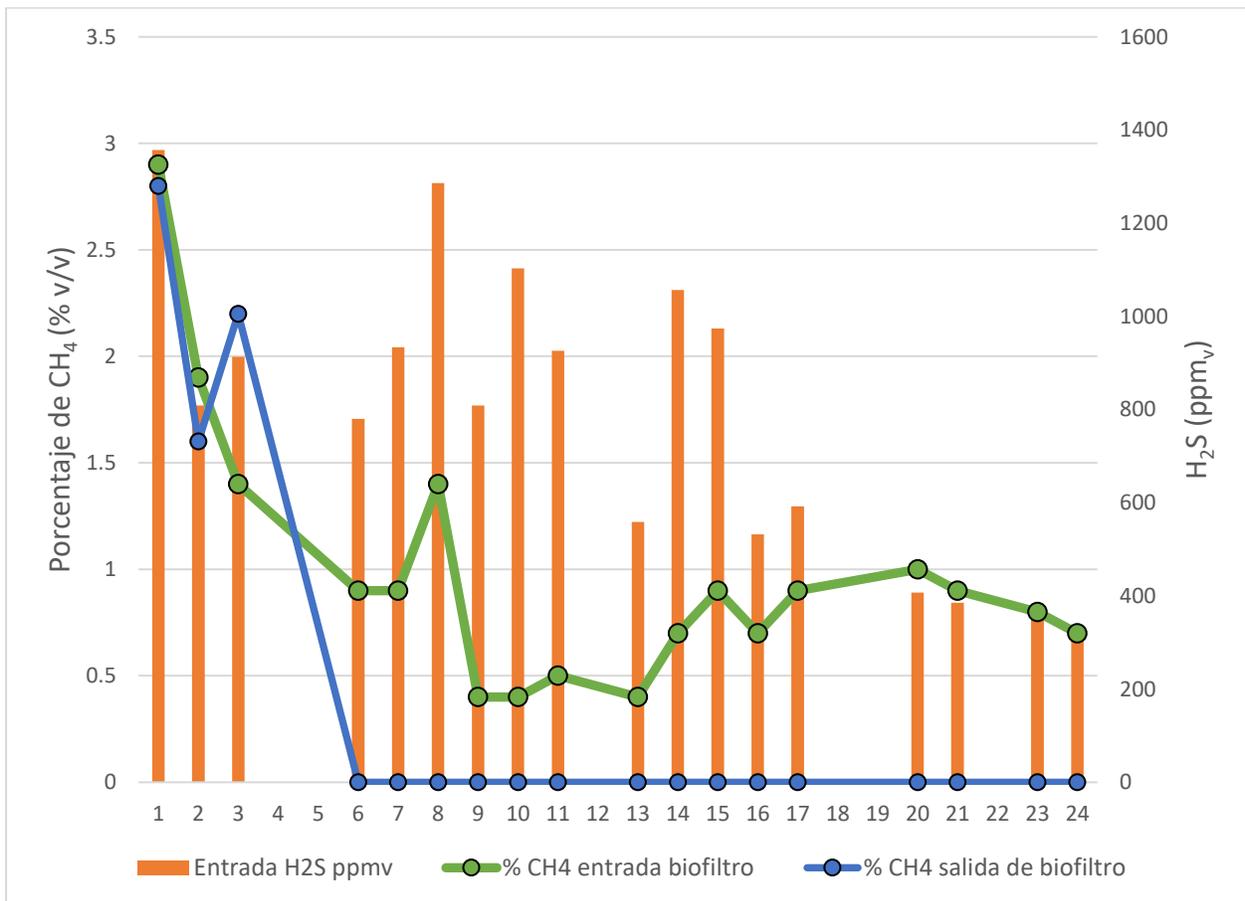


Figura 5.9 Porcentaje en volumen de CH_4 en la entrada y salida de biofiltro por día y la concentración de entrada al biofiltro de H_2S . Fase experimental 2 (H_2S entrada 783 ppm_v ±317)

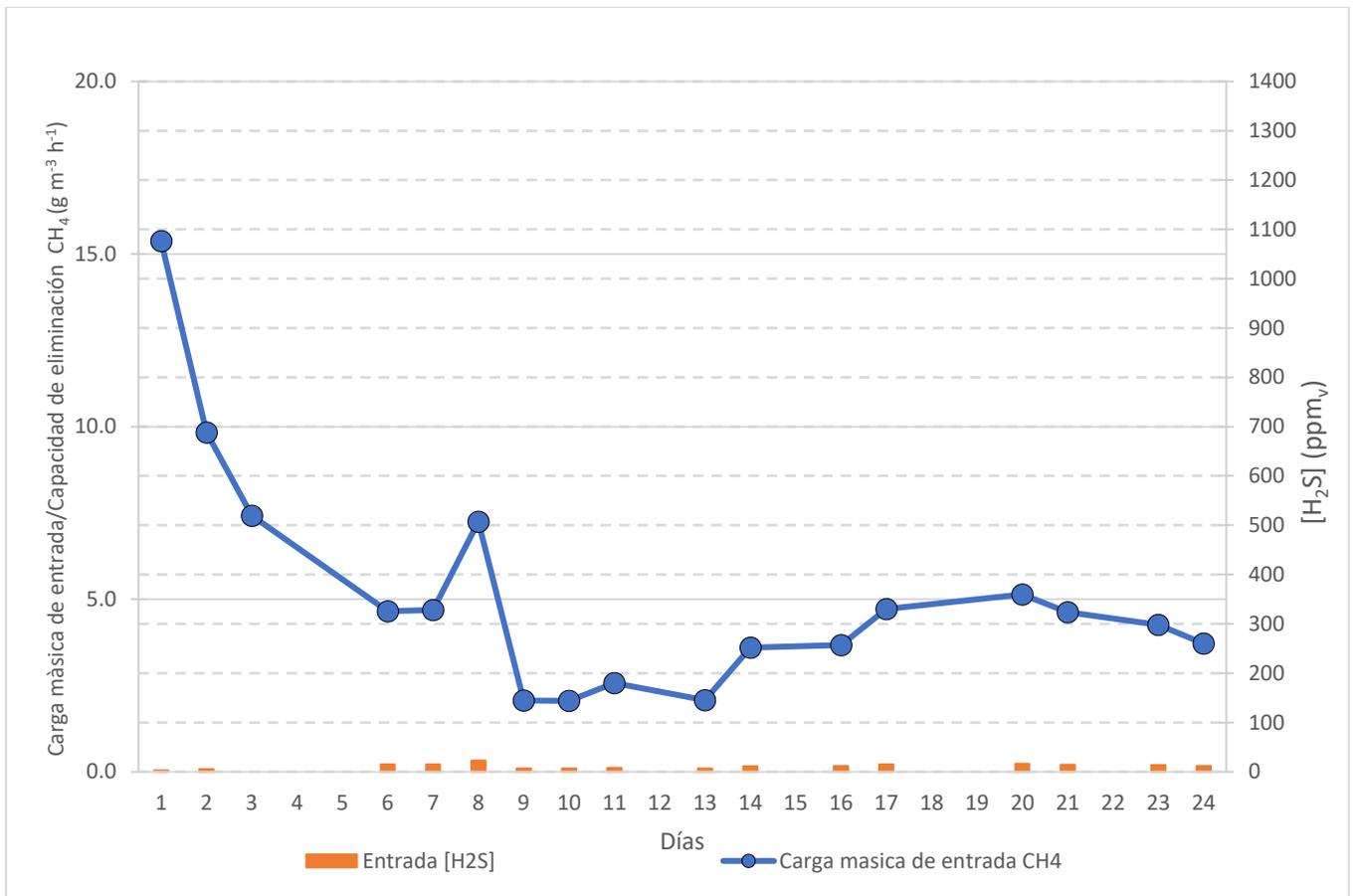


Figura 5.10. Carga másica de entrada y capacidad de eliminación de CH₄ y concentración de H₂S por día. Las gráficas de CM y CE se sobreponen a partir del día 7, indicando remoción del 100% en la fase experimental 2 (H₂S entrada ppm_v ±317).

La fase experimental comenzó con una capacidad de eliminación de CH₄ muy baja, asociada a altas concentraciones de H₂S (800 a 1350 ppm_v) y alimentación de metano por arriba de 1.5%, alcanzando 23 g m⁻³ h⁻¹ el día 08 (Figura 5.10), cuando se presentó una alta concentración de H₂S (1286 ppm_v). Después del día 9, cayó la carga másica de alimentación por debajo de los 16 g m⁻³ h⁻¹ (1.0% v/v de CH₄), obteniéndose una remoción del 100% a pesar de las altas concentraciones de H₂S entre los días 7 a 11, cuando se presentó la carga de alimentación de metano más baja (7 g m⁻³ h⁻¹ con 0.5% v/v de CH₄).

En trabajos similares, como el de Huete, 2017, se reportan que se afectó la capacidad de eliminación de metano al tener el biofiltro expuesto a concentraciones mayores de 500 ppm_v. En ese trabajo se aplicaron cargas másicas de entrada mayores a 40 g m⁻³ h⁻¹, reduciendo la capacidad de eliminación de CH₄ por debajo de los 20 gm⁻³h⁻¹. En contraste, en la fase experimental 2, la máxima carga másica alcanzada después de los días de adaptación fue de 23 g m⁻³h⁻¹ (1.4 % v/v), sugiriendo que la capacidad de eliminación con

carga másica entre $7\text{-}23\text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ (0.4-1.4% v/v) no se ve disminuida por la presencia de H_2S , permitiendo la completa remoción del CH_4 .

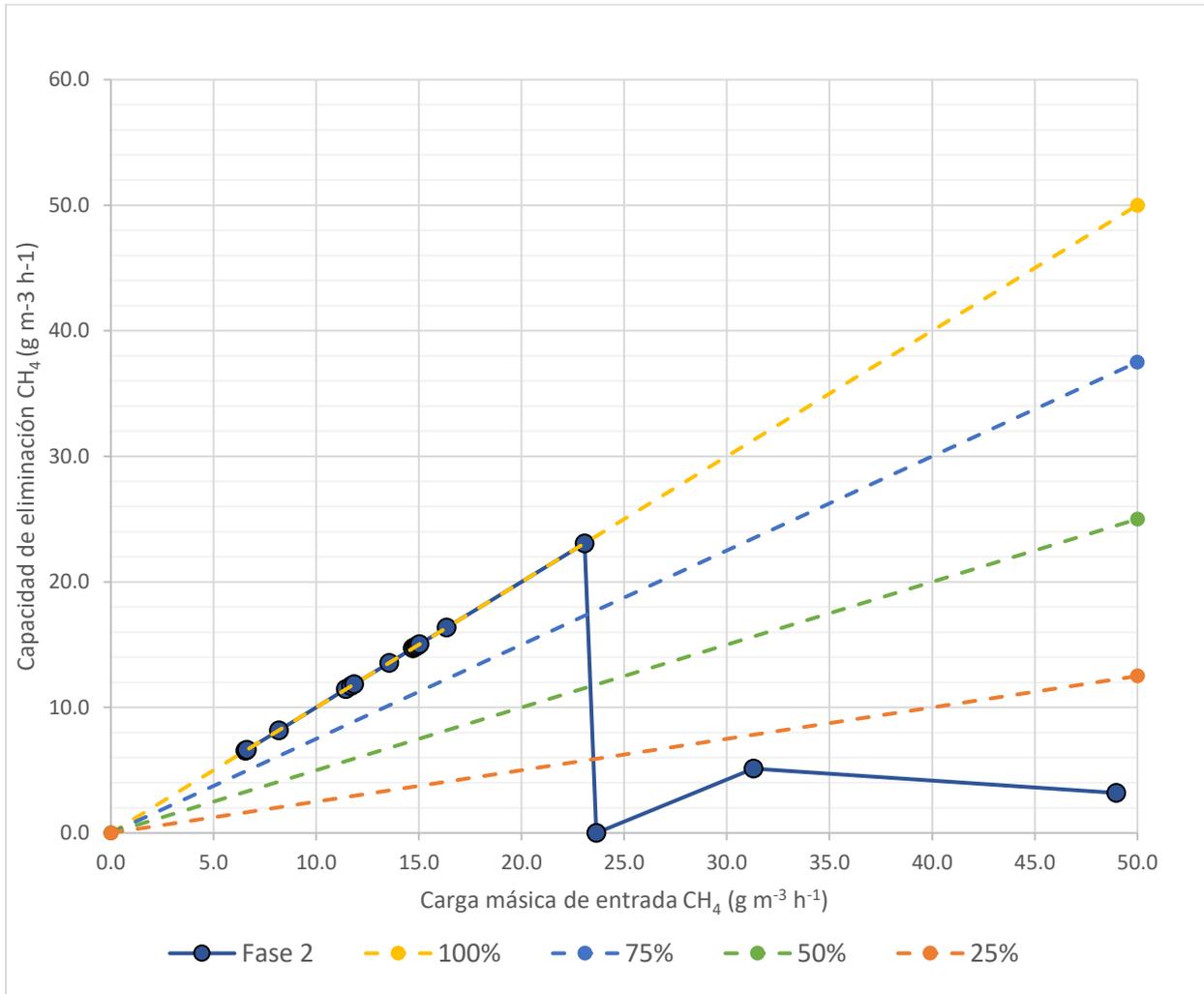


Figura 5.11. Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada en presencia de alto contenido de H_2S en la alimentación (H_2S entrada $783\text{ ppm}_v \pm 317$). Este gráfico muestra la eficiencia de remoción en la fase 2 y las líneas a cuatro valores de eficiencia.

En la figura 5.11 se puede observar la dependencia que existe entre la capacidad de eliminación y la carga másica de entrada en presencia de altas concentraciones de H_2S . A partir de una carga másica de entrada de $23.6\text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ (1.4 % v/v) se presenta una drástica disminución de la capacidad de eliminación de CH_4 , por debajo del 50%. Hay que hacer notar que los puntos con menor eficiencia de remoción (y mayores valores de carga) corresponden a los tres primeros días de la corrida, cuando el biofiltro aún no estaba plenamente activo.

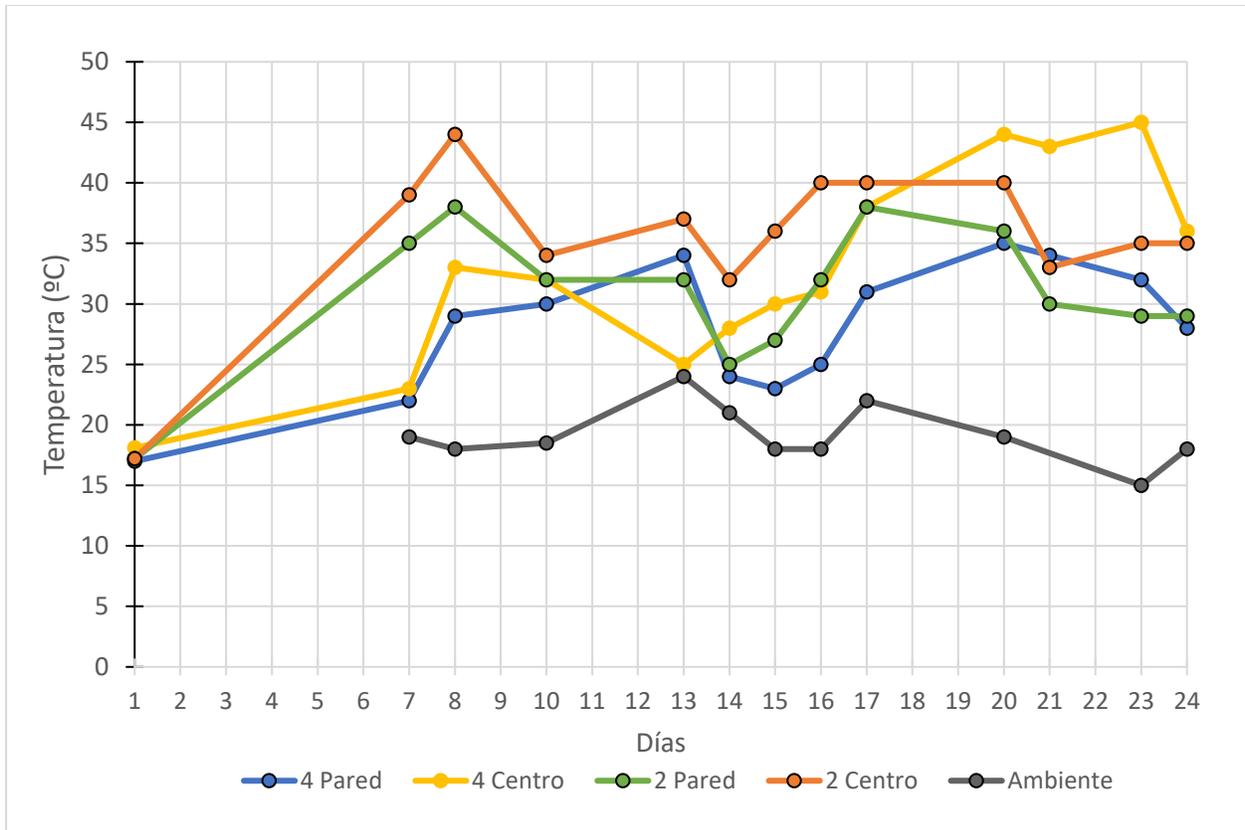


Figura 5.12 Temperaturas en los puntos de muestreo⁵ en cada día de la segunda fase experimental (H_2S entrada $783 \text{ ppm}_v \pm 317$).

En la Figura 5.12, la temperatura máxima fue 45°C el día 23 en la posición 4.2 (centro), seguida muy de cerca por el día 8, pero en el nivel 2.2 (centro) con 44°C . Este último corresponde con la máxima capacidad de eliminación en esa fase ($23 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$), seguido por $16 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ para el 23, cuando se presentó un periodo de alimentación de metano más estable (días 14 a 24, con cargas de entre 11 y $16 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$). Es notorio que la temperatura dentro del biofiltro en los niveles 4 y 2 estuvo sistemáticamente por encima de la temperatura ambiente. También que la temperatura en el nivel 4 al centro mantuvo una tendencia en ascenso durante prácticamente la totalidad de esta fase. La oxidación de CH_4 es un proceso exotérmico, por lo tanto, se refleja en el aumento de temperatura del medio (Huete et al., 2018). Es importante recordar que la temperatura se medía entre 10 y 11 de la mañana.

⁵ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

5.2.2 Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, por sus siglas en inglés)

El gel a continuación mostrado es del 6% de poliacrilamida en gradiente desnaturante 30-60% para esta fase experimental. Para esta fase, por complicaciones de extracción de DNA no se realizó el análisis para los puntos 2.1 y 4.1⁶, por lo que no se realizaron los análisis correspondientes.

El gel (Figura 5.13) corresponde a la fase experimental 2 en la cual se alimentó el biofiltro con una carga másica promedio de entrada de metano 11.6 ± 11.5 (entre $7-49 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), una CE promedio de metano $10.8 \pm 5.6 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y una concentración promedio de H_2S $783 \pm 317 \text{ ppm}_v$.

De la fase 2, se cortaron 15 bandas. En la imagen se puede observar un mayor número de bandas. Sin embargo, hubo complicaciones para realizar su corte, como la dificultad para mantener la integridad de la banda o para realizar la extracción y purificación del DNA correspondiente.

⁶ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

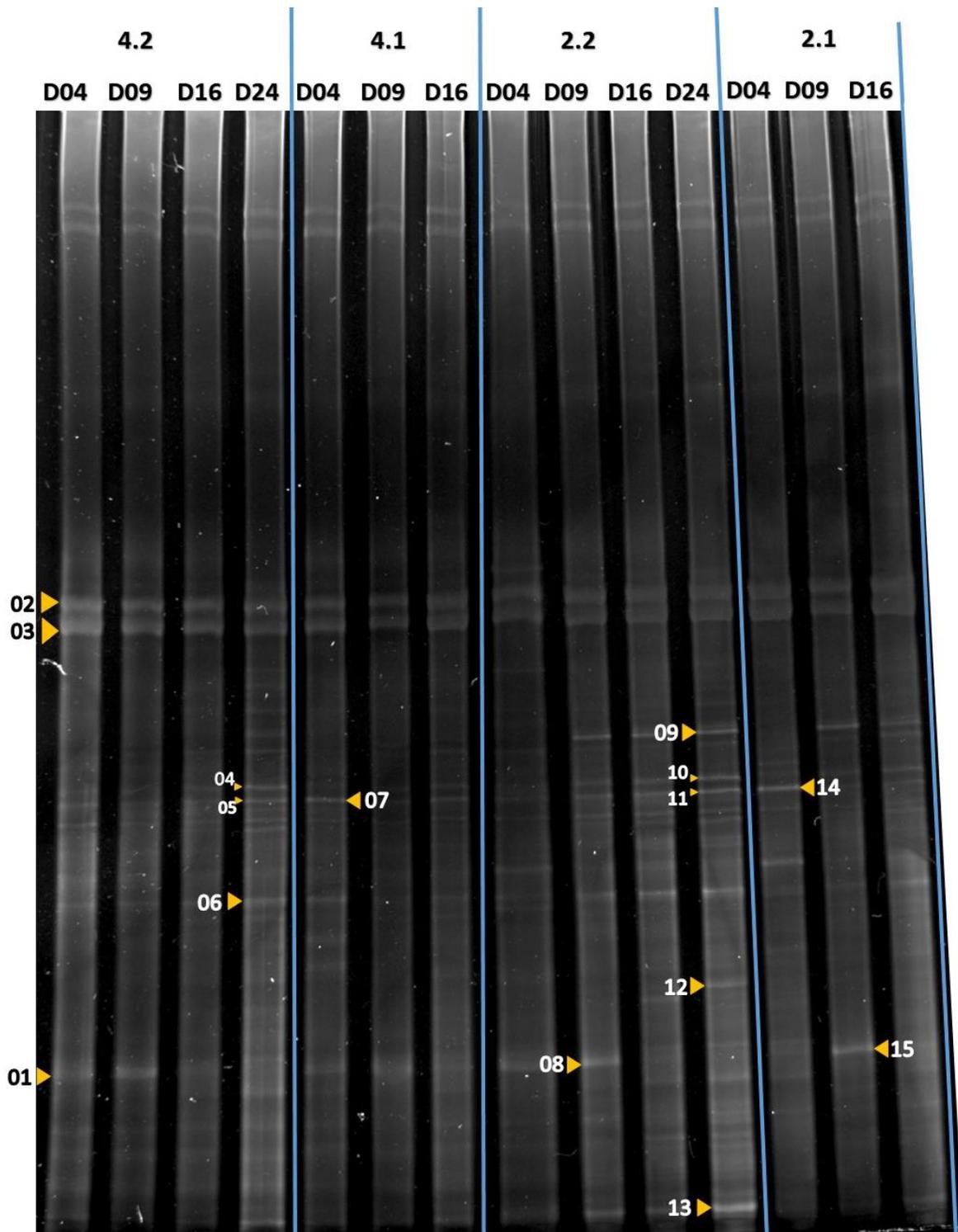


Figura 5.13 Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras⁷ de la Fase Experimental 2 (C2) a diferentes días, indicando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar. D04: Día 04, D09: Día 09, D16: Día 16, D24: Día 24.

