



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE INVESTIGACIÓN

**OXIDACIÓN SIMULTÁNEA DE METANO Y SULFURO DE
HIDRÓGENO EN BIOFILTROS EMPACADOS**

presenta

ZULLY PALOMA RAMOS BAUTISTA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

TUTOR DEL TRABAJO

ADALBERTO NOYOLA ROBLES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LENA RUIZ AZUARA

VOCAL: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

SECRETARIO: ADALBERTO NOYOLA ROBLES

1er. SUPLENTE: JOSE CARLOS PAEZ FRANCO

2º SUPLENTE: AZUCENA IBETH CARBALLO VILLALOBOS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS

SUSTENTANTE:

ZULLY PALOMA RAMOS BAUTISTA

Contenido

Contenido	3
Lista de figuras	5
Lista de tablas	8
Lista de abreviaturas	9
1 Introducción	12
1.1 Planteamiento del problema.....	12
1.2 Objetivos.....	14
2 Información general sobre el tema.....	15
2.1 Tratamiento de agua residual y derivados.....	15
2.1.1 Biogás y sistemas de separación gases disueltos en el efluente anaerobio.....	20
2.1.2 Tratamiento de emisiones gaseosas y control de olores en PTAR.....	22
2.2 Biofiltración.....	26
2.2.1 Biofiltración de metano.....	29
2.2.2 Biofiltración de sulfuro de hidrógeno.....	32
2.3 Metano	34
2.3.1 Metano como gas de efecto invernadero.....	35
2.4 Oxidación biológica del metano. Microorganismos metanótrofos	36
2.4.1 Factores principales involucrados en la oxidación biológica del metano.....	41
2.4.2 Ambiente artificial para los metanótrofos	49
2.4.3 Oxidación anóxica o anaerobia de metano.	51
2.4.4 Mecanismo de acción de la enzima metano monooxigenasa	53
2.5 Sulfuro de hidrógeno	62
2.5.1 El sulfuro de hidrógeno en la naturaleza.....	62
2.5.2 Toxicidad del sulfuro de hidrógeno	64
2.5.3 Oxidación y eliminación del sulfuro de hidrógeno.....	67
2.6 Bio-oxidación del sulfuro de hidrógeno. Microorganismos sulfooxidantes.....	69
2.6.1 Condiciones en los hábitats de los sulfooxidantes	71

2.6.2	Oxidación anóxica y óxica	72
2.6.3	Bioquímica de la sulfooxidación	73
2.7	Efecto del sulfuro de hidrógeno sobre la oxidación del metano.	76
2.8	Herramientas de Biología Molecular para el estudio de metanótrofos y sulfooxidantes en biofiltros	79
3	Conclusiones y perspectivas de investigación	84
3.1	Conclusiones.....	84
3.2	Perspectivas de investigación	85
4	Bibliografía	87

Lista de figuras

<i>Figura 1. Caudal de aguas residuales municipales tratadas (m³/s). Datos tomados de SEMARNAT, (2013); CONAGUA (2016).</i>	15
<i>Figura 2. Distribución de tamaño de las PTAR en función del caudal del agua residual a tratar en Latinoamérica. Tomado de Noyola et al. (2012).</i>	16
<i>Figura 3. Integración del proceso de tratamiento de agua residual con algunos ejemplos de métodos. Tomado de Noyola, Morgan y Güereca (2013).</i>	17
<i>Figura 4. Esquema de un reactor UASB. Influyente: agua residual entrante; Efluente agua residual tratada saliente. Tomado de Chong et al. (2012)</i>	18
<i>Figura 5. Esquema de la desorción con aire. Tomado de Huete Chevez (2017)</i>	21
<i>Figura 6. Anillos tipo Pall utilizados como material de empaque para la separación. Tomado de Huete Chevez (2017).</i>	21
<i>Figura 7. Biolavador. Tomado de Gómez-Borraz (2017).</i>	23
<i>Figura 8. Biofiltro percolador. Tomado de Gómez-Borraz (2017).</i>	23
<i>Figura 9. Biofiltro. Tomado de Gómez-Borraz (2017).</i>	24
<i>Figura 10. Esquema de un biofiltro. Tomado de Noyola et al. (2013).</i>	26
<i>Figura 11. Sistema de biofiltración propuesto para tratar las corrientes de metano provenientes de un sistema de tratamiento anaerobio. Tomado de Sanchez Rodriguez (2015).</i>	27
<i>Figura 12. Sistema piloto para la desorción y eliminación biológica de metano y sulfuro de hidrógeno disueltos en el efluente (agua tratada saliente) del reactor UASB. Tomado de Huete Chevez (2017).</i>	28
<i>Figura 13. Número de artículos de investigación publicados sobre el tema biofiltración. Búsqueda realizada en la plataforma Scopus el 31 de mayo de 2018.</i>	29
<i>Figura 14. Movimiento del metano producido por metanógenos en diversas zonas de la superficie terrestre. Tomado de Vogels (1979).</i>	34
<i>Figura 15. Ejemplos de estructuras cristalinas de la enzima metano monooxigenasa. A) Estructura de la pMMO de <i>Methylococcus alcaliphilum</i> 20Z. Tomado de Ro et al., (2018). B) Estructura de la componente hidroxilasa de sMMO de <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath) Tomado de Whittington y Lippard, (2001).</i>	36
<i>Figura 16. Vías de oxidación del metano y asimilación del formaldehído. Abreviaturas: CytC, Citocromo C; pMMO, metano monooxigenasa particulada; sMMO, metano monooxigenasa soluble; MDH: metanol deshidrogenasa; FADH, formaldehído deshidrogenasa; X/XH₂: agente oxidante/agente reductor, puede ser ubiquinona (Q); FDH, formiato deshidrogenasa. Tomado de Hanson, Hanson y Hanson (1996)</i>	38
<i>Figura 17. Vía RuMP para la fijación de formaldehído. Tomado de Hanson, Hanson y Hanson (1996)</i>	39
<i>Figura 18. 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, Hanson y Hanson (1996)</i>	40