⁷ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

5.2.3 Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida

Para esta sección se presentan los valores del índice de Jaccard, análisis de dendogramas y los índices de organización de la comunidad (C_o) obtenidos del perfil de bandeo de la imagen 7.10 presentada en anexos, para la fase experimental 2.

Los valores del índice de Jaccard se comparan entre diferentes tiempos de muestreo manteniendo el mismo sitio de muestreo (cuadrantes en la diagonal central), así como en diferentes puntos de muestreo con los mismos tiempos de muestreo (cuadrantes en el triángulo derecho de la diagonal central). De acuerdo con la Figura 5.14, donde se muestran los valores de Jaccard de la Fase 2 experimental (carga másica de entrada de CH_4 promedio $16.4 \pm 6.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $[\text{H}_2\text{S}]$ promedio $783 \pm 317 \text{ ppm}_v$), para el punto 4.2 (centro) se presentó una mayor diferencia entre perfil de bandas entre los días 04 y 09 con el día 24, con valores de $J=0.35$ en ambos casos. Esto sugiere que esta zona se vio más afectada por la alimentación de metano que el nivel 2.2 (centro) en el transcurso del tiempo. En ese punto, la mayor diferencia se dio entre el día 4 y 24, con un valor de J de 0.41.

Las muestras que mostraron mayor diferencia en un mismo día con relación a los días anteriores en un mismo punto de muestreo fueron las correspondientes al punto 4.2 (centro) en el día 24 (J entre 0.35 y 0.38), indicando un marcado cambio de la comunidad microbiana respecto al espacio a lo largo de la experimentación. En los puntos 4.1 y 2.1 (posiciones de las orillas del biofiltro) no se logró una extracción de DNA de una adecuada calidad, lo que impidió que se analizara los días 24 para estas muestras. Sin embargo, se observa que no hay variación tan marcada en la comparación de comunidades microbianas hasta el día 16, manteniéndose estos puntos de muestreo con una comunidad parecida.

Jaccard		4.2				4.1			2.2				2.1		
		D04	D09	D16	D24	D04	D09	D16	D04	D09	D16	D24	D04	D09	D16
4.2	D04	1.00	0.45	0.50	0.35	0.58			0.36				0.36		
	D09		1.00	0.80	0.35		0.67		0.47					0.60	
	D16			1.00	0.38			0.50			0.41				0.57
	D24				1.00							0.30			
4.1	D04					1.00	0.64	0.57	0.47				0.47		
	D09						1.00	0.64		0.50				0.67	
	D16							1.00			0.67			0.53	
2.2	D04								1.00	0.67	0.47	0.41	0.57		
	D09									1.00	0.75	0.62		0.57	
	D16										1.00	0.55		0.53	
	D24											1.00			
2.1	D04												1.00	0.46	0.53
	D09													1.00	0.54
	D16														1.00

Figura 5.14. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 2 Experimental.

Análisis de dendrogramas.-A partir del dendrograma de la fase experimental 2 (Figura 5.15) se observa que hubo formación de 4 agrupamientos, con una similitud mayor a 0.70. En el clúster 4 se ubicaron la mayoría de las muestras, quedando separadas las muestras de los niveles 2.2 (centro) del día 24 (clúster 1); 4.1 (orilla) del día 04 y 4.2 (centro) del día 24 (clúster 2); y 4.2 (centro) del día 04 (clúster 3). Es notorio que no se presentaron diferencias marcadas en los días intermedios de la experimentación (9 y 16), incluidos los dos puntos del nivel 2 en el día 4 que tampoco mostraron diferencias (todos ellos agrupados en el clúster 4). Las diferencias se presentaron en el día 24 (puntos 2.2 y 4.2). La similitud entre los puntos 4.1 día 4 y punto 4.2 día 24 no tiene una explicación evidente. Esta fase presentó a partir del día 9 una baja concentración de CH₄ en su alimentación (0.4%) que llegó a 1% en el día 20, lo que representa una baja carga en esos días (7 a 16 g m⁻³ h⁻¹), alcanzando el 100% de la remoción de metano. La limitación de sustrato ejerció menor presión de cambio en el sistema, lo que se ve reflejado en alta similitud de sus comunidades a lo largo del tiempo y para la mayor parte de los puntos de muestreo. La mayor diferencia en el perfil de bandeo del punto 2.2 al término de la fase 2 (día 24), puede asociarse a que este punto (nivel bajo, centro), contó con mayor disponibilidad de sustrato al encontrarse en el nivel más próximo al punto de ingreso del gas.

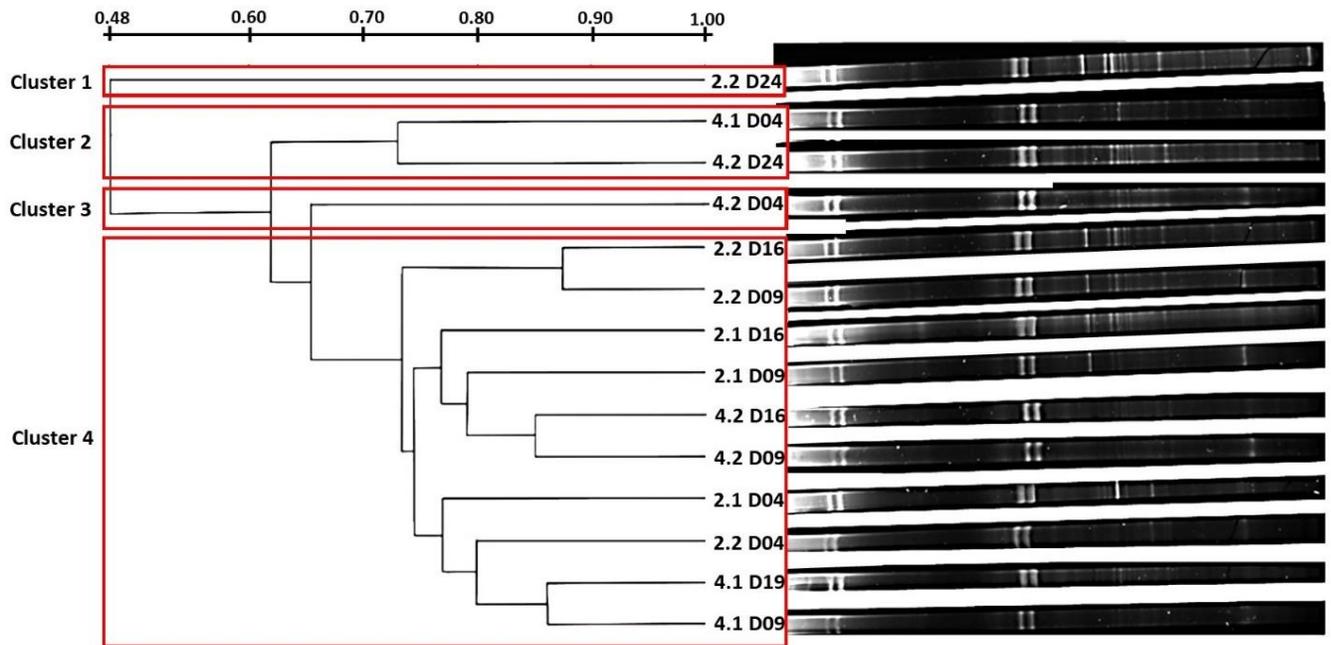


Figura 5.15. Dendrograma de distancias. Fase experimental 2 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los clústeres con similitud mayor a 0.7.

Índices de organización de la comunidad. -En la Figura 5.16, se presentan los valores de C_o de la fase 2 experimental (carga másica de entrada de CH₄ entre 16.4±6.2g m⁻³ h⁻¹ y [H₂S] promedio 783±317 ppm_v). Siguiendo los criterios establecidos anteriormente y asociados

a C_o , se encuentra en la sección 3.3.6, estos valores se encuentran dentro de un intervalo 23.8-29.4% y son menores que los obtenidos en la Fase 1 (29-39.8%) indicando que se desarrolló una comunidad microbiana más uniforme en la Fase 2. Al ser una comunidad uniforme existe mayor probabilidad de que esté presente algún microorganismo tolerante a las perturbaciones ambientales (Carballa et al., 2011).

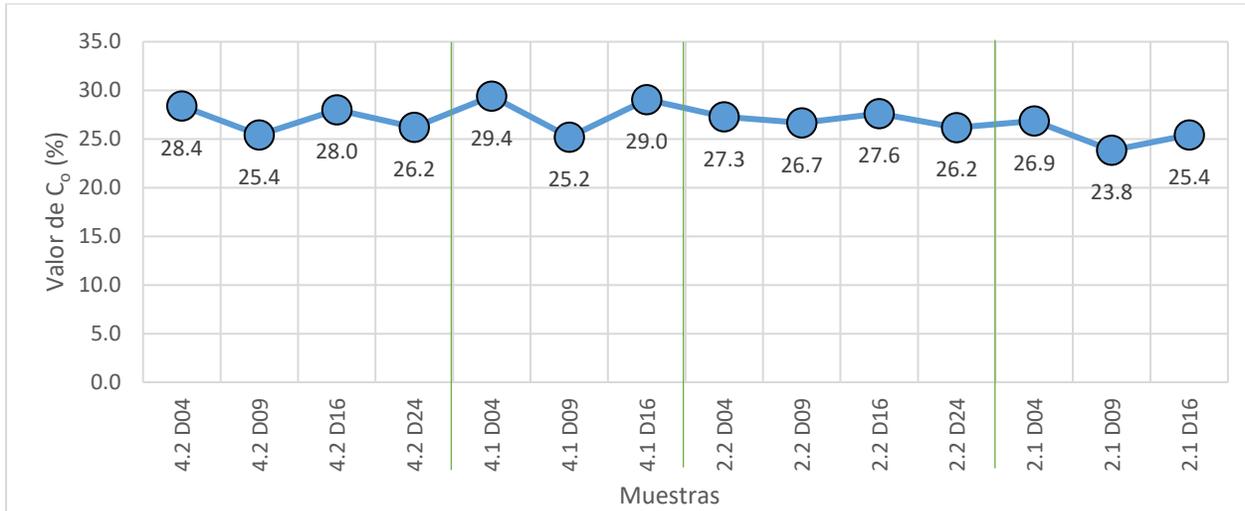


Figura 5.16. Valores de C_o de la Fase 2 experimental.

5.3 Tercera Etapa de Operación (Fase 3)

5.3.1 Resultados fisicoquímicos

A continuación, en la Figura 5.17 se muestra el porcentaje v/v de CH₄ que ingresó y salió del biofiltro a lo largo de los 29 días de duración de esta fase experimental, en la que no hubo presencia de H₂S. Se observa que no se alcanzó una total remoción de metano y el pico máximo de concentración de CH₄ que ingresó fue de 2.5% (v/v) y el mínimo fue 1.2% (v/v). En esta fase experimental se realizaron 3 mediciones por día, por esta razón, aparecen mayor número de datos.

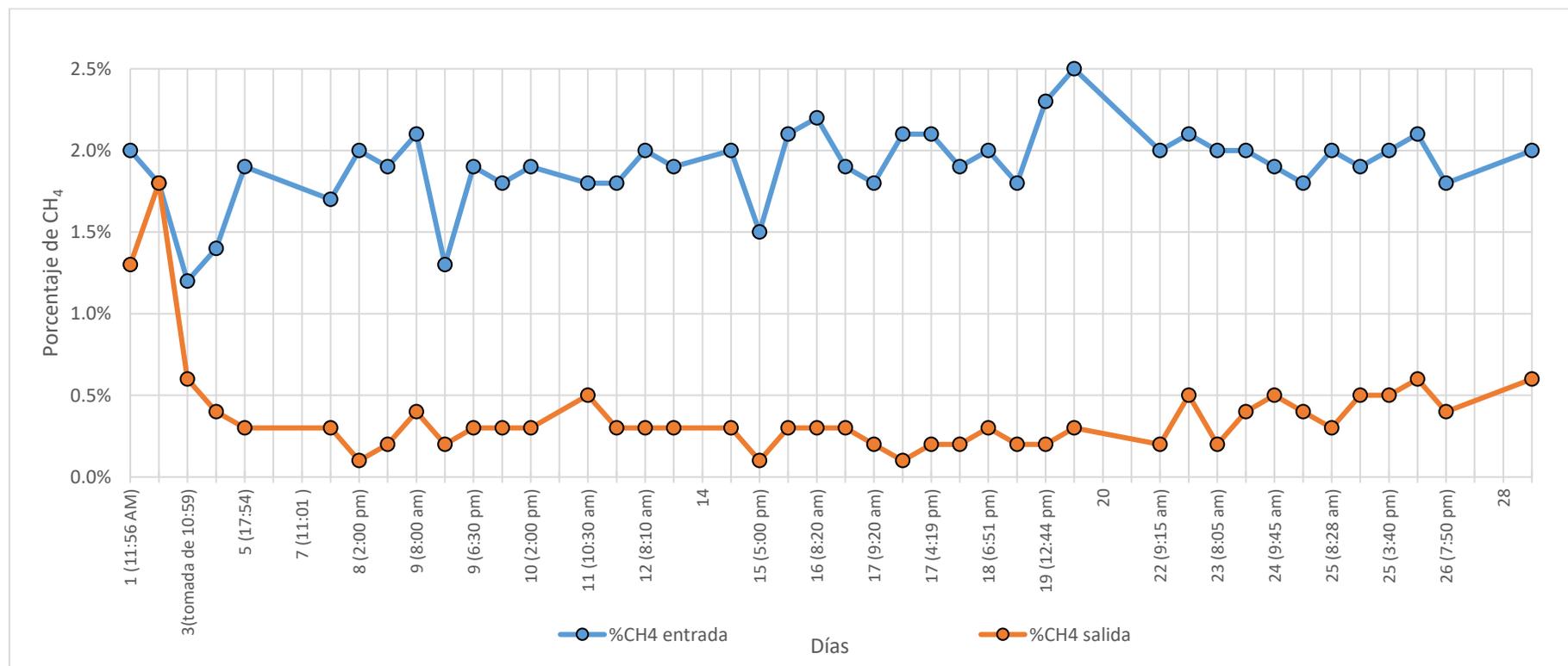


Figura 5.17. Porcentaje en volumen de CH₄ en la entrada y salida de biofiltro por día. Fase experimental 3 (sin H₂S).

En la Figura 5.18, puede observarse la carga másica de entrada y la capacidad de eliminación de CH₄ durante la operación. La variación en la concentración de entrada es menor que en las dos fases anteriores, debido a que la mezcla metano-aire fue controlada. Se realizaron mediciones de metano a la entrada y a la salida tres veces al día (mañana, mediodía y tarde). Debido a problemas técnicos con la alimentación del biofiltro con la mezcla de metano (la cual fue corregida el mismo día), la muestra del día 11 a las 08:00 horas no fue tomada. Se observa una CE mayor a 20 g m⁻³h⁻¹ en general durante la fase experimental. La máxima capacidad de eliminación fue de 35.6 g m⁻³h⁻¹ del día 19 a las 08:00 pm, manteniéndose una tendencia que seguía las variaciones de la carga másica de entrada de CH₄.

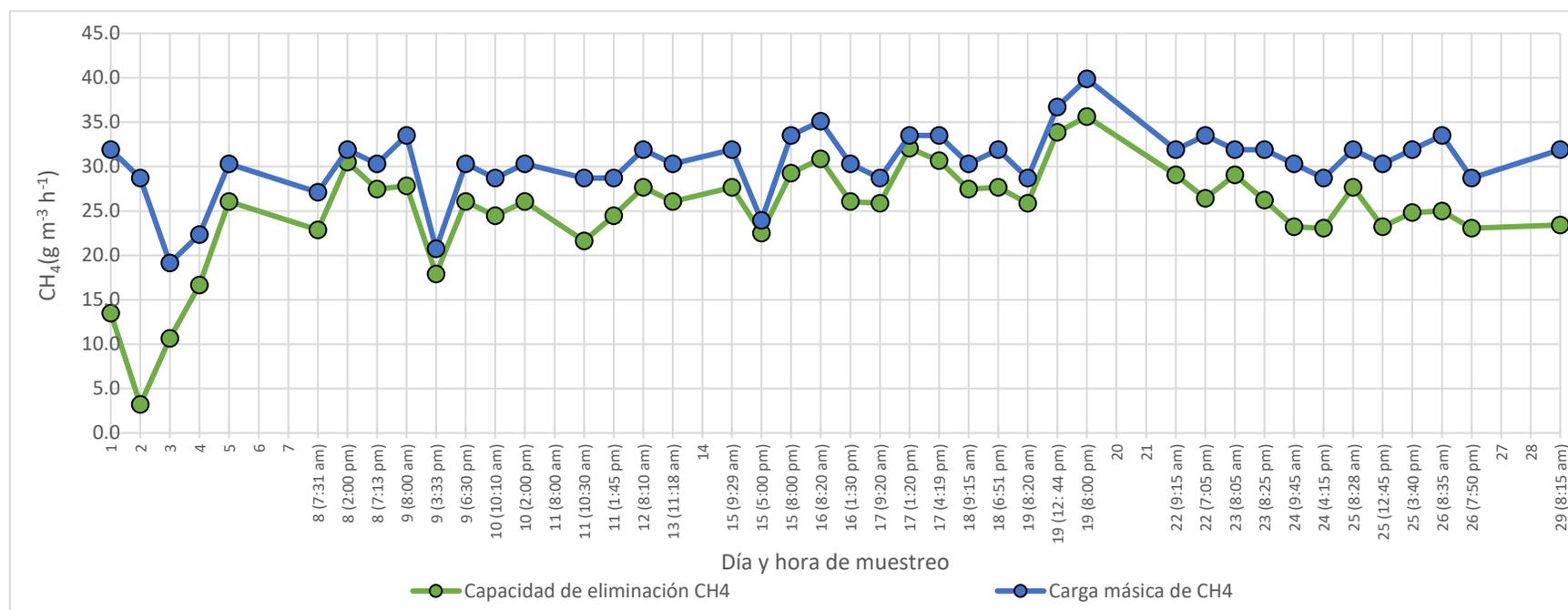


Figura 5.18. Capacidad de eliminación de CH₄ del biofiltro en diferentes días y horas de toma de muestra. En la Fase Experimental 3 (sin H₂S) se aumentó la toma de muestra de gas a 3 veces al día.

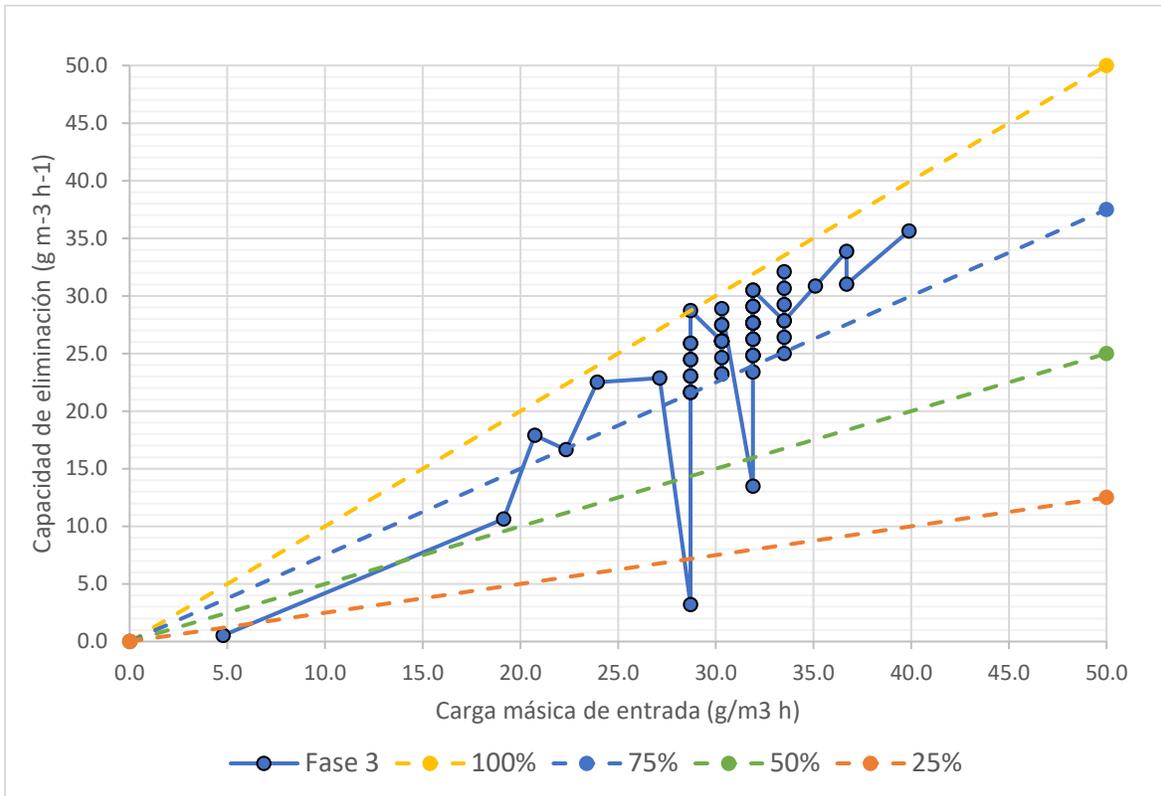


Figura 5.19 Capacidad de eliminación de metano respecto a la carga másica de entrada. Este gráfico muestra la eficiencia de remoción de la Fase 3 (sin H₂S).

La figura 5.19 muestra un comportamiento de capacidad de eliminación superior al 75%, aun a cargas altas, por encima de los 30 g m⁻³ h⁻¹. Los puntos donde se observan eficiencias de eliminación menores al 50% corresponden a los primeros dos días de la fase experimental. Aparentemente, la mayor carga de alimentación aplicada en esta Fase, más la ausencia de H₂S, permitieron mantener mayores CE en comparación con las fases 1 y 2.

La temperatura dentro del biofiltro se midió con el apoyo de sensores de temperatura que se colocaron en el seno del material de empaque en 4 distintos puntos. En la Figura 5.20, se observan los cambios de temperatura registrados, con 3 valores al día. En el día 22 se observa una disminución de las medidas tomadas por los sensores de temperatura; esto se asocia con una fuerte lluvia que se presentó en el día de toma de muestra, lo que aparentemente afectó a todos los sensores. Posteriormente, algunos de ellos volvieron a una operación normal, aunque no todos; por ejemplo, el sensor 2.2 (centro) tuvo medidas de hasta 80°C lo cual no es una medida confiable para el seno de composta.

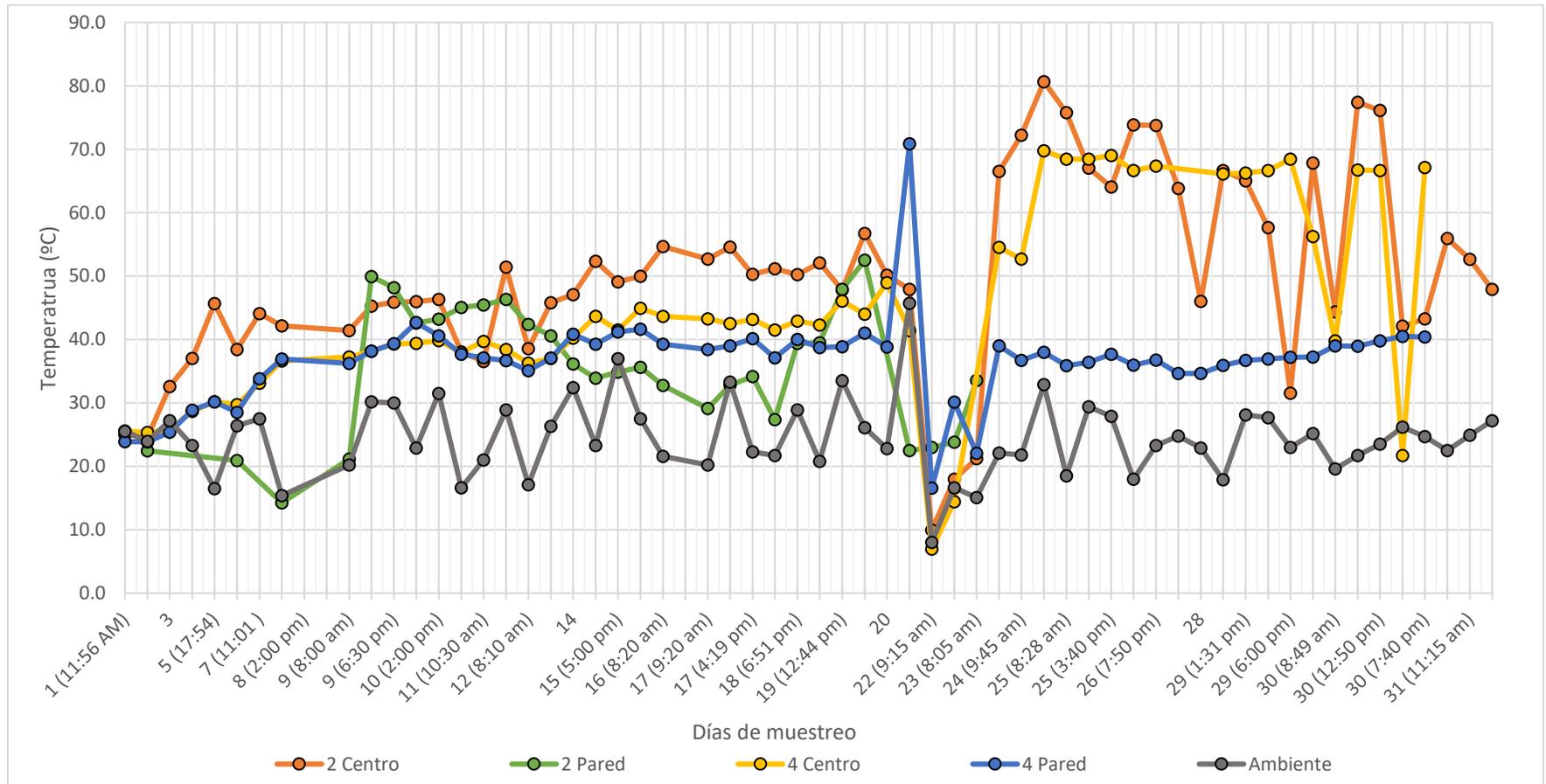


Figura 5.20. Valores de temperatura dentro del biofiltro y del ambiente por día y ciertas horas de la operación de la fase experimental 3 (sin H₂S). Las lecturas de los sensores 2.2 (centro) y 4.2 (centro) no son confiables a partir del día 23.

Con respecto al cambio de temperaturas dentro del biofiltro, los dos puntos del nivel superior del biofiltro (4.1 y 4.2) presentan un comportamiento similar durante los primeros 20 días. Sin embargo, a partir del día 24, y como resultado de un posible desperfecto mencionado en el párrafo anterior, se registró un incremento en la temperatura en el punto 4.2 (centro), llegando a una temperatura máxima de 69.8°C. El sensor 4.1 (pared) ya no se recuperó. Este valor pudo verse influenciado por las fallas técnicas de los sensores, como ya se mencionó, llevando a una lectura errónea.

Las temperaturas en el punto 2 del biofiltro en el centro (2.2) y en la pared (2.1) registran una mayor variación entre ellas desde el arranque, solo con valores similares en el periodo del día 9 al 11. A partir de ese día, la temperatura en 2.1 (pared) de ese nivel se mantuvo por debajo de los 40°C, para volver a ascender hasta 52°C, prácticamente igualando la alcanzada por el punto 2.2. Posteriormente cae, y unos días después presenta un desperfecto que lo inutiliza. Por su parte, el sensor del centro del nivel 2 (punto 2.2), registró la mayor temperatura prácticamente durante toda la fase experimental, sobre los 50°C (días 15 a 20), hasta el día en que hubo la fuerte lluvia ya mencionada. Al día siguiente, la temperatura se incrementa en escasos dos días, alcanzando hasta 80.7°C del día 24, indicando una posible falla.

En la Figura 5.20, se observa que los puntos en el centro del biofiltro presentan una temperatura mayor que en los puntos cercanos a las orillas, con valores que indican que esa zona está inhibida por la alta temperatura, sugiriendo que la actividad metanótrofa se realiza en la periferia del medio de composta, donde las temperaturas son menores de 40°C, salvo unos días en el nivel 2.1, de acuerdo con el sensor activo en el nivel 4 pared. La oxidación del metano libera calor metabólico, que se transporta por convección hacia las capas superiores debido al flujo de gas alimentado, y por conducción hacia el centro del biofiltro y hacia el exterior. El gradiente de temperatura que se crea en ambas direcciones favorece el transporte de calor hacia el ambiente a través de la pared del biofiltro. Puede también inferirse que la corriente de gas tratado no enfría lo suficiente el centro, en donde se establece un equilibrio producto del calor metabólico producido en la zona activa inferior, transportado por convección, el propio de esa zona, limitado por la inhibición de la reacción biológica debido a la alta temperatura, con el transportado por conducción hacia la zona perimetral debido al gradiente de temperatura y el retirado por convección de la corriente de gas hacia la salida.

5.3.2 Separación de fragmentos por electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, por sus siglas en inglés)

El gel a continuación mostrado es del 6% de poliacrilamida en gradiente desnaturante 30-60% para esta fase experimental.

El gel (Figura 5.21) corresponde a la fase experimental 3 en la cual se alimentó el biofiltro con una carga másica promedio de entrada de metano $30.6 \pm 3.5 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, una CE promedio de metano 25.4 ± 5.3 entre $\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y sin presencia de H_2S .

De la fase 3 se cortaron 40 bandas. En la imagen se puede observar un mayor número de bandas. Sin embargo, hubo complicaciones para realizar su corte, como la dificultad para mantener la integridad de la banda o para realizar la extracción y purificación del DNA correspondiente. En esta fase existieron mayor número de bandas cortadas que en las fases anteriores, y se observó que varias bandas fueron identificadas con el mismo tipo de microorganismo.

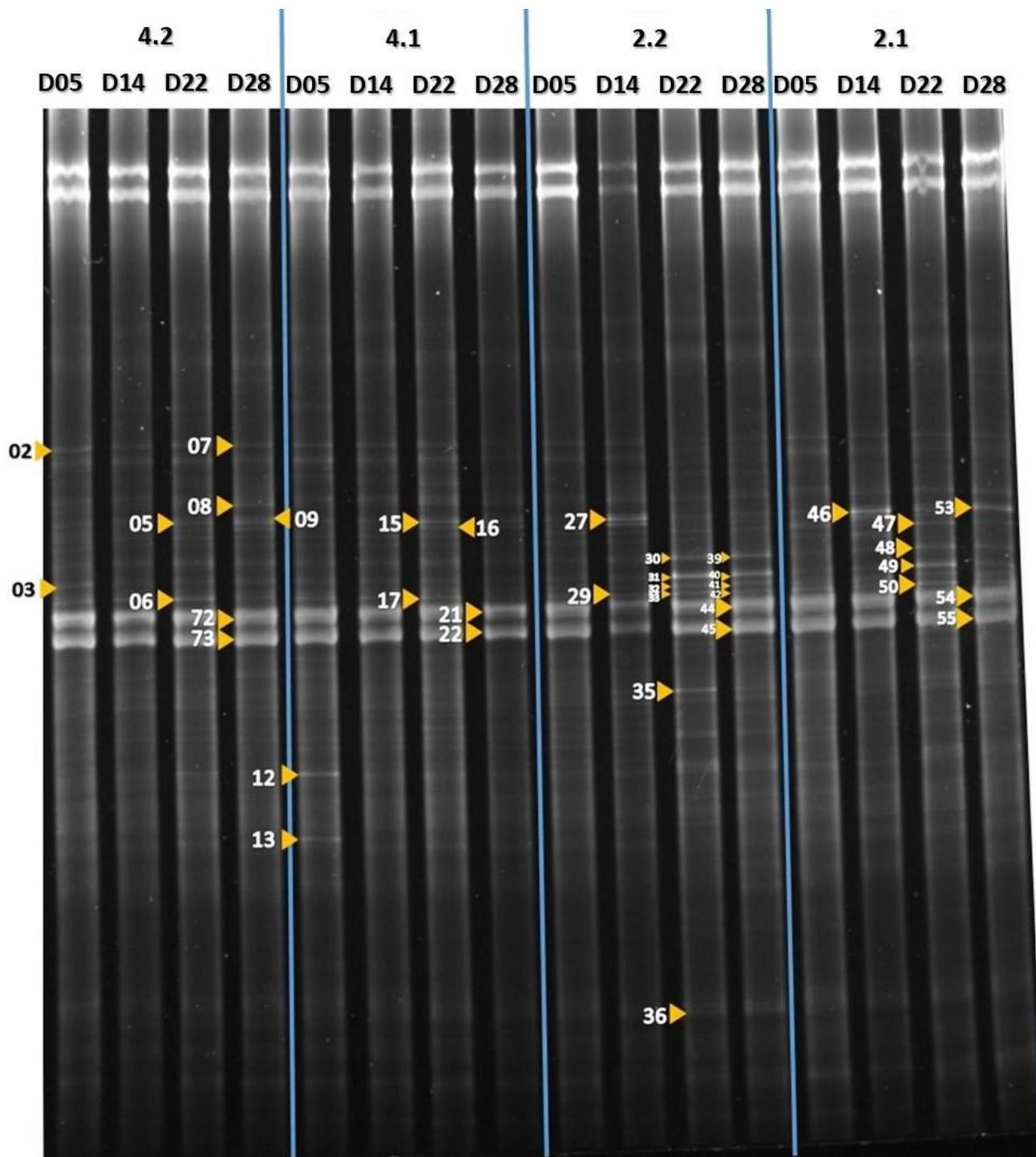


Figura 5.21 Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% de las muestras⁸ de la Fase Experimental 3 (C3) a diferentes días, marcando las bandas que fueron cortadas y purificadas para secuenciar. Las muestras del tiempo 00 no se pudieron analizar en el gel de DGGE. D05: Día 05, D14: Día 14, D22: Día 22 y D28: Día 28

⁸ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

5.3.3 Análisis de perfil de bandas en geles de poliacrilamida

Para esta sección se presentan los valores del índice de Jaccard, análisis de dendogramas y los índices de organización de la comunidad (C_o) obtenidos del perfil de bandeo presentado en la Figura 5.21, para la fase experimental 3.

Los valores del índice de Jaccard se comparan entre diferentes tiempos de muestreo manteniendo el mismo sitio de muestreo (cuadrantes en la diagonal central), así como en diferentes puntos de muestreo con los mismos tiempos de muestreo (cuadrantes en el triángulo derecho de la diagonal central).

De acuerdo con la Figura 5.22, donde se muestran los valores de Jaccard de la Fase 3 experimental (carga másica de entrada de CH_4 $30.6 \pm 3.5 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y sin presencia de H_2S) el punto 2 centro (2.2) entre los días 05 y 29, fue el que mostró mayor diferencia respecto al tiempo en todos los puntos de muestreo ($J=0.19$), seguido de cerca por el día 22 ($J=0.22$). Esto puede explicarse por el hecho que este punto recibiría de una manera más directa la alimentación de la corriente gaseosa con metano. El punto en ese nivel, correspondiente a la orilla (2.1), presentó la mayor variación al día 22, en comparación con el día 5 ($J=0.38$). Por su parte, el nivel superior alcanzó su máxima variación en el valor del índice en el punto 4.1⁹ entre los días 14 y 22 ($J=0.35$) y los días 5 y 29 ($J=0.36$). Aparentemente, el nivel superior los cambios estuvieron asociados a la orilla del sistema, probablemente debido al efecto de pared (menor resistencia al flujo y, por lo tanto, formación de caminos preferenciales) que se presenta en lechos empacados.

La mayor variación en un mismo día de toma de muestra fue en el día 14 entre los puntos centrales de ambos niveles (2.2 y 4.2 con $J=0.10$). Esto parece apoyar lo observado en el párrafo anterior, en el sentido que el nivel bajo al centro recibía la corriente gaseosa adecuadamente, mientras que, en el nivel superior, se favorecía el flujo por las paredes del biofiltro, dejando el centro con menor alimentación. Además, en el punto 2.2 se registró un pico en la temperatura de 51.4°C , comparado con el máximo alcanzado en el punto 4.2, que no pasó de los 40°C hasta antes del día 14 (Figura 5.20). Otro cambio importante en el índice de Jaccard se dio en el día 29 entre los puntos 2.2 y 4.1 ($J=0.23$), los puntos en donde se infiere se presentaba mayor flujo de gas y por ende de sustrato.

⁹ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

Jaccard		4.2				4.1				2.2				2.1			
		D05	D14	D22	D29												
4.2	D05	1.00	0.55	0.44	0.41	0.54				0.67				0.32			
	D14		1.00	0.41	0.39		0.73				0.10				0.40		
	D22			1.00	0.63			0.40				0.50				0.36	
	D29				1.00				0.35				0.46				0.47
4.1	D05					1.00	0.47	0.39	0.36	0.58				0.38			
	D14						1.00	0.35	0.42		0.44				0.47		
	D22							1.00	0.54			0.55				0.39	
	D29								1.00				0.23				0.36
2.2	D05									1.00	0.33	0.22	0.19	0.41			
	D14										1.00	0.55	0.46		0.47		
	D22											1.00	0.77			0.48	
	D29												1.00				0.42
2.1	D05													1.00	0.45	0.38	0.45
	D14														1.00	0.48	0.60
	D22															1.00	0.55
	D29																1.00

Figura 5.22. Valores de Jaccard obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 3 Experimental.

Análisis de dendogramas.- En la Figura 5.23 se puede observar, para la fase 3, la presencia de 3 *clústeres* con una similitud mayor a 70%. Las muestras que se diferenciaron más en el perfil de bandeo fueron 2.1 (orilla) del día 22 y 2.2 (centro) del día 14. El resto de los puntos se engloban en un gran *clúster* que puede diferenciarse si se considera el criterio de similitud mayor a 70%. En tal caso, se distinguen 3 *clústeres*. Las muestras aisladas se interpretan como resultado de un cambio transitorio en las condiciones ambientales de ese punto fuera del patrón.

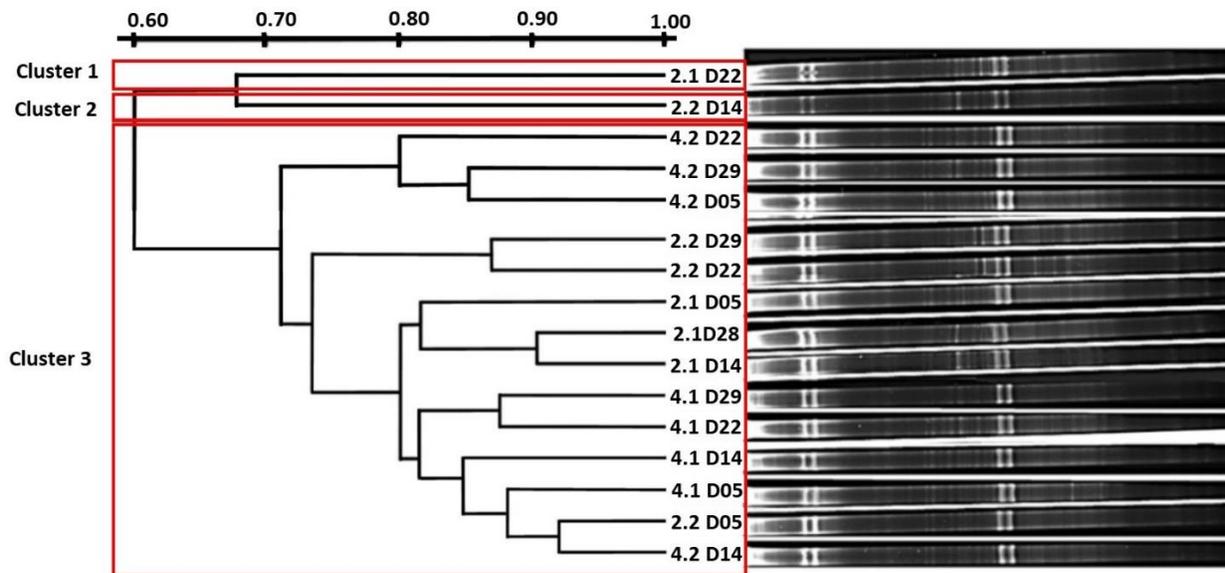


Figura 5.23 Dendrograma de distancias. Fase experimental 3 usando el método UPGAMA. Se encuentran marcados los grupos (*clústeres*) con similitud mayor a 0.7.

Índices de organización de la comunidad.- En la Figura 5.24, se observan los valores de C_o de la fase 3 experimental (carga másica de entrada de CH_4 promedio entre $30.6 \pm 3.5 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y ausencia de H_2S). En esta fase experimental, las muestras revelan una comunidad en cierta medida equilibrada, con valores del índice de entre 23.8 y 33.6, cercanos a los registrados en la Fase 2 (23.8 – 29.4). La variación más evidente se dio en el punto 2.2 (centro) con un descenso del índice al día 14 (23.8%) para incrementarse a 30.5% y permanecer en ese nivel hasta el final. El punto 2.1 (orilla) presentó un patrón semejante, pero desfasado al día 22 (26.7%).



Figura 5.24 Valores de C_o de la Fase 3 experimental.

5.4 Evaluación General de la Operación

5.4.1 Parámetros fisicoquímicos

En la figura 5.25 se observan los porcentajes de remoción de metano en las 3 diferentes condiciones de alimentación de H_2S , así como la carga alimentada de metano. Los datos están expresados a lo largo del periodo de operación para cada fase experimental, siendo el origen de la gráfica, el arranque de cada una de ellas. Para la fase 1 ($[\text{H}_2\text{S}]$ promedio 333 ± 188 ppm_v) se observan fluctuaciones importantes en el porcentaje de remoción, debido a la variable carga másica de metano que ingresó, entre $5\text{-}50$ g m⁻³ h⁻¹ (carga másica promedio de CH_4 17.3 ± 12.1 g m⁻³ h⁻¹). Para la fase 2 ($[\text{H}_2\text{S}]$ promedio 783 ± 317 ppm_v) se observa un porcentaje de remoción de prácticamente el 100%, esto debido a que la carga másica de metano alimentada fue menor a 25 g m⁻³ h⁻¹ (carga másica promedio de CH_4 11.6 ± 11.5), favoreciendo la remoción total de metano. Para la fase 3 (ausencia de H_2S), la carga másica de metano de entrada fue relativamente estable con la carga másica promedio de entrada de metano más elevada (30.6 ± 3.5 g m⁻³ h⁻¹), ya que se tuvo un mejor control sobre este parámetro. Aun así, son notorias las fluctuaciones en el porcentaje de remoción de metano, lo que podría atribuirse a los cambios de temperatura dentro del biofiltro. La CE promedio de metano para la fase 3 fue 25.4 ± 5.3 g m⁻³ h⁻¹.

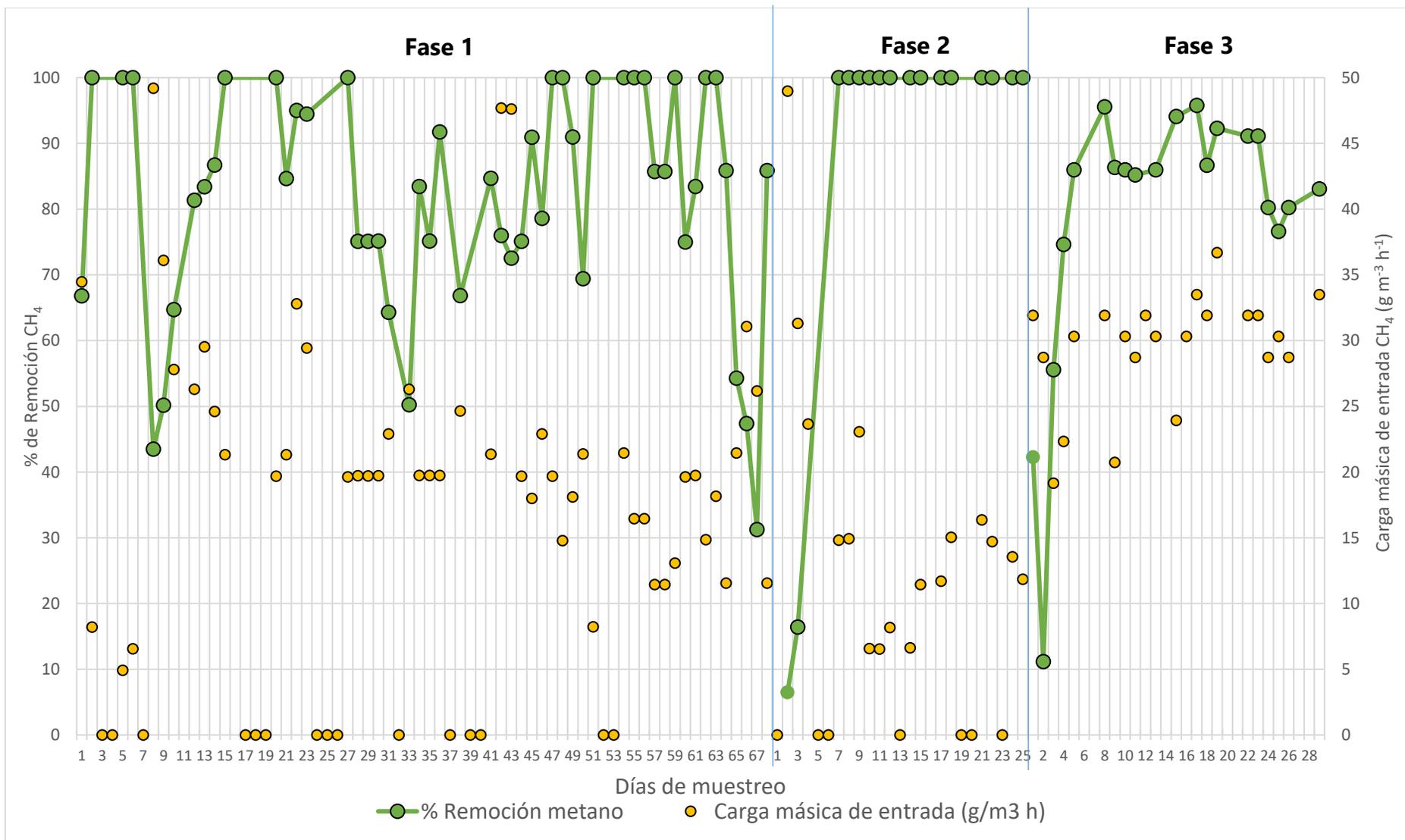


Figura 5.25 Comparación de los porcentajes de remoción de metano en cada fase experimental, mostrando las cargas másicas de entrada de metano.

En la Tabla 5.1 se muestran los valores de pH y porcentaje de humedad al término de cada fase experimental. En la fase experimental 1 se puede observar que el punto 1 presentó un bajo valor de pH. Esto es debido a la presencia de H₂S que es oxidado en los primeros centímetros de medio filtrante, produciendo sulfatos y el resultado de la quimilitotrofia del azufre es la acidificación del medio. Esta observación se refuerza con el valor obtenido en la fase 2, alimentada con mayor concentración de ese gas a la entrada, con un valor todavía inferior de pH. En el resto de los puntos de muestreo los valores de pH se encuentran en un intervalo adecuado, entre 7.26 y 7.89 para las 3 fases experimentales.

Este dato es muy relevante, ya que permite inferir que la oxidación del H₂S se limitaba a la zona inferior del biofiltro, en los primeros centímetros del lecho, lo que evitaría la eventual inhibición de los metanótrofos en las zonas superiores del medio filtrante. La rapidez de la reacción de oxidación de H₂S ya ha sido documentada, requiriendo valores de TRLV tan bajos como 40 s para la remoción de concentraciones de H₂S de 100 ppm_v y de 130 s para 2,650 ppm_v (Brandt et al., 2019; Morgan-Sagastume y Noyola, 2006). Con base en esta información, se concluye que en el nivel 2 de muestreo para extracción de DNA, con una altura de lecho de 20 cm y TRLV de 6.4 min, ya no había presencia de H₂S, puesto que ya había sido removido al 100% en la zona inferior.

De este modo es posible explicar la no detección de los microorganismos sulfooxidantes en los niveles utilizados para el muestreo (nivel 2, a 20 cm de altura de lecho, y nivel 4 a 50 cm). También se identifica que, para lograr la identificación de esos microorganismos, el punto de muestreo debe estar en los primeros centímetros del lecho, para asegurar TRLV menores a los 40 segundos. Sin embargo, en ese nivel, se presentaría la acidificación de la composta y la consecuente inhibición de los metilótrofos y otros microorganismos no acidófilos.

Tabla 5.1 Valores de pH y porcentaje de humedad de la composta al término de cada fase experimental. Las muestras se tomaron en 3 diferentes alturas donde 1 es el nivel más bajo del biofiltro, 2, el nivel intermedio y 4 el nivel más alto dentro del biofiltro.

	Punto de muestreo	Fase 1	Fase 2	Fase 3 (ausencia de H ₂ S)
pH	4	7.46±0.40	7.26±0.23	7.89±0.02
	2	7.72±0.62	7.45±0.40	7.14±0.04
	1	2.85±0.13	2.04±0.04	7.84±0.04
Porcentaje de humedad (%)	4	41.9	46.7	42.9
	2	51.7	28.9*	45.3
	1	58.5	45.4	43.1
Duración de fase experimental (días)		68	24	28

* Posible error de medición

Por otro lado, el porcentaje de humedad de la composta en todos los puntos de muestreo de las 3 fases experimentales se mantuvo entre 41.9 y 58.5%. El valor inusualmente bajo obtenido del punto de muestreo 2 de la fase 2 estaría asociado a un error de medición.

5.4.2 Análisis de secuencias

El análisis de secuencias de las bandas cortadas mostradas en los geles de poliacrilamida (Figura 5.5, 5.13 y 5.21) se aborda a continuación. En la tabla 5.2, 5.3 y 5.4 se muestran los resultados de la búsqueda en el GenBank con la herramienta BLAST de las secuencias más parecidas a las secuencias de las bandas obtenidas a partir de la DGGE. Es relevante mencionar que, aunque en la tabla esté indicado el nombre de la especie del microorganismo con mayor porcentaje de identidad, la técnica de PCR-DGGE para una o varias regiones hipervariables del gen 16S rRNA no tiene la suficiente sensibilidad para confirmar una especie. Sin embargo, puede ayudar en la detección del género (con cierta reserva) y la familia de los microorganismos predominantes en una matriz ambiental.

Para realizar una mejor evaluación de la coincidencia de tipo de bandas en los diferentes puntos y tiempos de muestreo, se acomodaron los carriles de acuerdo con el tipo de banda identificada en el gel de DGGE. Esto se muestra en la Figura 5.26, 5.27 y 5.28. Esta identificación de bandas fue resultado de la identificación del software Quantity One®.

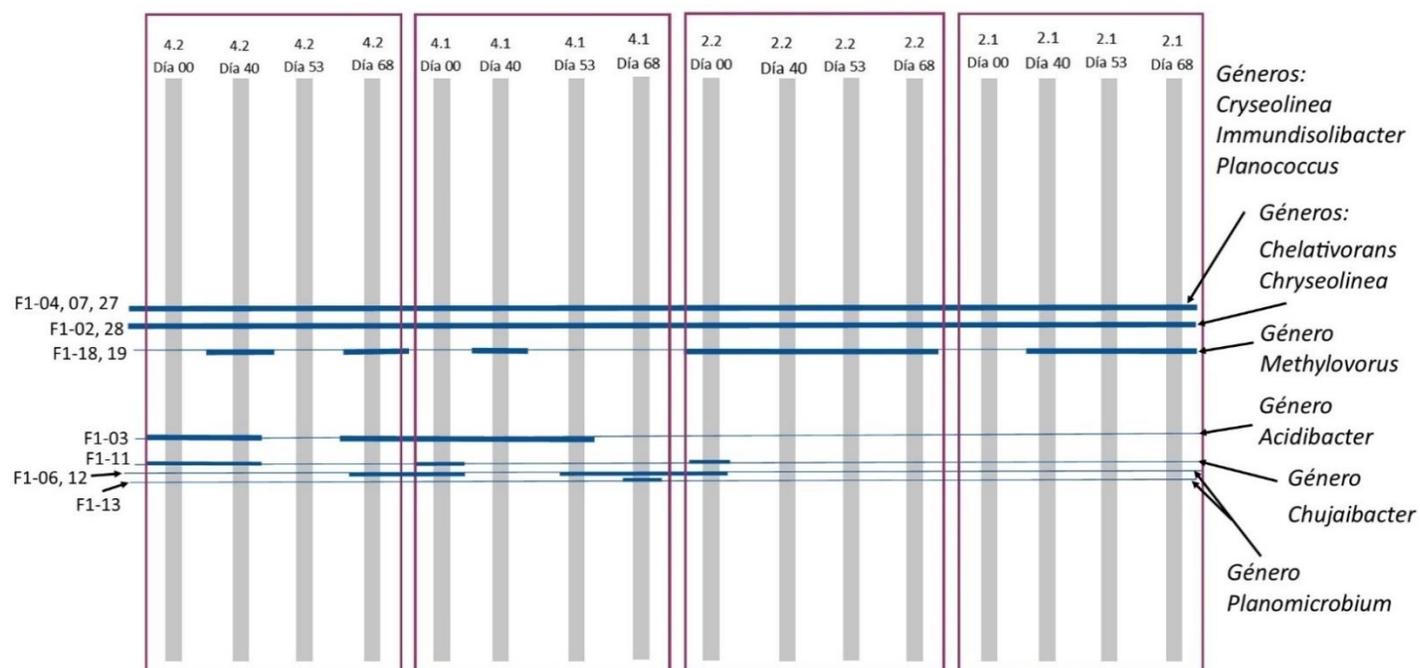


Figura 5.26 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los geles de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 1 (H_2S entrada $333 \text{ ppm}_v \pm 188$). Se encuentran señaladas las bandas que fueron cortadas y posteriormente secuenciadas. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®.

Tabla 5.2. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 1 (H₂S entrada 333 ppm_v ±188).

# Banda cortada	Día y punto de muestreo	Microorganismo comparado	Taxonomía	No. de acceso	% Identidad	Valor E	Ambiente donde ha sido reportado	Referencia
F1-02	D00 4.2	<i>Chelativorans composti</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Alpha Proteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae, Chelativorans</i>	NR_113183	87.4	3.00E-133	Composta	(Yabe et al., 2012)
F1-03	D40 4.2	<i>Acidibacter ferrireducens</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, no asignado a orden, no asignado a familia, Acidibacter</i>	NR_126260	95.8	0	Agua de lago cercano a una mina	(Falagán y Johnson, 2014)
F1-04	D68 4.2	<i>Planococcus rifietoensis</i>	<i>Bacteria, Terrabacteria group; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planococcus</i>	NR_025553	91.4	9.00E-158	Agua mineral sulfurosa	(Romano et al., 2003)
F1-06	D68 4.2	<i>Planomicrobium flavidum</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium.</i>	NR_116601.1	96.8	0	Salinera marina	(Jung et al., 2009)
F1-07	D00 4.1	<i>Immundisolibacter cernigliae</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Immundisolibacteraceae, Immundisolibacter</i>	NR_156801	85.3	4.00E-92	Suelo tratado hidrocarburo y cultivo en biorreactor aerobio	(Corteselli et al., 2017)
F1-11	D53 4.1	<i>Chujaibacter soli</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Lysobacteraceae, Chujaibacter</i>	NR_145539	95.9	0	Suelo	(Kim et al., 2015)
F1-12	D68 4.1	<i>Planomicrobium flavidum</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium.</i>	NR_116601.1	97.0	0	Salinera marina	(Jung et al., 2009)
F1-13	D68 4.1	<i>Planomicrobium flavidum</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium.</i>	NR_116601.1	93.9	0	Salinera marina	(Jung et al., 2009)
F1-18	D40 2.1	<i>Methylovorus menthalis</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Methylophilaceae; Methylovorus</i>	NR_117977	97.6	0	Raíz de una planta	(Doronina et al., 2011)
F1-19	D68 2.1	<i>Methylovorus glucosotrophus</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Methylophilaceae; Methylovorus</i>	NR_104761	89.1	0	Agua residual municipal	(Doronina et al., 2016)
F1-27, 28	D68 2.1	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	88.9	9.00E-174	Suelo	(Lee et al., 2019)

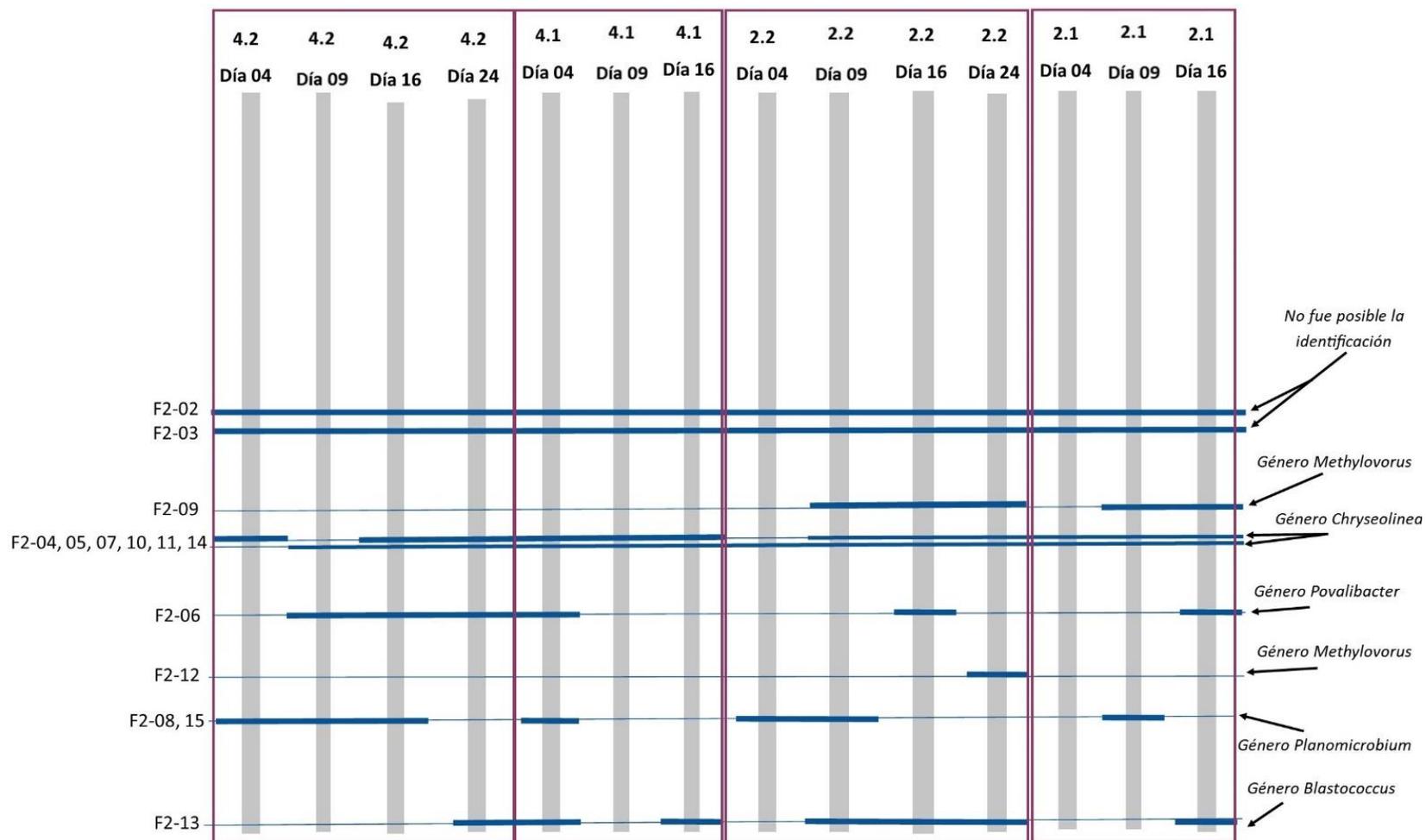


Figura 5.27 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los geles de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 2, con H_2S entrada $783 \text{ ppm}_v \pm 317$. Se encuentran señaladas las bandas que fueron cortadas y posteriormente secuenciadas. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®.

Tabla 5.3. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 2 ([H₂S] promedio 783±317 ppm_v).

# Banda cortada	Día y punto de muestreo	Microorganismo comparado	Taxonomía	No. de acceso	% Identidad	Valor E	Ambiente donde ha sido reportado	Referencia
F2-04, 05	D24 4.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	92.5	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F2-06	D24 4.2	<i>Povalibacter uvarum</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Nevskiales; Steroidobacteraceae; Povalibacter</i>	NR_126172	89.7	0	Uvas	(Nogi et al., 2014)
F2-07	D04 4.1	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	91.8	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F2-08	D09 2.2	<i>Planomicrobium flavidum</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium.</i>	NR_116601.1	98.7	0	Salinera marina	Jung, 2009
F2-09	D24 2.2	<i>Methylovorus menthalis</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Methylophilaceae; Methylovorus</i>	NR_117977	97.0	0	Raíz de una planta	(Doronina et al., 2011)
F2-10, 11	D24 2.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	92.5	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F2-12	D24 2.2	<i>Methylovorus glucosotrophus</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Methylophilaceae; Methylovorus</i>	NR_104761	83.3	1E-133	Agua residual municipal	(Doronina et al., 2016)
F2-13	D24 2.2	<i>Blastococcus xanthinilyticus</i>	<i>Bacteria, Actinobacteria, Actinobacteria, Geodermaatophilales, Geodermatophilaceae, Blastococcus</i>	NR_163615	89.0	0	Polvo de mármol	(Hezbri et al., 2018)
F2-14	D04 2.1	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	91.6	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F2-15	D09 2.1	<i>Planomicrobium soli</i>	<i>Bacteria, Terrabacteria group; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium</i>	NR_134133	97.0	0	Suelo	(Luo et al., 2014)

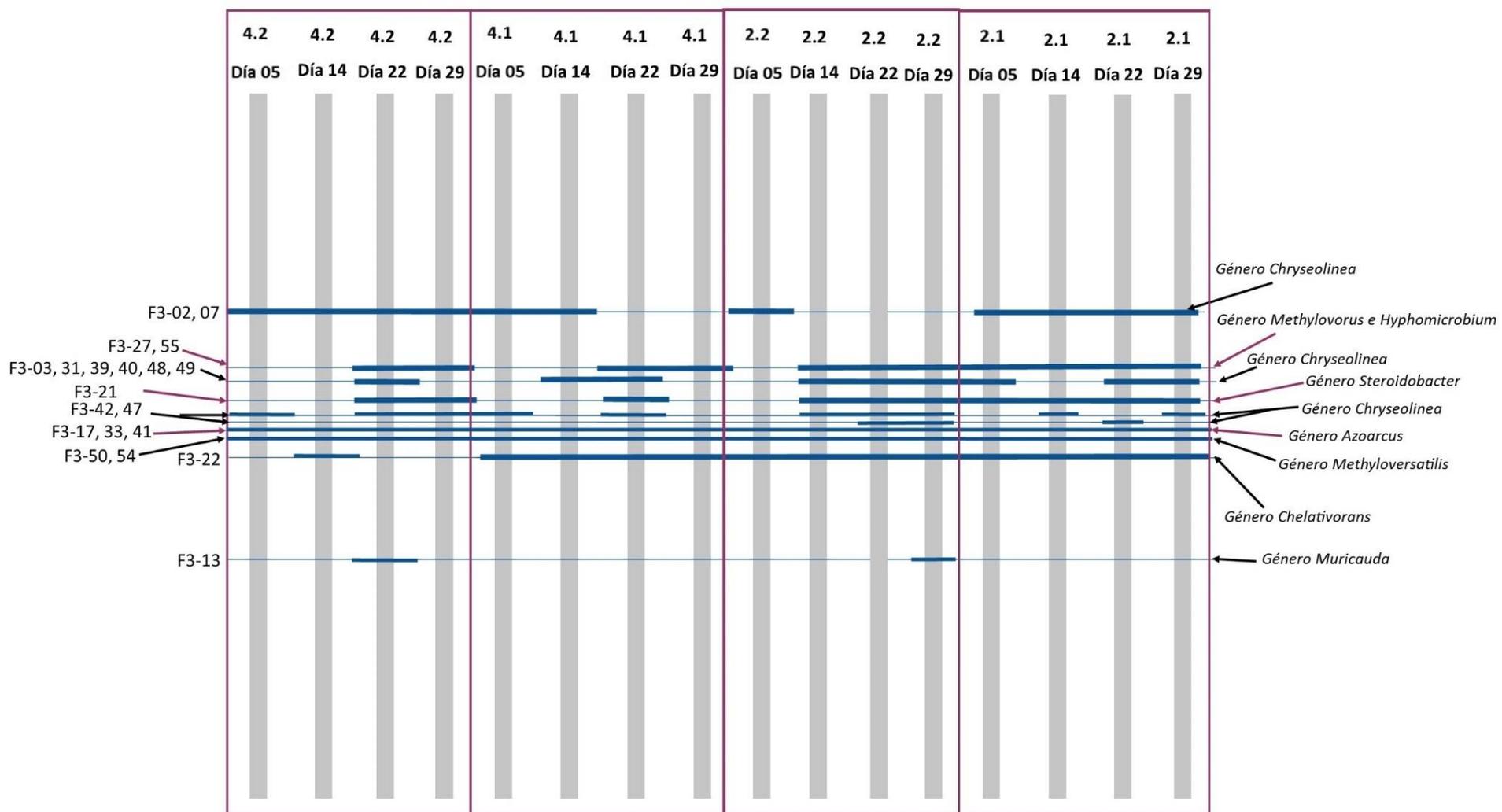


Figura 5.28 Bandas representativas del patrón de migración obtenido a partir de los gels de poliacrilamida para las muestras de compostas de la fase experimental 3, donde no hubo presencia de H_2S . Se encuentran señaladas las bandas que fueron cortadas y posteriormente secuenciadas. Para la identificación de bandas se utilizó el software Quantity One®.

Tabla 5.4. Resultados de secuenciación y búsqueda en GenBank de las bandas escindidas durante la fase experimental 3 (ausencia de [H₂S]).

# Banda cortada	Día y punto de muestreo	Microorganismo comparado	Taxonomía	No. de acceso	% Identidad	Valor E	Ambiente donde ha sido reportado	Referencia
F3-02	D05 4.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	90.02	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F3-03	D05 4.2	<i>Chryseolinea serpens</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_108511	90	2.00E-174	Suelo	(Kim et al., 2013)
F3-06	D22 4.2	<i>Planomicrobium flavidum</i>	<i>Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae; Planomicrobium.</i>	NR_116601.1	96.8	0	Salinera marina	(Jung et al., 2009)
F3-07	D28 4.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	89.5	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F3-13	D05 4.1	<i>Muricauda olearia</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; Muricauda</i>	NR_044579	94.2	0	Agua de mar contaminada con petróleo crudo	(Hwang et al., 2009)
F3-17	D22 4.1	<i>Azoarcus olearius</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclaceae, Azoarcus</i>	NR_108183	89.2	2.00E-170	Suelo contaminado de petróleo	(Chen et al., 2013)
F3-21	D28 4.1	<i>Steroidobacter denitrificans</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Nevskiales; Steroidobacteraceae; Steroidobacter</i>	NR_044309	87.2	6.00E-171	Lodo digerido en anoxia	(Fahrbach et al., 2008)
F3-22	D28 4.1	<i>Chelativorans composti</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Alpha-Proteobacteria, Rhizobiales, Phyllobacteriaceae, Chelativorans</i>	NR_113183	86.9	2.00E-161	Composta	(Yabe et al., 2012)
F3-27	D14 2.2	<i>Methylovorus glucosotrophus</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Beta-proteobacteria; Nitrosomonadales; Methylophilaceae; Methylovorus</i>	NR_104761	94.1	0	Agua residual municipal	(Doronina et al., 2005)
F3-31	D22 2.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	91.8	0	Suelo	(Lee et al., 2019)

F3-33	D22 2.2	<i>Azoarcus tolulyticus</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclaceae, Azoarcus</i>	NR_037058	82	4.00E-108	Suelo contaminado de petróleo, Suelo de zona industrial, Suelo de vertedero	(Zhou et al., 1995)
F3-39, 40	D28 2.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	87	3.00E-168	Suelo	(Lee et al., 2019)
F3-41	D28 2.2	<i>Azoarcus olearius</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Betaproteobacteria, Rhodocyclaceae, Azoarcus</i>	NR_108183	88.7	7.00E-150	Suelo contaminado de petróleo	(Chen et al., 2013)
F3-42	D28 2.2	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	88.1	1.00E-176	Suelo	(Lee et al., 2019)
F3-47	D22 2.1	<i>Chryseolinea serpens</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_108511	91.2	0	Suelo	(Kim et al., 2013)
F3-48, 49	D22 2.1	<i>Chryseolinea soli</i>	<i>Bacteria, Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales, no asignado a familia, Chryseolinea</i>	NR_165708	92.3	0	Suelo	(Lee et al., 2019)
F3-50	D22 2.1	<i>Methyloversatilis thermotolerans</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Sterolibacteriaceae; Methyloversatilis</i>	NR_125673	88	0	Aguas termales	(Doronina et al., 2014)
F3-54	D28 2.1	<i>Methyloversatilis thermotolerans</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Sterolibacteriaceae; Methyloversatilis</i>	NR_125673	87.3	2.00E-175	Aguas termales	(Doronina et al., 2014)
F3-55	D28 2.1	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Alpha-Proteobacteria, Rhizobiales, Hyphomicrobiaceae, Hyphomicrobium</i>	NR_026429	90	0	Sistema de desnitrificación de agua de mar	(Martineau et al., 2015)

La siguiente descripción de los resultados obtenidos empieza con los microorganismos que coincidieron en las 3 fases experimentales, después los microorganismos que coincidieron en 2 fases experimentales y, por último, los microorganismos que sólo fueron identificados en una fase experimental.

En la figura 5.26, donde se representa el perfil de bandeo de la fase experimental 1 (H_2S promedio 333 ± 188 ppm_v) se puede observar los diferentes tipos de bandas identificadas mediante secuenciación. Las bandas F1-01, 04, 07, 14, 21, 23, 25, 27 se ubicaron a la misma altura de separación de bandas, por lo que se presentan juntas; estas bandas se identificaron como *Chryseolinea soli*, *Immundisolibacter cernigliae*, y *Planococcus rifietoensis*. Como se sabe, la limitante de esta técnica es la identificación de microorganismos a niveles de especie e incluso género debido a las posibles quimeras de secuencias que se presenten (Acinas, 2007; Dijkshoorn et al., 2001), por lo que se puede asegurar con esta información que los microorganismos presentes son filos distintos.

En la figura 5.27, representa el perfil de bandeo de la fase experimental 2. Las bandas F2-04, 05, 07, 10, 11 y 14 se identificaron como *Chryseolinea soli*, presente en casi todas las muestras, excepto en la posición 4.2 (centro) los días 04 y 09, y en 2.2 (centro) el día 04.

En la figura 5.28, representa el perfil de bandeo de la fase experimental 3. Las bandas F3-02, 03, 07, 31, 39, 40, 42, 47, 48, 49 se identificaron como *Chryseolinea soli*. Estas bandas aparecieron en diferentes posiciones, y de ellas, las que se ubicaron en la misma posición fueron las bandas 02 y 07, el conjunto 03, 31, 39, 40, 48 y 49; y las bandas 42 y 47. Este microorganismo se identificó también en todas las fases experimentales anteriores, pero en esta fase se encontró en todas las muestras, excepto en la posición 4.1 (orilla) del día 29.

Las bandas F1-06, 12 y 13 se identificaron como del género *Planomicrobium* las cuales aparecieron al final de la experimentación en las posiciones 4.1 y 4.2 (Figura 5.5); en tanto que en la posición 2.2 solo se presentó en el día 00 y en la posición 4.2, en el día 68 (Figura 5.5). Las bandas F2-08 y 15 se identificaron como del género de *Planomicrobium*, con presencia los días 04 y 09 en las posiciones 2.2 (centro), 2.1 (orilla), sólo en el día 09; mientras que en la posición 4.2 (centro) se presentó en los días 04, 09 y 16, y en 4.1 (orilla), sólo en el día 04. Al parecer, este microorganismo desapareció con el tiempo, al menos hasta la última muestra de la Fase 2 (24 días). En la fase 3, este tipo de microorganismo no apareció con esta técnica de rastreo de huella molecular.

Continuando con la descripción de los posibles microorganismos relacionados con la banda F1-07, se identificó como *Immundisolibacter cernigliae* que apareció en el día 00 en la posición 4.1 (orilla). Este microorganismo tiene un crecimiento óptimo bajo condiciones

aerobias en temperatura mesofílica, pH neutro y salinidad baja. Degrada hidrocarburos policíclicos aromáticos, dentro de la clase (Corteselli et al., 2017). Este microorganismo ha sido detectado en muestras de suelo tratado en un reactor aerobio. Este microorganismo pertenece a la clase *Gamma-proteobacteria* la cual es una clase muy amplia.

Las bandas F1-18 y 19 se identificaron como *Methylovorus menthalis* y *Methylovorus glucosotrophus*, La banda F2-12 se identificó como *Methylovorus glucosotrophus* sólo hasta el día 24 en la posición 2.2 (centro). No se identificó esta banda en las posiciones 4 en ningún momento. La banda tipo F3-27 y 55 apareció en las muestras 2.1 (orilla) desde el día 00 hasta el día 29 y 2.2 (centro) desde el día 14. En la posición 4.1 (orilla) y 4.2 (centro) apareció en el día 22 hasta el final de la experimentación. Estas bandas se identificaron como *Methylovorus glucosotrophus* e *Hyphomicrobium zavarzinii*. Ambos microorganismos se identifican como metilótrofos.

Para la fase experimental 3 se identificó la banda F3-55 como microorganismo del género *Hyphomicrobium*. Las bandas tipo F3-50 y 54, también se presentaron en todas las posiciones y en todos los días de muestreo y se asoció al género *Methyloversatilis*.

Para la Banda tipo F1-02, se identificó con *Chelativorans composti* en el día 00 en la posición 4 centro y la banda tipo 28 como *Chryseolinea soli* en el día 68 de la posición 2 orilla. Estas bandas se encontraron en la misma posición, sin embargo, los microorganismos identificados pertenecen a filos distintos: *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, respectivamente.

La banda tipo F1-03 se identificó como *Acidibacter ferrireducens*, la cual se presentó sólo en las posiciones 4.1 y 4.2, desde el día 00, y se mantuvo hasta el final de la fase experimental en la posición 4.2. el microorganismo del género *Acidibacter* es un microorganismo mesofílico con temperatura óptima de crecimiento entre 32-34°C, moderadamente acidófilo con crecimiento óptimo en el intervalo de pH 3.5-4.0, microorganismo que fue estudiado por (Falagán y Johnson, 2014), encontrado en agua de lago cercano a una mina. Este microorganismo es raro encontrarlo sólo en la posición más alta debido a que fue el punto que se encontró al final de la fase con un pH de 7.46 (Tabla 5.1). Este microorganismo pertenece a la clase *Gamma-proteobacteria*, la cual es una clase muy amplia a la que pertenecen diversos tipos de microorganismos.

La banda tipo F1-11 sólo se presentó en el inicio de la fase experimental en las posiciones 2.2, mientras que en la posición 4.1 apareció en el día 00 y en el día 53; en la posición 4.2 apareció en el día 00 y 40. Esta banda se identificó como *Chujaibacter soli*. Es una cepa bacteriana en forma de bacilo, Gram-negativa, aerobia, no flagelada, la cual suele habitar en el suelo. Esta especie microbiana pertenece al orden *Xanthomonadales* (también llamado

Lysobacteraceae) en el cual, los microorganismos son bacilos rectos. Son aerobios que tienen un metabolismo estrictamente respiratorio con oxígeno como el receptor de electrones terminal. La temperatura óptima de crecimiento es entre 20 y 35°C (Saddler y Bradbury, 2005). Este microorganismo ha sido estudiado en muestras de suelo (Kim et al., 2015) y en este trabajo apareció el día 53 en la posición 4.1 del biofiltro. Los intervalos de temperatura en esta fase experimental rondaron entre 16.4 y 33.7°C (Figura 5.12), por lo que los microorganismos mesófilos son los que se encontraron en esta etapa experimental.

Para la fase experimental 1, no fue posible identificar las bandas F1-01, 05, 08, 14, 15, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 con algún microorganismo (Figura 5.5) por dificultades durante la purificación y reamplificación de la banda cortada.

Del mismo modo, para la fase experimental 2 no fue posible identificar las bandas F2-01, 02 y 03 con algún microorganismo (Figura 5.13).

La banda F2-06 apareció en la muestra del día 16 en las posiciones 2.1 y 2.2; en tanto que en la posición 4.1 (orilla) sólo apareció en el día 04 y en la posición 4.2 (centro) apareció desde el día 09 hasta el 24. Esta banda se identificó como *Povalibacter uvarum*, que pertenece a la clase *Gamma-proteobacteria* y es miembro del género *Steroidobacter*. Es Gram-negativo, mesofílico y neutrófilo, aerobio estricto y quimioorganotrofo (reduce nitrato y nitrito a amonio). Este microorganismo se estudió en muestras de uvas. La temperatura de crecimiento registrada es de 30°C (Nogi et al., 2014). Es de señalar que este microorganismo se identificó principalmente en la posición 4.2 (centro), donde se presentó una carga baja de alimentación y prácticamente ya no había presencia de este sustrato, con la consecuente presencia de diversa comunidad microbiana.

La banda F2-13, al contrario de la anterior, se presentó en la parte media y final de la Fase 2. Se identificó como *Blastococcus xanthinilyticus* (identificado en polvo de mármol), del filo y clase *Actinobacteria*, con mayor presencia en la posición 2.2 (centro), en principio, la zona con mayor disponibilidad de sustrato. Particularmente, esta especie se identificó de muestras de mármol. *Blastococcus* es un microorganismo con forma de coco, con una alta capacidad de adaptación, ya que este género ha sido posible aislarlo en ambientes difíciles (como en presencia de luz ultravioleta, radiación ionizante y metales pesados), con temperatura de crecimiento de 28°C (Hezbri et al., 2018; Sghaier et al., 2016). En la composta hay mayor predominancia de microorganismos de la clase *Actinobacteria* por ser degradadores de celulosa (Wang et al., 2016) por lo que no se descarta que puede ser algún otro miembro de esta clase.

Para la fase experimental 3, no fue posible identificar las bandas F3-05, 08, 09, 12, 15, 16, 29, 30, 32, 35, 36, 44, 45, 46 y 53 con algún microorganismo, debido a complicaciones en la purificación y reamplificación de la banda cortada (Figura 5.21).

La banda tipo F3-17, 33 y 41 se presentó en todas las posiciones y en todos los días de muestreo y se identificó como del género *Azoarcus*. Este microorganismo es fijador de nitrógeno, Gram-negativo, con forma de bacilos móviles alrededor de cápsula delgada. Las células mostraron un tipo de metabolismo estrictamente aerobio y fijador de nitrógeno, es microaerobio. El crecimiento se presenta a 10-45°C (óptimo, 35-40°C) y a pH 7.0-8.0 (óptimo, pH 7.0) (Chen et al., 2013). Este tipo de microorganismos se encuentran dentro de las plantas (endófitos), por lo que se explica la presencia de la huella molecular para este tipo de microorganismos desde el inicio de esta fase experimental, porque la composta se encuentra compuesta principalmente por restos de plantas.

La banda tipo F3-13, sólo se presentó en la posición 4.1 (orilla) en el día 05, y se identificó como *Muricauda olearia*. Son microorganismos Gram-negativos, aerobios estrictos, no móviles y bacilos no formadores de esporas. Crece en temperaturas 15-40 °C (óptimo, 25-30°C) y a valores de pH 5.2-9.4 (óptimo, pH 6.8-7.7) (Hwang et al., 2009). Pertenece al orden *Flavobacteriaceae*, los cuales son quimiorganótrofos. Este microorganismo fue estudiado en muestras de agua de mar contaminada con petróleo crudo.

Steroidobacter denitrificans apareció en la posición 2.1 (orilla) en todos los días de muestreo, 2.2 (centro) a partir del día 09 hasta el final; en el 4.1 (orilla) sólo en el día 22 y en 4.2 (centro) en los días 22 y 29. Esta fue la banda tipo F3-21. Es una bacteria desnitrificante, aislada del lodo digerido anóxico, teniendo el lodo como la única fuente de carbono y energía; y con nitrato como el aceptor de electrones. Son células Gram-negativas, bacilos ligeramente curvados, que crecen en condiciones mesofílicas, neutrofilicas, no forman esporas, quimiorganótrofos; su metabolismo es respiratorio. Exhibe reducción de nitrato a N₂O y N₂ sin acumulación intermedia de nitrito (Martineau et al., 2015). Pertenece al orden *Nevskiales*. La presencia de este tipo de microorganismo permite identificar la interrelación que puede existir en una matriz tan compleja, como lo es la composta, desde su formación y sus usos subsecuentes en la biofiltración de CH₄.

5.4.3 Coincidencia de los microorganismos identificados en cada fase experimental

En la Tabla 5.5 se encuentra una compilación de las bandas coincidentes con los correspondientes microorganismos identificados en los días de toma de muestra, para las cuatro posiciones y las tres fases experimentales.

En las 3 fases experimentales y en todos los puntos y tiempos, se detectó la presencia de *Chryseolinea soli*, Se pone en evidencia que la presencia de este microorganismo no fue afectada por la alimentación de CH₄ y H₂S.

Chryseolinea soli, pertenece al orden *Cytophagales* y a la clase *Cytophagia*, que comprende casi exclusivamente aerobios estrictos y son Gram negativos. Todos son organótrofos. Son ubicuos, abundantes y juegan un papel importante en el reciclado de la materia en la naturaleza (Madigan et al., 2015; Reichenbach, 2006). Si bien la mayoría de las bacterias del orden *Cytophagales* son estrictos aerobios y algunos microaerófilos, los hay también facultativos anaerobios. Al parecer todos los microorganismos del orden *Cytophagales*, incluyendo los descomponedores de celulosa crecen en compuestos orgánicos nitrogenados como su única fuente de nitrógeno. La mayoría de los *Cytophagales* degradan macromoléculas, particularmente polisacáridos, como agar, almidón, celulosa, beta-glucano de pared celular, succinoglicano, pectina, alginato y heparina y forman parte importante del compostaje de excremento. (Reichenbach, 2006). Por esta razón se puede explicar que esta huella molecular para este microorganismo se encuentre en todas las muestras. Este género fue identificado de las bandas cortadas de las muestras de la fase 1 del día 68 y la posición 2 en la orilla del biofiltro (2.1), los cuales resistieron a los cambios ambientales ejercidos por el suministro de biogás.

Otro tipo de microorganismo que fue detectado en todas las fases experimentales fueron los que pertenecen a la familia *Planococcaceae*, aunque diferentes especies en función de las fases. Específicamente fueron *Planococcus rifietoensis* (solo en Fase 1 y en todas las muestras), *Planomicrobium soli* (solo en Fase 2, no al término de la fase) y *Planomicrobium flavidum* (escasamente presente en Fase 1 y Fase 2; en todas las muestras en Fase 3). Los microorganismos de esta familia suelen ser estrictamente aerobios heterótrofos, aunque algunas especies son aerobios facultativos. Los microorganismos de la familia *Planococcaceae*, se han estudiado en diversos ambientes como salinas marinas, aguas minerales sulfurosas, en suelo y plantas (Romano et al., 2003; Schleifer, 2009). Tomando en cuenta el tipo de banda característica en cada gel, se identificó la huella molecular de los microorganismos de la familia *Planococcaceae* en todas las fases experimentales, en todos los puntos de muestreo, excepto en la fase 2, donde disminuyó su presencia en función del tiempo, llegando a no identificarse al final de esta fase (día 24).

Los microorganismos del género *Planococcus* y *Planomicrobium* pertenecen a la familia *Planococcaceae* y a la clase *Bacilli*. Tienen una temperatura de crecimiento registrada óptima entre 30-37°C. Son quimioorganotróficos, con metabolismo respiratorio aerobio (Romano et al., 2003; Schleifer, 2009). La huella molecular para los microorganismos de este género fue detectada en la muestra del día 68 en la posición 4.1 (orilla) y 4.2 (centro), e identificándose para el mismo tipo de banda, indicando que este microorganismo forma parte esencial de la interacción de la comunidad microbiana en la composta. Estos microorganismos son positivos a la actividad de catalasa, lo que permite ayudar la degradación de peróxido de hidrógeno, el cual es un producto intermedio de diversas actividades metabólicas y este compuesto puede ser perjudicial para la vida de los microorganismos. (Schleifer, 2009).

Microorganismos del género *Methylovorus* también aparecieron en las 3 fases experimentales, en particular *M. glucosotrophus* (Fases 1 y 3 en patrón semejante, de menos a más, y solo en un punto al final de la Fase 2) y *M. menthalis* (mismo patrón que la especie anterior en el caso de las Fases 1 y 2, pero ausencia en Fase 3). Este género se describe como Gram-negativo sin color con bacilos móviles, es estrictamente aerobio y usa la vía ribulosa monofostato para el consumo de metanol (producto de la oxidación de metano). *M. glucosotrophus* fue aislado de aguas residuales; el crecimiento óptimo ocurre en pH 7.0-7.5, (que corresponde a los valores de pH medidos para las muestras de composta de todas las fases experimentales) y 29-35°C. Es un metilótrofo restrictivo facultativo que utiliza metano y algunos azúcares como glucosa y fructosa como fuentes de energía. (Doronina et al., 2016, 2011). Por su parte, *Methylovorus menthalis* es un microorganismo encontrado en la superficie de las raíces que utiliza exclusivamente metanol como fuente de carbono. Tiene forma de bacilo Gram-negativo (Doronina et al., 2011). De esta descripción, se puede entender por qué en algunos puntos de muestreo apareció la huella molecular desde el día 00, sin embargo, en otros casos, apareció desde que se mantuvo la alimentación de biogás, como lo fue en la fase 2, que recibió la menor carga másica de entrada de CH₄ en las 3 fases experimentales.

Se infiere que este tipo de microorganismos sólo hayan aparecido en la fase experimental 1 en el nivel 2 del biofiltro debido a la limitada carga másica de entrada de CH₄ que fue en promedio de 16.4±6.2 gm⁻³ h⁻¹, la cual era consumida en los niveles bajos de la composta, ya que se alcanzó el 100% de remoción de ese sustrato. Es notorio señalar que este tipo de microorganismo apareció en la F1 en el inicio sólo para la muestra de la posición 2 centro (Figura 5.26), esto es normal debido a que los microorganismos metanótrofos son cosmopolitas, es decir se encuentran en todos lados. En la F1, para la posición 2.2 (centro) la banda que identifica este tipo de microorganismo apareció en toda la fase experimental; para la posición 2.1 (orilla), solo no apareció en el día 00 y en cambio, para las posiciones de los niveles 4 sólo apareció en los días 40 y 68 para la posición del centro (4.2) y, en la posición de la orilla (4.1)

sólo hasta el final, el día 68, revelando que el nivel 2 se vio favorecido para la comunidad metilótrofa.

Methylovorus glucosotrophus se hizo presente en las F1 y F3, esto por la mayor carga másica de entrada de CH₄ que fue mayor a 20 g m⁻³h⁻¹, que en la fase 2, donde la CM fue menor. Para la fase 3, ya no se detectó la presencia de *Methylovorus menthalis* a pesar de que se alimentó con una mayor CM en esta fase, indicando que este tiene otros factores necesarios para tener mayor abundancia en el seno de la composta; es necesario recordar que, aunque en las bandas no hayan sido identificadas, no significa que no esté presente, porque la identificación depende de la abundancia de este tipo de microorganismo. En la fase 3, aparecieron otros metilótrofos, que pudieron opacar el crecimiento de este microorganismo, y estos son descritos a continuación.

La banda F3-55 se identificó como del género *Hyphomicrobium* a este género pertenecen metilótrofos facultativos restringidos que a su vez pertenece a la familia *Hyphomicrobiaceae*; la mayoría de los microorganismos de este género son quimioorganótrofos y prefieren crecer en compuestos de un carbono como el metanol. Pueden encontrarse en el agua y el suelo, también en las PTAR. Algunas cepas se han caracterizado por sus capacidades de desnitrificación. Por lo regular, se han identificado como microorganismos principales en los sistemas de desnitrificación suplementados con metanol y su presencia se ha asociado con altas tasas de desnitrificación, removiendo el nitrato en forma de N₂. *Hyphomicrobium* está bien adaptado para crecer en hábitats oligotróficos (bajo de nutrientes) de agua dulce (Gu y Mitchell, 2006; Martineau et al., 2015). Es una bacteria de suelo con temperatura de crecimiento en 30°C. En la fase experimental 3, es relevante notar que para microorganismos en el nivel 4 tuvo una aparición en todos los días de muestreo, contrario a lo esperado, debido a que el nivel 2 se encuentra más cercano al punto de entrada de la mezcla de metano y aire.

Las bandas tipo F3-50 y 54, también se presentaron en todas las posiciones y en todos los días de muestreo y se asoció al género *Methyloversatilis*. Este microorganismo es un metanótrofo del tipo I y se definen en función del tipo de membrana intracelular y la vía de asimilación de carbono, que en este caso es por la vía ribulosa monofosfato. Este género es un metanótrofo termófilo y termotolerante que crece a temperaturas superiores a 45°C son de origen terrestre (Corteselli et al., 2017; Syed, 2016). Esta especie es un microorganismo estudiado en muestras de agua termales y este pertenece a la clase *Beta-proteobacteria*. Las bacterias del género de *Methyloversatilis* son Gram-negativas, no móviles en forma de bastón y facultativamente metilotróficas. Se observa crecimiento a 10–45°C y pH 6.5–8.5. También, las bacterias de este género han sido identificadas como dominantes asimiladoras de metanol y etanol (Doronina et al., 2014). Para el proceso de formación de composta se requieren algunas fases de altas temperaturas (entre 50 y 70°C) (Román et al., 2013), que podrían permitir la

presencia de este tipo de microorganismos y permitió su subsistencia al presentarse en esta fase experimental temperaturas mayores a 35°C e incluso por arriba de los 55°C (Figura 5.20).

Se detectó la presencia de *Chelativorans composti* en todas las muestras de Fase 1 y prácticamente en todas de la Fase 3, pero sin aparecer en la Fase 2. Se trata de un microorganismo Gram-positivo termófilo, con condiciones de crecimiento a 23-57°C y pH entre 5.9-8.8 (Yabe et al., 2012), detectado en composta, por lo que es natural su presencia en el experimento. Es notorio recordar, que el hecho de que este microorganismo no haya sido identificado en la Fase 2 no indica que no esté presente, esta técnica está limitada a la abundancia del microorganismo en la matriz, del mismo modo, una pequeña variación, pudo identificar otro microorganismo del mismo orden o clase.

Para la Banda tipo F1-02, se identificó con *Chelativorans composti* en el día 00 en la posición 4 centro y la banda F1-28 como *Chryseolinea soli* en el día 68 de la posición 2 orilla. Estas bandas se encontraron en la misma posición, sin embargo, los microorganismos identificados pertenecen a filos distintos: *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, respectivamente. Como ya se detalló antes, los microorganismos del género *Chryseolinea* se encargan de la degradación de macromoléculas como lo sería la celulosa y es lógica su presencia en la composta; para los microorganismos del género *Chelativorans composti*, este es un microorganismo Gram-positivo termófilo, con condiciones de crecimiento a 23°C-57°C y pH entre 5.9-8.8 (Yabe et al., 2012), el cual fue detectado en composta, por lo que es natural la aparición de este microorganismo en la matriz estudiada en este trabajo. La banda tipo F3-22 se asoció a *Chelativorans composti*, y se presentó en los puntos 2.2 (centro) y 2.1 (orilla) y 4.1 (orilla) en todos los días de muestreo y en la posición 4.2 (centro), sólo en el día 14.

Las máximas eficiencias de remoción de CH₄ de la fase 1 fueron los días 2, 5, 6, 15, 20, 27, 47, 48 y de los días 54 al 56, 62 y 63 (Figura 5.25). Los microorganismos metilótrofos aparecieron desde el día 0 en la posición 2.2 (centro) y continuó aumentando su presencia en más puntos a lo largo del experimento. Esto indica un periodo de adaptación que permitió que aumentara la abundancia de este tipo de microorganismos en más puntos de muestreo para ser identificados por la técnica de DGGE. Sin embargo, el crecimiento de estos microorganismos, como consecuencia de la alimentación de CH₄, no se puede relacionar con una mayor eficiencia de remoción. Para ello, es necesario cuantificar la presencia de los microorganismos para poder establecer una relación directa entre presencia de metilótrofos y eficiencia de remoción de CH₄.

Para la Fase 2, con la menor carga de metano, *M. glucosotrophus* fue identificado solo en las muestras del nivel 2 (centro y orilla), reflejando que sólo en esta posición fue suficiente el estímulo de la alimentación de metano para que esta huella molecular se observara; incluso, puede asumirse que la mayor remoción de CH₄ sucedió en este nivel.

Para la Fase 3, la máxima eficiencia de remoción se presentó en los días 8, 15, 17, 19, 22 y 23 (Figura 5.25). Como se mencionó, sólo identificar microorganismos metilótrofos no es un factor que defina si favorece la remoción de CH_4 debido a que es necesario saber cuántos de estos microorganismos existen para poder establecer una relación directa. Se observó en esta fase experimental que los metilótrofos aparecieron desde su inicio, así como una menor eficiencia de remoción debido al aumento de la carga másica de metano (Figura 5.25).

Con relación al tercer objetivo específico de este trabajo, es posible concluir que la eficiencia de remoción del metano no pudo relacionarse con la presencia de los microorganismos metanótrofos, debido a diversos factores involucrados. La fase 1 tuvo altas variaciones de entrada de carga másica de CH_4 , lo que evitó alcanzar valores estables de eficiencia, mientras que para la fase 2, la carga másica fue lo suficientemente baja para que fuera removido al 100%. Con relación a la Fase 3, con la mayor y más controlada carga orgánica y sin presencia de H_2S , la reducción de la eficiencia de remoción de metano puede asociarse al incremento de la temperatura en el interior del biofiltro, por arriba de los 60°C , con la consecuente inhibición de las bacterias metanótrofas (Figura 5.20). Particularmente en esta Fase se observó presencia de metilótrofos termófilos que, sin embargo, no lograron el consumo total de metano alimentado al biofiltro. En el trabajo de modelación matemática realizado por (Gómez-Borraz et al., 2021) se simularon condiciones semejantes a las aquí reportadas, observando acumulación de calor en diferentes alturas del biofiltro, particularmente en el centro. Tales temperaturas, superiores a los 60°C , inhiben a los metilótrofos mesófilos (temperatura óptima de crecimiento $29\text{-}35^\circ\text{C}$) e incluso a los termófilos. Como se mencionó antes en la sección 5.3.1, el aumento de temperatura se debe a la reacción exotérmica de oxidación de CH_4 , cuyo calor metabólico es transportado por convección desde la zona baja activa hacia la media – alta, inactivando los microorganismos ahí presentes.

Tabla 5.5 Coincidencias de bandas entre las diferentes fases experimentales. Círculo amarillo (●) posición superior del centro; círculo azul (●), posición superior pegado a la pared; triángulo amarillo (▲), inferior centro; triángulo azul (▲), inferior pegado a la pared. Se indica los días de operación

# Banda	Afiliación filogenética	F1 [H ₂ S] menor a 500 ppm _v				F2 [H ₂ S] mayor a 500 ppm _v				F3 Ausencia de H ₂ S			
		D00	D40	D53	D68	D04	D09	D16	D24	D05	D14	D22	D29
F1- 27, 28 ; F2-04, 05, 07, 10, 11, 14 F3-02, 07, 31, 39, 40, 42, 48, 49	<i>Chryseolinea soli</i>	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F1-19; F2-12; F3-27	<i>Methylovorus glucosotrophus</i>	▲	▲▲	●▲▲	●▲▲				▲	▲	▲▲	●▲▲	●▲▲
F1-18, F2-09	<i>Methylovorus mentalis</i>	▲	▲▲	●▲▲	●▲▲		▲▲	▲▲	▲				
F3-50, 54	<i>Methyloversatilis thermotolerans</i>									●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F3- 55	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>									▲	▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F1-06, 12, 13; F2-08; F3-06	<i>Planomicrobium flavidum</i>	●▲		●	●●	●●▲	●●▲	●		●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F1-02, F3-22	<i>Chelatorans composti</i>	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲					●▲▲	●▲▲	●▲▲	●▲▲
F1-04	<i>Planococcus rifietoensis</i>	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲								
F1-07	<i>Immundisolibacter cernigliae</i>	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲								
F1-03	<i>Acidibacter ferrireducens</i>	●●	●●		●								
F1-11	<i>Chujaibacter soli</i>	●●▲	●	●									
F2-13	<i>Blastococcus xanthinilyticus</i>					●	▲	●▲▲	●▲				
F2-06	<i>Povalibacter uvarum</i>					●	●	●▲▲	●				
F2-15	<i>Planomicrobium soli</i>					●●▲	●▲▲	●					
F3-33	<i>Azoarcus tolulyticus</i>									●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F3-21	<i>Steroidobacter denitrificans</i>									▲	▲▲	●●▲▲	●▲▲
F3-03, 47	<i>Chryseolinea serpens</i>									▲	●▲	●●▲▲	▲▲
F3-17, 41	<i>Azoarcus olearius</i>									●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲	●●▲▲
F3-13	<i>Muricauda olearia</i>										●		▲

Con base en lo expuesto anteriormente, pueden englobarse los resultados de la identificación de los microorganismos por medio de la secuenciación de las bandas cortadas de los geles de DGGE, integrados en la Tabla 5.5. La orden *Cytophagales* (microorganismo identificado como *Chryseolinea soli*) tiene una presencia general, y cuya predominancia no se esperaba, Sin embargo, se explica su presencia por las funciones de estos microorganismos para la degradación de la materia orgánica y formación de composta. En estudios realizados en suelo se encontró la interacción de microorganismos del orden *Cytophagales* con microorganismos del género *Methylocystis* de *Alphaproteobacteria* y del género *Methylobacter* de *Gammaproteobacteria*, ejemplo de las relaciones de cooperación de este tipo de microorganismos con metilótrofos (Nguyen et al., 2018).

Los microorganismos metilotróficos se encuentran relacionados con la cadena de oxidación de metano, en la que metanótrofos oxidan el metano a metanol, para seguir con los metilótrofos obligatorios. Se han reportado metilótrofos consumidores de metano, conocidos como metilótrofos facultativos (Anthony, 1983). En este trabajo se detectaron microorganismos metilótrofos, y de acuerdo con los estudios que se han realizado para la caracterización de este tipo de microorganismos, se presentan en las clases *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Kolb, 2009). Del mismo modo, existen metilótrofos que son consumidores de celulosa (Gonzalez et al., 1997), característica que podría explicar la presencia de metilótrofos desde el inicio la tercera fase experimental.

Otro punto significativo que señalar es la no identificación de microorganismos sulfooxidantes, a pesar de la completa remoción de H₂S en las fases experimentales 1 y 2. Es evidente que estos microorganismos se encontraron en la composta, sin embargo, por las limitaciones de la técnica PCR-DGGE no se pudieron identificar con total certeza. Filogenéticamente, estos microorganismos se han identificado en las clases *Bacilli*, *Betaproteobacteria* (géneros *Thiobacillus*, *Aquaspirillum*), *Alfaproteobacteria* (géneros *Paracoccus*, *Methylobacterium*), *Thermoprotei* (géneros *Acidianus*, *Sulfolobus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Friedrich, 1998; Friedrich et al., 2001). Si bien, los géneros anteriores no se identificaron, sí se identificaron microorganismos en estas clases. Como anteriormente fue discutido en la sección 4.4.1 una posible explicación se basa en que el H₂S fue consumido en el nivel más bajo del biofiltro (nivel 1), de tal forma, que el gas que alimentó el nivel 2 y superiores ya no contenía este compuesto. Por lo tanto, la comunidad microbiana no fue afectada por la concentración de H₂S alimentado. Otra posible explicación, es la sensibilidad de la técnica debido a que detecta los microorganismos predominantes de la muestra ambiental, mientras que los microorganismos en menor abundancia no son detectados.

6 Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se caracterizó la comunidad microbiana por medio de técnicas de rastreo de huella molecular, identificando que el microorganismo *Chryseolinea soli* apareció en todos los puntos y tiempos de muestreo y en las diferentes fases experimentales. Esto pone en evidencia la importancia de las relaciones microbianas de cooperación, facilitando las reacciones de oxidación de CH₄ y H₂S. Del mismo modo, se identificaron los géneros encargados de la oxidación de metano, *Methylovorus*, *Methyloversatilis* e *Hyphomicrobium*. La presencia de estos géneros varió entre las fases 1 y 2 con la fase 3, posiblemente debido a un mayor aumento de temperatura en el seno del medio filtrante en esta última, identificando en ella 2 microorganismos termófilos consumidores de metano (*Methyloversatilis*).

No se logró la identificación de microorganismos sulfoxidantes, a pesar de que hubo remoción del 100% de H₂S en las fases 1 y 2. La rápida cinética de oxidación del H₂S, con tiempos de reacción inferiores al minuto, lleva a concluir que este gas fue removido en los primeros centímetros de la cama filtrante, y ya no alcanzó el nivel 2, donde se ubicó el primer punto de muestreo de la biomasa, no siendo por lo tanto afectada por el H₂S. Otra posible explicación, pudo ser por la sensibilidad de la técnica debido a que detecta los microorganismos predominantes de la muestra ambiental, mientras que los microorganismos en menor abundancia no son detectados.

Los metanótrofos son microorganismos cosmopolitas, es decir que pueden encontrarse en una gran diversidad de ambientes, lo que explicaría que se identificaran estos microorganismos desde la composta inicial (tiempo 0).

Para las fases 1 y 2 hubo total predominio de microorganismos mesófilos y neutrófilos, en concordancia con las condiciones de temperatura y pH obtenidas para cada nivel de muestreo. Sólo para la fase 3, hubo presencia de microorganismos termófilos por las altas temperaturas (mayores a 50°C) que se presentaron en el medio filtrante, y estos fueron *Methyloversatilis* y *Chelativorans*.

Los puntos de muestreo donde se identificó el mayor cambio en la comunidad microbiana durante las fases experimentales fueron la parte central con base en los índices de Jaccard. En este trabajo fue muy notorio cómo la temperatura dentro del biofiltro varió proporcionalmente respecto a la concentración de CH₄ alimentado. Este comportamiento fue más notorio en la Fase 3, la cual tuvo un mejor control del metano alimentado (2%v/v).

Los perfiles microbianos identificados para cada fase experimental no evidenciaron grandes cambios, mostrando una comunidad microbiana relativamente uniforme (no especializada en alguna especie o género) durante la operación de cada fase. De las tres fases experimentales, la 3 tuvo mayor evidencia de presencia de microorganismos metilótrofos en los perfiles de bandeado, posiblemente por la mayor carga de CH₄ en comparación con las otras 2 fases experimentales.

La eficiencia de remoción del metano no se pudo relacionar con la presencia de los microorganismos metanótrofos. La fase 1 tuvo amplias variaciones de entrada de carga másica de CH₄; para la fase 2, la carga másica de CH₄ fue lo suficientemente baja y pudo ser removida al 100%; y en la Fase 3, mayor carga y sin presencia de H₂S, se alcanzaron altas temperaturas en la zona central del biofiltro, por arriba de 60°C, las cuales inhibieron la actividad metanótrofa, a pesar de la presencia registrada de termófilos en tales condiciones.

La hipótesis de este proyecto no pudo ser debidamente probada debido a que el consumo de CH₄ y los microorganismos que lo oxidan, no se vieron afectados en concentraciones de H₂S mayores a 500 ppm_v, ya que este gas era oxidado en los primeros centímetros del medio filtrante, por abajo del punto de muestreo inferior en esta investigación. Sin embargo, en la comunidad microbiana, sí se pudo observar cómo los microorganismos consumidores de CH₄ tuvieron mayor presencia en la fase 3, en particular los termófilos, debido a la mayor carga másica de entrada y consecuentemente el registro de mayor temperatura en el seno del medio filtrante.

6.2 Recomendaciones

Otras técnicas que pueden ser utilizadas para el estudio de las comunidades microbianas en este tipo de muestras ambientales, son la metagenómica y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés). Con la metagenómica puede realizarse una determinación de abundancia relativa de los microorganismos presentes con la secuenciación del gen 16S. Con la qPCR se puede detectar la abundancia de algún gen de función específica para metanótrofos y sulfoxidantes y así tener más información sobre la comunidad microbiana.

El estudio de la comunidad microbiana involucrada en procesos de biorremediación permite conocer a mayor profundidad cómo los microorganismos intervienen en el proceso de biorremediación, en este caso de la eliminación de metano, y de este modo, identificar qué tanto se involucra la parte biológica y que tanto la fisicoquímica.

7 Bibliografía

- Acinas, S.G., 2007. Diversidad y estructura de una comunidad microbiana. Actual. SEM-Bol Inf Soc Esp Microb 24–29.
- Albanna, M., Fernandes, L., Warith, M., 2007. Methane oxidation in landfill cover soil; the combined effects of moisture content, nutrient addition, and cover thickness. *J. Environ. Eng. Sci.* 6, 191–200. <https://doi.org/10.1139/s06-047>
- Anthony, C., 1983. The biochemistry of methylotrophs. *Trends Biochem. Sci.* 8, 342–343. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90116-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90116-0)
- Barcón, T., Hernández, J., Gómez-Cuervo, S., Garrido, J.M., Omil, F., Barcón, T., Hernández, J., Gómez-Cuervo, S., Garrido, J.M., Omil, F., 2015. Characterization and biological abatement of diffuse methane emissions and odour in an innovative wastewater treatment plant. *Environ. Technol.* 36, 2105–2114. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1021859>
- Barzgar, S., Hettiaratchi, J.P., Pearce, L., Kumar, S., 2017. Inhibitory effects of acidic pH and confounding effects of moisture content on methane biofiltration. *Bioresour. Technol.* 245, 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.188>
- Bedard, C., Knowles, R., 1989. CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiology* 53, 68–84.
- Boeckx, P., Van Cleemput, O., Villaralvo, I., 1996. Methane emission from a landfill and the methane oxidising capacity of its covering soil. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1397–1405. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00147-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00147-2)
- Brandt, E.M.F., Duarte, F. V., Vieira, J.P.R., Melo, V.M., Souza, C.L., Araújo, J.C., Chernicharo, C.A.L., 2016. The use of novel packing material for improving methane oxidation in biofilters. *J. Environ. Manage.* 182, 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.075>
- Brandt, E.M.F., Noyola, A., Mcadam, E.J., 2019. Chapter 9 Control of diffuse emissions in UASB reactors treating sewage, en: *Anaerobic Reactors for Sewage Treatment: Design, Construction and Operation*. pp. 237–274.
- Cabrol, L., Malhautier, L., Poly, F., Lepeuple, A.S., Fanlo, J.L., 2010. Assessing the bias linked to DNA recovery from biofiltration woodchips for microbial community investigation by fingerprinting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 779–790. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2253-8>
- Cáceres, M., Gentina, J.C., Aroca, G., 2014. Oxidation of methane by *Methylomicrobium album* and *Methylocystis* sp. in the presence of H₂S and NH₃. *Biotechnol. Lett.* 36, 69–74. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1339-7>
- Campbell, C., 2017. Advances in testing and monitoring of biocides in oil and gashy, *Trends in*

Oil and Gas Corrosion Research and Technologies: Production and Transmission. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101105-8.00021-8>

- Cantera, S., Lebrero, R., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.002>
- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., Verstraete, W., 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 303–314. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2858-y>
- Chen, M.H., Sheu, S.Y., James, E.K., Young, C.C., Chen, W.M., 2013. *Azoarcus olearius* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3755–3761. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.050609-0>
- CONAGUA, (Comisión Nacional del Agua), 2018. Estadísticas del agua en México 2018 306.
- Corteselli, E.M., Aitken, M.D., Singleton, D.R., 2017. Description of *Immundisolibacter cernigliae* gen. Nov., sp. nov., a high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium within the class Gammaproteobacteria, and proposal of Immundisolibacterales ord. nov. and Immundisolibacteraceae fa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001714>
- Cruz, C.D., Salgado, C.C., Bhering, L.L., 2014. Biometrics Applied to Molecular Analysis in Genetic Diversity, Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418672-9.00003-9>
- Dedysh, S.N., Khmelenina, V.N., Suzina, N.E., Trotsenko, Y.A., Semrau, J.D., Liesack, W., Tiedje, J.M., 2002. *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogen-fixing acidophilic bacterium from Sphagnum bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 251–261. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-251>
- Delhoménie, M.C., Heitz, M., 2005. Biofiltration of air: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 53–72. <https://doi.org/10.1080/07388550590935814>
- Di Natale, C., Martinelli, E., 2019. Data Analysis. *Breath Anal.* 81–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814562-3.00005-9>
- Dijkshoorn, L. (Leiden U.M.C., Towner, K.J. (Queen's M.C., Struelens, M. (Hôpital E. (Eds.), 2001. *New Approaches for the Generation and Analysis of Microbial Typing Data*, Primera. ed. Elsevier Science B.V.
- Doronina, N. V., Kaparullina, E.N., Trotsenko, Y.A., 2016. Emended description of *Methylovorus glucosotrophus govorukhina* and *trotsenko* 1991. *Microbiol. (Russian Fed.)* 85, 548–552. <https://doi.org/10.1134/S0026261716050040>

- Doronina, N. V., Kaparullina, E.N., Trotsenko, Y.A., 2014. *Methyloversatilis thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant facultative methylophile isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 158–164. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.055046-0>
- Doronina, N. V., Kaparullina, E.N., Trotsenko, Y.A., 2011. *Methylovorus menthalis*, a novel species of aerobic obligate methylobacteria associated with plants. *Microbiology* 80, 713–719. <https://doi.org/10.1134/S0026261711050043>
- Doronina, N. V., Ivanova, E.G., Trotsenko, Y.A., 2005. Phylogenetic position and emended description of the genus *Methylovorus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 903–906. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63111-0>
- Du Plessis, C.A., Strauss, J.M., Sebatlo, E.M.T., Riedel, K.H.J., 2003. Empirical model for methane oxidation using a composted pine bark biofilter. *Fuel* 82, 1359–1365. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(03\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(03)00040-1)
- Estrada, J.M., Lebrero, R., Quijano, G., Pérez, R., Figueroa-González, I., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2014. Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chem. Eng. J.* 253, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053>
- Fahrbach, M., Kuever, J., Remesch, M., Huber, B.E., Kämpfer, P., Dott, W., Hollender, J., 2008. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2215–2223. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65342-0>
- Falagán, C., Johnson, D.B., 2014. *Acidibacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic ferric iron-reducing gammaproteobacterium. *Extremophiles* 18, 1067–1073. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0684-3>
- Farhan Ul Haque, M., Gu, W., Baral, B.S., DiSpirito, A.A., Semrau, J.D., 2017. Carbon source regulation of gene expression in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 3871–3879. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8121-z>
- Fernández Suárez, M. del R., Le Borgne, S., 1987. DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. *Herramientas Mol. Apl. en Ecol.* 149–174.
- Friedrich, C.G., 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Advances in microbial physiology*. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60018-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60018-1)
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Ouentmeier, A., Fischer, J., 2001. Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2873–2882. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2873-2882.2001>
- Gómez-Borraz, T.L., 2017. Biofiltración de metano para el control de las emisiones generadas en reactores anaerobios municipales. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- Gómez-Borraz, T.L., González-Sánchez, A., Bonilla-Blancas, W., Revah, S., Noyola, A., 2017. Characterization of the biofiltration of methane emissions from municipal anaerobic effluents. *Process Biochem.* 63, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.011>
- Gonzalez, J.M., Mayer, F., Moran, M.A., Hodson, R.E., Whitman, W.B., 1997. *Sagittula stellata* gen. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 773–780. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-773>
- Gu, J., Mitchell, R., 2006. Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, *The Prokaryotes*. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., Hanson, R.S., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471. <https://doi.org/10.1099/00207713-60-3-439>
- He, R., Chen, M., Ma, R.C., Su, Y., Zhang, X., 2017. Ammonium conversion and its feedback effect on methane oxidation of *Methylosinus sporium*. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.003>
- Hezbri, K., Nouioui, I., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Gtari, M., Klenk, H.P., Montero-Calasanz, M.D.C., Ghodhbane-Gtari, F., 2018. *Blastococcus xanthinilyticus* sp. Nov., isolated from monument. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1177–1183. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002646>
- Huete, A., de los Cobos-Vasconcelos, D., Gómez-Borraz, T., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola, A., 2018. Control of dissolved CH₄ in a municipal UASB reactor effluent by means of a desorption – Biofiltration arrangement. *J. Environ. Manage.* 216, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.06.061>
- Huete Chevez, Á.F., 2017. Eliminación biológica de metano y sulfuro de hidrogeno provenientes del tratamiento anaerobio de agua residual municipal. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hutton, W.E., ZoBell, C.E., 1949. The occurrence and characteristics of methane-oxidizing bacteria in marine sediments. *J. Bacteriol.* 58, 463–473.
- Hwang, C.Y., Kim, M.H., Bae, G.D., Zhang, G.I., Kim, Y.H., Cho, B.C., 2009. *Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1856–1861. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.007708-0>
- Jung, Y.T., Kang, S.J., Oh, T.K., Yoon, J.H., Kim, B.H., 2009. *Planomicrobium flavidum* sp. nov., isolated from a marine solar saltern, and transfer of *Planococcus stackebrandtii* Mayilraj et al. 2005 to the genus *Planomicrobium* as *Planomicrobium stackebrandtii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2929–2933. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.009191-0>
- Kalyuzhnaya, M.G., Puri, A.W., Lidstrom, M.E., 2015. Metabolic engineering in methanotrophic

- bacteria. *Metab. Eng.* 29, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>
- Kim, J.J., Alkawally, M., Brady, A.L., Rijpstra, W.I.C., Damsté, J.S.S., Dunfield, P.F., 2013. *Chryseolinea serpens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 654–660. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039404-0>
- Kim, S.J., Ahn, J.H., Weon, H.Y., Hong, S.B., Seok, S.J., Kim, J.S., Kwon, S.W., 2015. *Chujaibacter soli* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *J. Microbiol.* 53, 592–597. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5136-y>
- Kolb, S., 2009. Aerobic methanol-oxidizing Bacteria in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01681.x>
- Lebrero, R., López, J.C., Lehtinen, I., Pérez, R., Quijano, G., Muñoz, R., 2016. Exploring the potential of fungi for methane abatement: Performance evaluation of a fungal-bacterial biofilter. *Chemosphere* 144, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.017>
- Lee, S.A., Kim, Y., Sang, M.K., Song, J., Kwon, S.W., Weon, H.Y., 2019. *Chryseolinea soli* sp. nov., isolated from soil. *J. Microbiol.* 57, 122–126. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8562-4>
- Lee, S.J., 2016. Hydroxylation of methane through component interactions in soluble methane monooxygenases. *J. Microbiol.* 54, 277–282. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5642-6>
- Long, Y.Y., Liao, Y., Zhang, K., Hu, L.F., Fang, C.R., Shen, D.S., 2013. Can H₂S affect the methane oxidation in a landfill? *Ecol. Eng.* 60, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.09.006>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2015. *Brock. Biología de los microorganismos*, 14^o. ed. PEARSON EDUCACIÓN, Madrid.
- Maestre, J.P., Rovira, R., Gamisans, X., Kinney, K.A., Kirisits, M.J., Lafuente, J., Gabriel, D., 2009. Characterization of the bacterial community in a biotrickling filter treating high loads of H₂S by molecular biology tools. *Water Sci. Technol.* 59, 1331. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.111>
- Majdinasab, A., Yuan, Q., 2017. Performance of the biotic systems for reducing methane emissions from landfill sites: A review. *Ecol. Eng.* 104, 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.015>
- Martineau, C., Mauffrey, F., Villemur, R., 2015. Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitratorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5003–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.00848-15>
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W., 2008. How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10, 1571–1581. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01572.x>
- Matlock, B., 2015. Assessment of Nucleic Acid Purity, Technical Note Thermo Fisher Scientific.

- Wilmington, MA, USA. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11821.5896>
- Mi, W.-X., Xie, B., Xu, Y.-T., 2008. Analysis of microbial community in a deodorization biofilter by PCR-sSCP method. *Huan Jing Ke Xue* 29, 1992–1997.
- Morales, M., Hernández, S., Cornabé, T., Revah, S., Auria, R., 2003. Effect of drying on biofilter performance: Modeling and experimental approach. *Environ. Sci. Technol.* 37, 985–992. <https://doi.org/10.1021/es025970w>
- Morgan-Sagastume, J.M.M., Noyola, A., 2006. Hydrogen sulfide removal by compost biofiltration: Effect of mixing the filter media on operational factors. *Bioresour. Technol.* 97, 1546–1553. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.003>
- Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F.-M., Collins, W., Fuglestvedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J.-F., Lee, D., Mendoza, B., Nakajima, T., Robock, A., Stephens, G., Takemura, T., Zhang, H., 2013. Anthropogenic and Natural Radiative Forcing, *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.018>
- Nguyen, N.L., Yu, W.J., Gwak, J.H., Kim, S.J., Park, S.J., Herbold, C.W., Kim, J.G., Jung, M.Y., Rhee, S.K., 2018. Genomic insights into the acid adaptation of novel methanotrophs enriched from acidic forest soils. *Front. Microbiol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01982>
- Nikiema, J., Brzezinski, R., Heitz, M., 2007. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 6, 261–284. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9114-z>
- Nogi, Y., Yoshizumi, M., Hamana, K., Miyazaki, M., Horikoshi, K., 2014. *Povalibacter uvarum* gen. nov., sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading bacterium isolated from grapes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2712–2717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062620-0>
- Noyola, A., Capdeville, B., Roques, H., 1988. Anaerobic Treatment of Domestic Sewage With a Rotating-Stationary Fixed-Film Reactor. *Water Res.* 22, 1585–1592. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90172-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(88)90172-8)
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J.M., López-Hernández, J.E., 2006. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: Odor control and energy/resource recovery. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 93–114. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-2754-6>
- Noyola, A., Paredes, M.G., Morgan-Sagastume, J.M., Güereca, L.P., 2016. Reduction of Greenhouse Gas Emissions From Municipal Wastewater Treatment in Mexico Based on Technology Selection. *Clean - Soil, Air, Water* 44, 1091–1098. <https://doi.org/10.1002/clen.201500084>

- Pawłowska, M., Rozej, A., Stepniowski, W., 2011. The effect of bed properties on methane removal in an aerated biofilter - Model studies. *Waste Manag.* 31, 903–913. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.10.005>
- Purswani, J., Silva-Castro, G.A., Guisado, I.M., González-López, J., Pozo, C., 2014. Biological and chemical analyses of a laboratory-scale biofilter for oxygenate bioremediation in simulated groundwater. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11, 1517–1526. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0348-3>
- Regalado, A., 2005. PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN [WWW Document]. Plataforma en Red. Banco Nac. ADN Carlos III. URL <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> (consultado 4.25.20).
- Reichenbach, H., 2006. The Order Cytophagales, en: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass*. Springer New York, New York, NY, pp. 549–590. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_20
- Román, P., Martínez, M.M., Pantoja, A., 2013. Manual de compostaje del agricultor, Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Santiago de Chile.
- Romano, I., Giordano, A., Lama, L., Nicolaus, B., Gambacorta, A., 2003. *Planococcus rifietensis* sp. nov, isolated from algal mat collected from a sulfurous spring in Campania (Italy). *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 357–366. <https://doi.org/10.1078/072320203322497383>
- Ross, M.O., Rosenzweig, A.C., 2016. A tale of two methane monooxygenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1419-y>
- Ruiz Ruiz, P.E., 2017. Dinámica microbiana en biofiltros para el control de emisiones de CH₄ y H₂S de efluentes anaerobios municipales. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saddler, G.S., Bradbury, J.F., 2005. Xanthomonadales ord. nov. *Bergey's Manual® Syst. Bacteriol.* 63–122. https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_3
- Sanchez Rodriguez, A.D., 2015. Biofiltración de metano y sulfuro de hidrógeno de biogás diluido. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Schäfer, H., Muyzer, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods Microbiol.* 30, 425–468. [https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(01\)30057-0](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(01)30057-0)
- Schleifer, K., 2009. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: De Vos P. et al. (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.*, 2a ed, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer-Verlag, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>

- Sghaier, H., Hezbri, K., Ghodhbane-Gtari, F., Pujic, P., Sen, A., Daffonchio, D., Boudabous, A., Tisa, L.S., Klenk, H.P., Armengaud, J., Normand, P., Gtari, M., 2016. Stone-dwelling actinobacteria *Blastococcus saxobidens*, *Modestobacter marinus* and *Geodermatophilus obscurus* proteogenomes. *ISME J.* 10, 21–29. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.108>
- Shareefdeen, Z., Singh, A., 2005. *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*, *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York. https://doi.org/10.1007/3-540-27007-8_3
- Syed, R.A., 2016. Understanding methanotroph ecology in a biofilter for efficiently mitigating methane emissions. Massey University.
- Trotsenko, Y.A., Khmelenina, V.N., 2002. Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch. Microbiol.* 177, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s00203-001-0368-0>
- Turgeon, N., le Bihan, Y., Buelna, G., Bourgault, C., Verreault, S., Lessard, P., Nikiema, J., Heitz, M., 2011. Application of methanotrophic biofilters to reduce GHG generated by landfill in Quebec City (Canada). *WIT Trans. Ecol. Environ.* 147, 387–397. <https://doi.org/10.2495/AIR110361>
- Wang, C., Dong, D., Wang, Haoshu, Müller, K., Qin, Y., Wang, Hailong, Wu, W., 2016. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: New insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnol. Biofuels* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0440-2>
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N., 2009. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458, 623–626. <https://doi.org/10.1038/nature07840>
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Yokota, A., 2012. *Thermovum composti* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2991–2996. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.037812-0>
- Yu, Z., Yu, Z., Morrison, M., Morrison, M., 2004. Comparisons of Different Hypervariable Regions of *rrs* Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4800–4806. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4800>
- Zhang, W., Ge, X., Li, Y.F., Yu, Z., Li, Y., 2016. Isolation of a methanotroph from a hydrogen sulfide-rich anaerobic digester for methanol production from biogas. *Process Biochem.* 51, 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.003>
- Zhou, J., Fries, M.R., Chee-Sanford, J.C., Tiedje, J.M., 1995. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 500–506. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-500>

8 Anexos

8.1 Cuantificación y determinación de la integridad del DNA mediante espectrofotometría y electroforesis

A continuación, se muestran los datos que se obtuvieron de la extracción de DNA de la composta en cada fase experimental (Tablas 8.1, 8.2 y 8.3). Se encuentran marcados en negritas los que se obtuvieron cocientes de absorbancias aceptables, que en el caso de A260/A230, son los mayores a 1.5. Los valores no aceptables se pueden deber al arrastre de carbohidratos remanentes en la composta que, al tener restos de jardinería, existe una probabilidad que se presente este tipo de contaminación en el DNA. Para la absorbancia A260/A280 con valores menores a 1.6 se puede asumir a presencia de compuestos aromáticos (Matlock, 2015).

Tabla 8.1. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 1.

Punto	Muestra	[DNA] (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	Rendimiento (μ g/g composta)
4.2	D00	44.5	1.85	1.64	37.2
	D40	46.4	1.72	1.05	44.5
	D53	104.2	1.80	1.43	40.5
	D68	83.2	1.80	1.57	32.6
4.1	D00	43.0	1.83	1.80	36.0
	D40	22.7	1.55	0.65	22.8
	D53	55.5	1.82	1.64	22.0
	D68	55.6	1.77	1.45	19.1
2.2	D00	56.8	1.82	1.74	50.6
	D40	30.6	1.57	0.80	28.7
	D53	131.3	1.80	1.65	50.2
	D68	88.0	1.72	1.12	34.1
2.1	D00	65.5	1.82	1.71	57.1
	D40	35.2	1.67	0.97	33.0
	D53	199.7	1.83	1.66	71.6
	D68	73.8	1.75	1.36	28.9

Tabla 8.2. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 2.

Punto	Muestra	[DNA] (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	Rendimiento (μ g/g composta)
4.2	D04	57.8	1.70	1.19	21.7
	D09	87.6	1.72	1.32	32.5
	D16	73.7	1.78	1.60	26.5
	D24	80.5	1.80	1.59	31.6
4.1	D04	57.5	1.66	1.11	20.5
	D09	58.4	1.69	1.38	22.6
	D16	92.4	1.82	1.77	31.4
2.2	D04	79.8	1.72	1.14	31.9
	D09	87.0	1.78	1.63	32.1
	D16	138.2	1.84	1.83	52.8
	D24	58.6	1.80	1.56	23.2
2.1	D04	83.0	1.77	1.50	21.8
	D09	60.5	1.77	1.50	21.8
	D16	112.0	1.80	1.67	34.9

Para la Fase 2, por complicaciones de extracción de DNA no se realizó el análisis para los puntos 2.1 y 4.1¹⁰, por lo que no se realizaron los análisis correspondientes.

¹⁰ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

Tabla 8.3. Valores de concentración, calidad y rendimiento de la extracción de DNA de muestras de composta de la Fase experimental 3.

Punto	Muestra	[DNA] (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	Rendimiento (μ g/g composta)
4.2	D00	13.8	1.43	0.59	55.1
	D05	95.0	1.86	1.88	379.9
	D14	39.8	1.84	1.64	154.4
	D22	90.9	1.98	1.87	352.7
	D29	135.0	1.86	2.07	531.1
4.1	D00	21.8	1.41	0.61	87.3
	D05	74.8	1.85	1.82	299.3
	D14	18.5	1.85	1.36	72.7
	D22	123.2	1.90	1.85	485.2
	D29	121.1	1.85	1.86	483.2
2.2	D00	74.2	1.85	1.78	296.8
	D05	91.2	1.85	1.85	364.7
	D14	84.5	1.70	1.24	331.9
	D22	120.9	1.73	1.85	469.3
	D29	133.6	1.87	2.10	505.9
2.1	D00	31.8	1.75	1.11	127.1
	D05	79.3	1.86	1.89	317.3
	D14	91.9	1.87	1.92	363.7
	D22	121.6	1.88	1.85	474.3
	D29	87.6	1.84	2.16	326.0

Como se puede observar, en la Fase 3 se obtuvieron mejores rendimientos de extracción de composta (μ g DNA/g composta), lo que pudo deberse a la mejora en la destreza del protocolo de extracción de DNA.

8.2 Amplificación de fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con la PCR punto final se obtuvieron amplicones del tamaño entre 750 pb y 500 pb, que es lo esperado, ya que el tamaño de los amplicones de la sección V3-V5 es de 550 pb más la secuencia grapa de 40 GC. Sin embargo, existen amplificaciones inespecíficas mayores a 750 pb, lo cual se puede atribuir al tiempo de elongación del programa de PCR que fue prolongado (Figuras 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4).

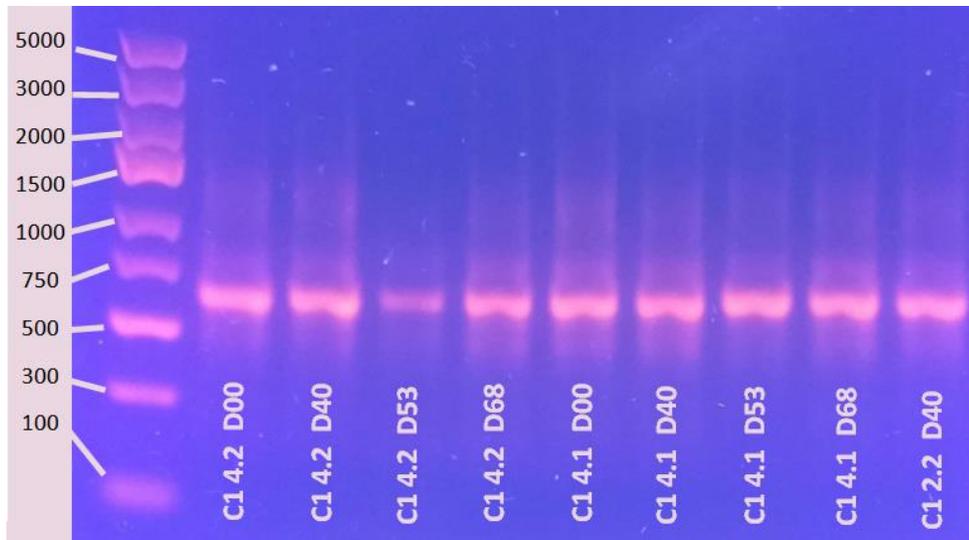


Figura 8.1. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 1 (C1) y para los diferentes puntos de muestreo.

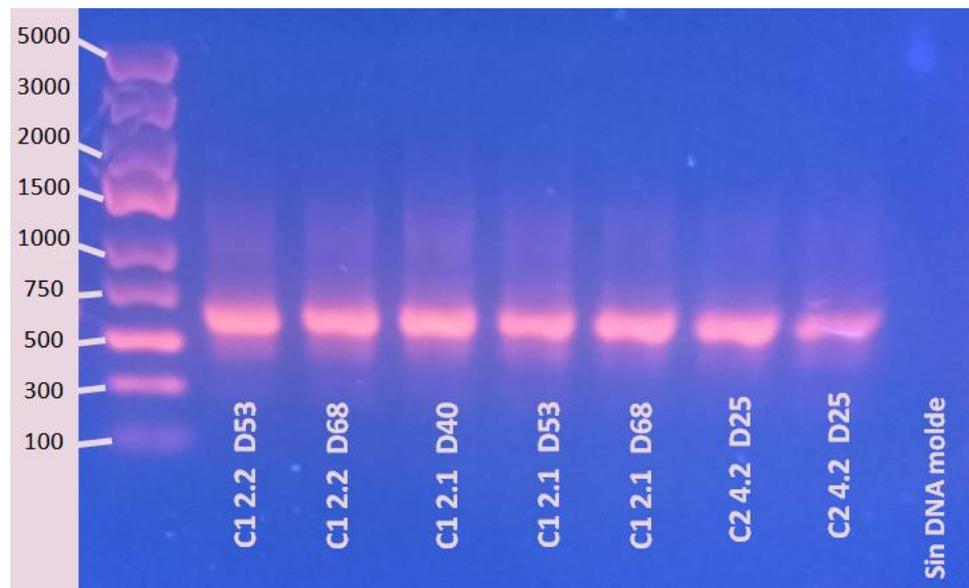


Figura 8.2. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 1 (C1) y 2 (C2) y para los diferentes puntos de muestreo.¹¹

¹¹ Posición en el biofiltro 4.2: Superior centro; 4.1: Superior pared; 2.2: Inferior centro; 2.1 Inferior pared

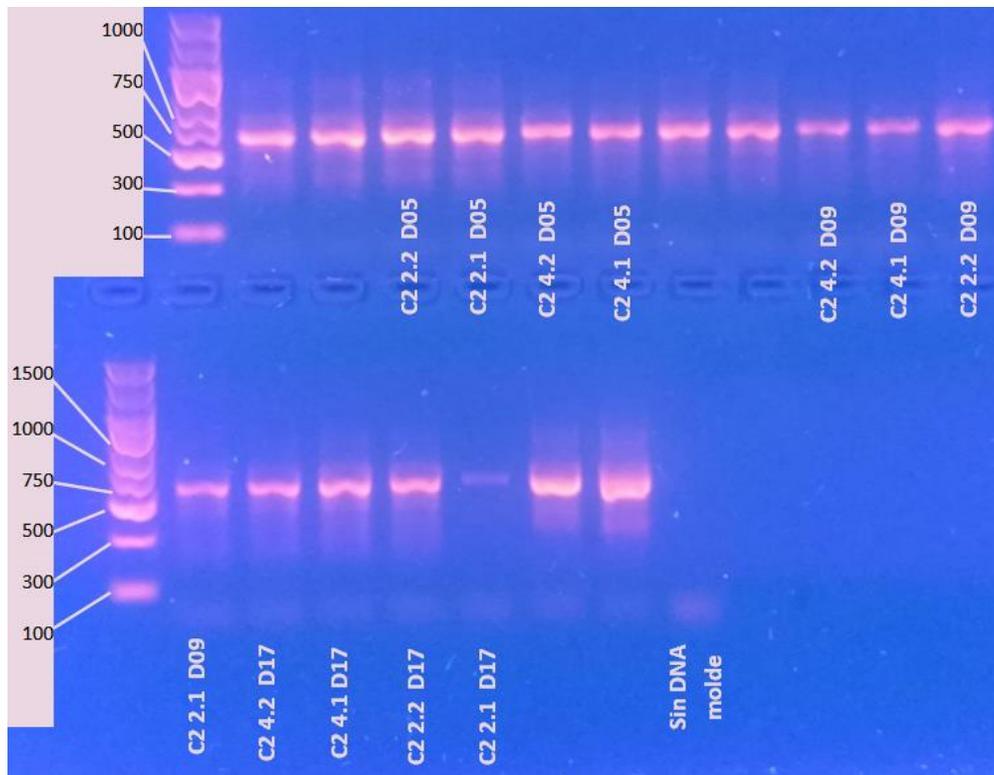


Figura 8.3. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 2 (C2) y para los diferentes puntos de muestreo.

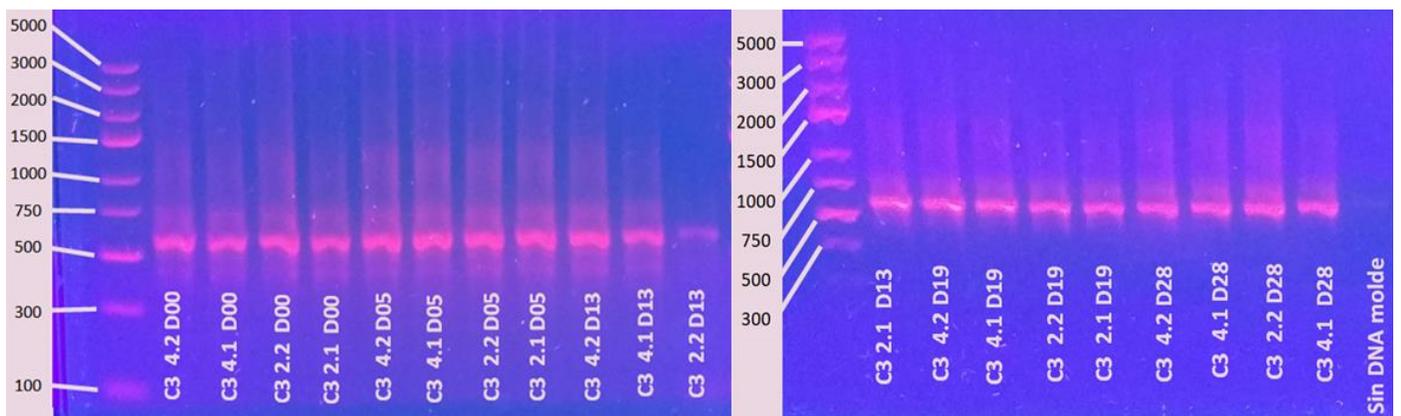


Figura 8.4. Electroforesis en agarosa al 1.4% de los productos de PCR con grapa de GC de las muestras de la Fase Experimental 3 (C3) y para los diferentes puntos de muestreo.

8.3 Purificación de bandas

En las Figuras 8.5 y 8.6 se puede observar ejemplos de reamplificaciones de bandas cortadas de los geles de DGGE de la fase experimentales 2 (F2) y 3 (F3). En las Figuras 8.7 y 8.8 se muestran ejemplos de bandas de las tres fases experimentales ya purificadas y listas para mandar a secuenciar.

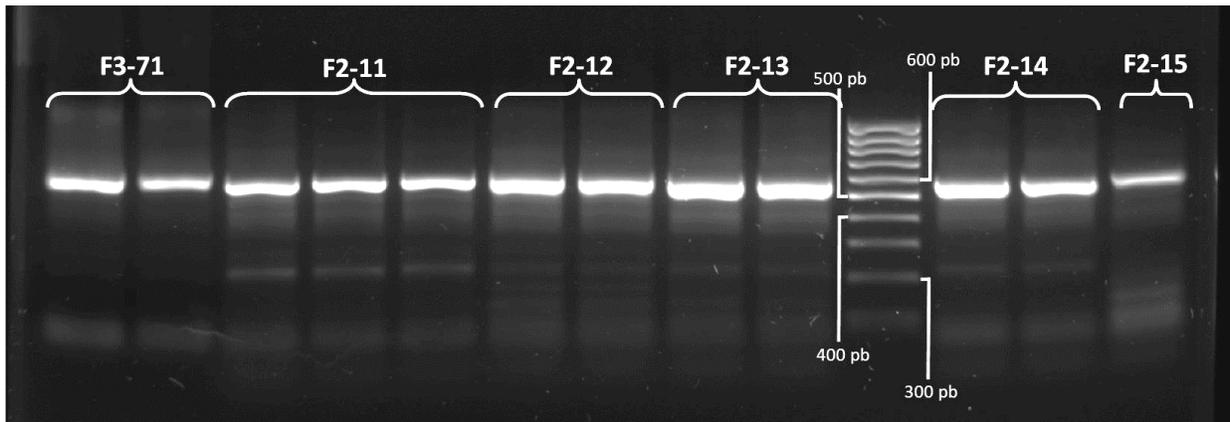


Figura 8.5. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas con amplificaciones inespecíficas.

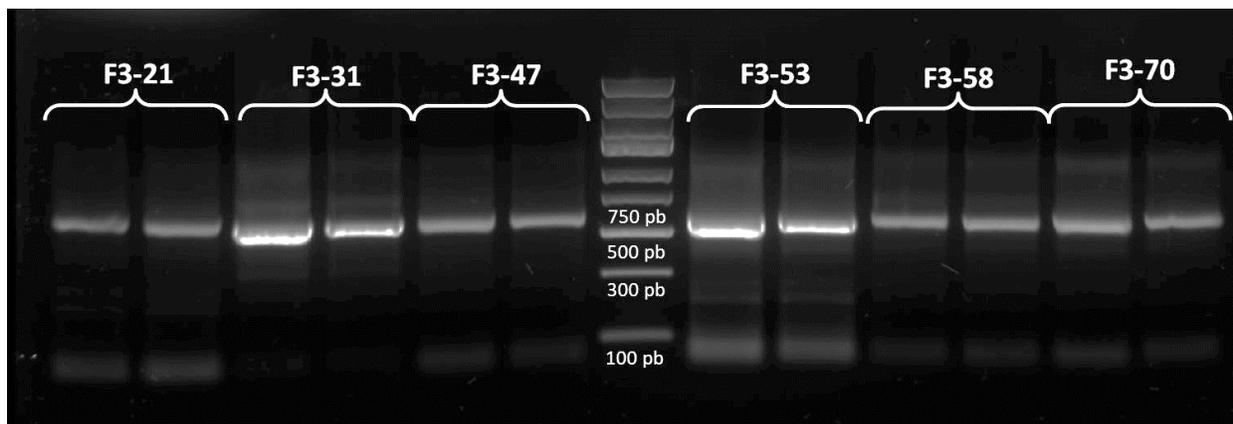


Figura 8.6. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas con amplificaciones inespecíficas.

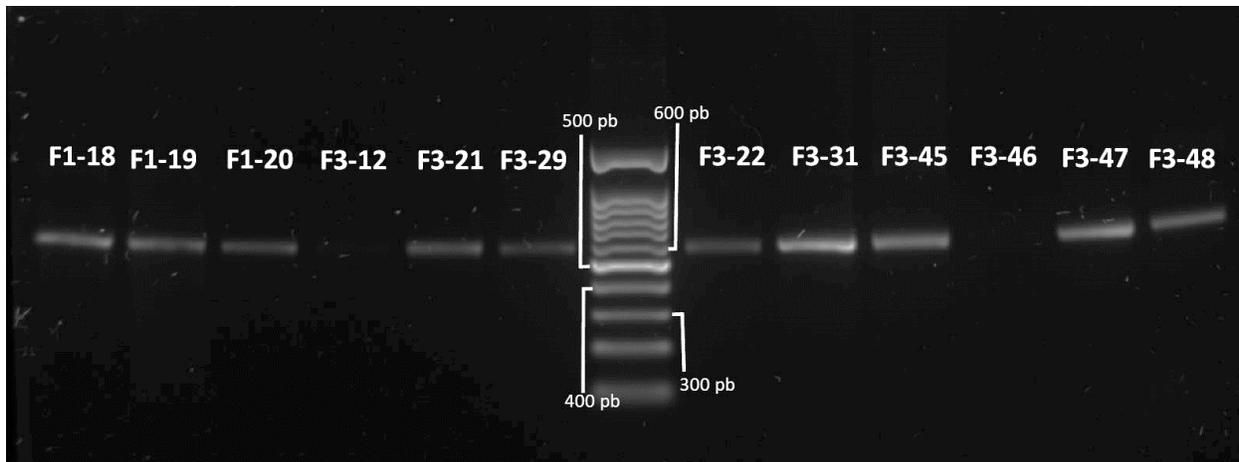


Figura 8.7. Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas después de la purificación con el kit QIAquick Gel Extraction kit. Los lugares donde no se aprecia la banda, significa que se perdió el reamplificación durante la purificación.

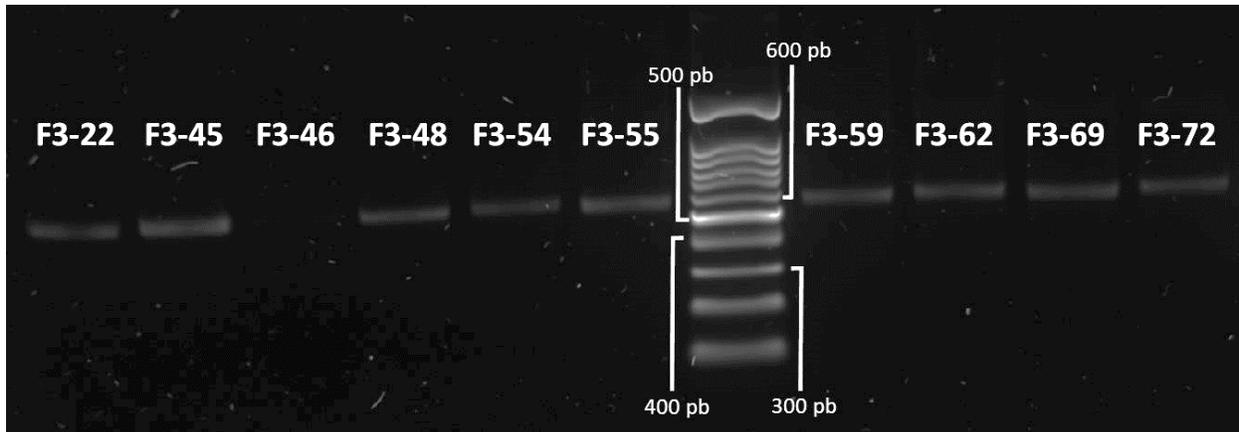


Figura 8.8 Gel de agarosa al 1.5% de bandas reamplificadas después de la purificación con el kit QIAquick Gel Extraction kit. Los lugares donde no se aprecia la banda, significa que se perdió el reamplificación durante la purificación.

8.4 Índices de organización de las comunidades microbianas.

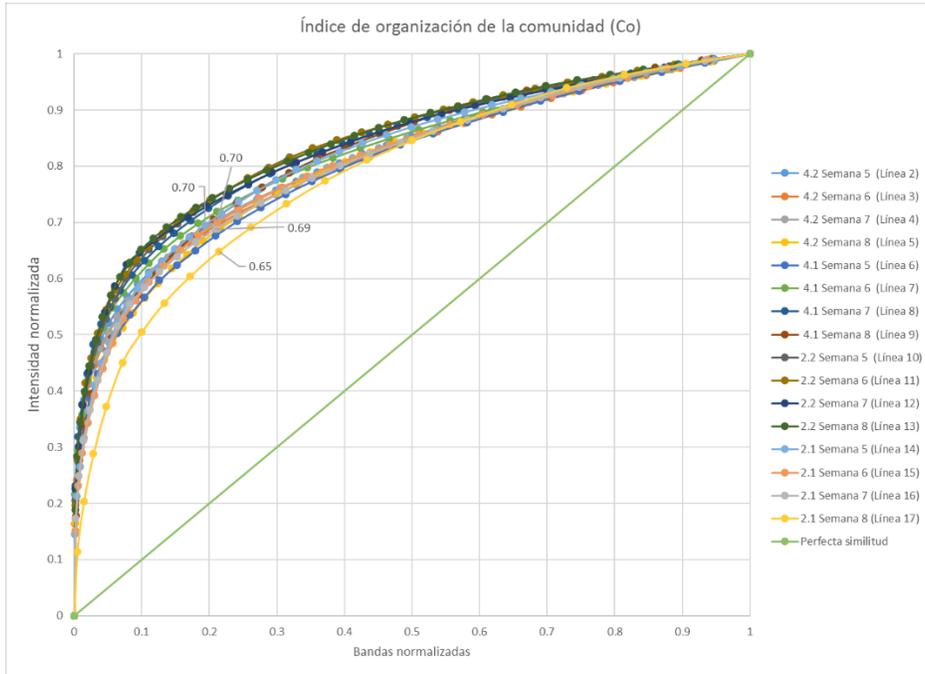


Figura 8.9. Índices de organización de la comunidad de la fase 1 Experimental, gel 1.

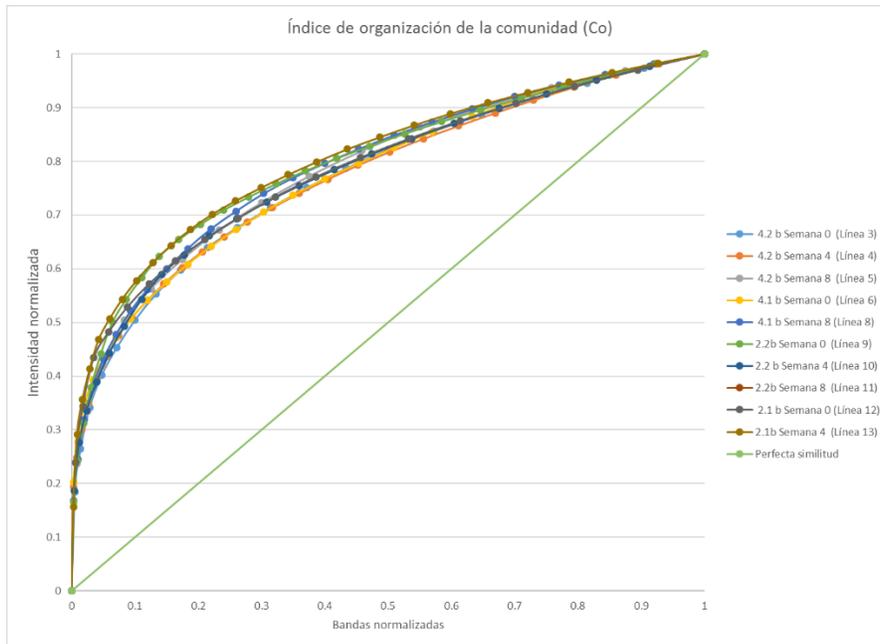


Figura 8.10. Índice de organización de la comunidad de la fase 1 experimental de las semanas 0, 4 y 8.

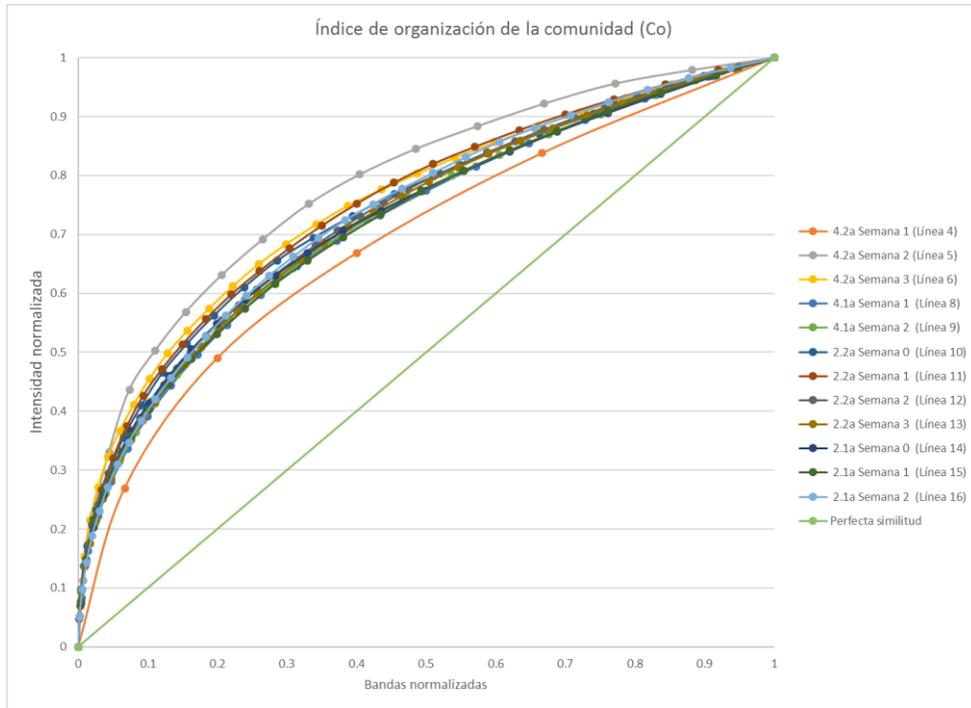


Figura 8.11. Índice de organización de la comunidad de la fase experimental 2, gel 2.

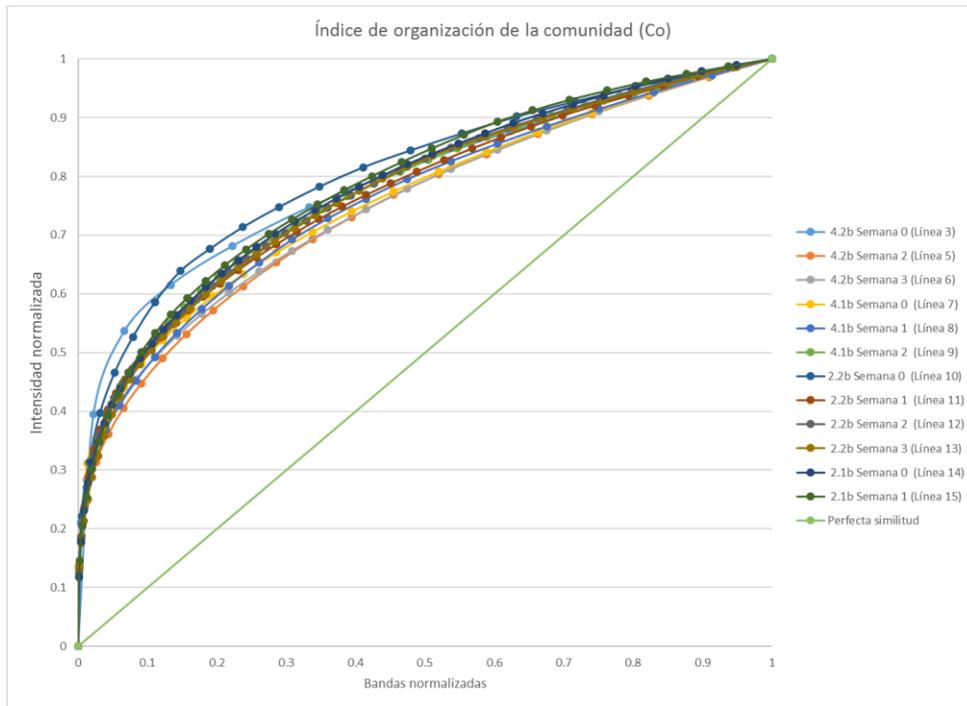


Figura 8.12. Índice de organización de la comunidad de la fase experimental 2, gel 4.

8.5 Valores de Sorensen-Dice y su evolución a lo largo del tiempo.

Sorensen-Dice		4.2				4.1				2.2				2.1			
		D00	D40	D53	D68												
4.2	D00	1.00	0.70	0.40	0.44	0.68				0.56				0.67			
	D40		1.00	0.52	0.57		0.81				0.76				0.56		
	D53			1.00	0.55			0.42				0.35				0.37	
	D68				1.00				0.59				0.55				0.51
4.1	D00					1.00	0.84	0.42	0.75	0.80				0.59			
	D40						1.00	0.40	0.65		0.84				0.54		
	D53							1.00	0.37			0.34				0.36	
	D68								1.00				0.54				0.41
2.2	D00									1.00	0.84	0.64	0.52	0.51			
	D40										1.00	0.71	0.60		0.63		
	D53											1.00	0.82			0.70	
	D68												1.00				0.71
2.1	D00													1.00	0.69	0.62	0.54
	D40														1.00	0.65	0.69
	D53															1.00	0.76
	D68																1.00

Figura 8.13. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 1 Experimental.

Sorence-Dice		4.2				4.1			2.2				2.1		
		D04	D09	D16	D24	D04	D09	D16	D04	D09	D16	D24	D04	D09	D16
4.2	D04	1.00	0.63	0.67	0.52	0.74			0.53				0.53		
	D09		1.00	0.89	0.52		0.80			0.64				0.75	
	D16			1.00	0.55			0.67			0.58				0.73
	D24				1.00							0.46			
4.1	D04					1.00	0.78	0.73	0.64				0.64		
	D09						1.00	0.78		0.67				0.80	
	D16							1.00			0.80				0.70
2.2	D04								1.00	0.80	0.64	0.58	0.73		
	D09									1.00	0.86	0.76		0.73	
	D16										1.00	0.71			0.69
	D24											1.00			
2.1	D04												1.00	0.63	0.70
	D09													1.00	0.70
	D16														1.00

Figura 8.14. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandeo de la DGGE de la fase 2 Experimental.

Sorence-Dice		4.2				4.1				2.2				2.1			
		D05	D13	D19	D28												
4.2	D05	1.00	0.58	0.71	0.61	0.70				0.80				0.48			
	D13		1.00	0.58	0.56		0.84				0.18				0.57		
	D19			1.00	0.77			0.57				0.67				0.53	
	D28				1.00				0.52				0.63				0.64
4.1	D05					1.00	0.64	0.56	0.53	0.74				0.55			
	D13						1.00	0.52	0.59		0.61				0.64		
	D19							1.00	0.70			0.71				0.56	
	D28								1.00				0.38				0.53
2.2	D05									1.00	0.50	0.36	0.31	0.58			
	D13										1.00	0.71	0.63		0.64		
	D19											1.00	0.87			0.65	
	D28												1.00				0.59
2.1	D05													1.00	0.62	0.56	0.62
	D13														1.00	0.65	0.75
	D19															1.00	0.71
	D28																1.00

Figura 8.15. Valores de Sorensen-Dice obtenidos a partir del perfil de bandejo de la DGGE de la fase 3 Experimental.