Figura 19. A) Dibujo esquemático de metanobactina junto con el esquema de numeración de átomos de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada B) Vista estereoscópica de la superficie de metanobactina modelada con el uso de la interacción disolvente-molécula (la interacción de la sonda es 1,4 Å. Tomado de Kim et al. (2004). __46

Figura 20. Modelo conceptual para la interacción entre los procesos DAMO y anammox en ambientes ricos en metano, amoníaco y nitrato o nitrito. Flujo de material y flujo de electrones se muestra en líneas continuas y líneas punteadas, respectivamente. Figura tomada de Hu et al., (2015) _____52

Figura 21. Enzima sMMO con los componentes hidroxilasa (verde, amarillo y gris) y reductasa (rosa). Las interacciones de estos dos componentes generan los cambios conformacionales importantes para que existan movimientos de protones y electrones en la región de los poros, permitiendo la entrada de metano y oxígeno molecular. Tomado de Lee, (2016). _____53

Figura 22. El componente hidroxilasa de MMO está constituida por distintas subunidades α -(verde) β (amarillo) y γ (gris). Tomado de Lee, (2016) _____53

Figura 23. Sitio de unión entre el componente reductasa e hidroxilasa de la sMMO. a) Estructura del componente hidroxilasa que muestra una zona contenida en los 12 Å del centro diférrico en uno de los monómeros (rojo) y el sitio de unión al componente reductasa (naranja). b) Vista a detalle del poro en la hidroxilasa que muestra los tres residuos que definen el poro y el átomo de hierro 2+ (Fe1) del centro diférrico. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015)._____54

Figura 24. Metano monooxigenasa soluble, incluyendo pasos clave de la oxidación de metano a metanol. Tomado de Rehder, (2014)._____54

Figura 25. a) Modelo acoplado en computadora del modelo del dominio proteico ferredoxina del complejo hidroxilasa-reductasa de sMMO. b) Vista superior de la interface acoplada en el modelo mostrado en a), mostrando el cluster $[Fe_2S_2]$ del componente reductasa (amarillo y naranja), el centro diférrico (naranja oscuro) y residuos seleccionados del componente hidroxilasa. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015) _____55

Figura 26. Estructura cristalina del complejo hidroxilasa-componente regulatorio de sMMO. El componente hidroxilasa se muestra en azul y el componente regulatorio, en morado. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015) _____55

Figura 27. Cambios conformacionales en el sitio catalítico de sMMO. A) En ausencia del componente regulador (MMOB). B) Con el componente MMOB acoplado. Tomado de Lee, (2016). _____56

Figura 28. Trímero de pMMO con un protómero resaltado. Tomado de Hakemian y Rosenzweig, (2007). _____57

Figura 29. Centros metálicos de la estructura cristalina pMMO. A) De dos iones cobre, b) de uno ion cobre y c) un ion zinc. Tomado de Hakemian y Rosenzweig, (2007) _____57

Figura 30. Estructura propuesta para la metanobactina de *Methylosinus trichosporium* OB3b. Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon, (2010). _____58

Figura 31. Vía propuesta de oxidación de CH_4 en células cultivadas en altas y bajas condiciones de Cu. La regulación que favorece la expresión génica de las proteínas en presencia de cobre a alta concentración se muestra en azul; mientras que la regulación que favorece la expresión de proteínas en presencia de cobre a baja concentración se muestra en rojo. Cyt: citocromo; DFalDH: formaldehído deshidrogenasaligada al tinte/quinona; FDH: formato deshidrogenasa; N-FalDH, NAD(P)-ligada a formaldehído deshidrogenasa; NDH-2, deshidrogenasa

<i>NADH tipo 2; pMMO: metano monooxigenasa particulada; Q: Ubiquinona; FAD: flavín adenín dinucleotido; MDH: metanol deshidrogenasa; PQQ pirrolquinolina quinona; sMMO metano monooxigenasa soluble; RuMP, ribulosa monofosfato Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon (2010).</i>	61
<i>Figura 32. Ciclo biogeoquímico del azufre. Tomado de Espinoza, Revah y Le Borgne, (2010)</i>	63
<i>Figura 33. Cadena de transporte de electrones. En números romanos se muestran los complejos que forman la cadena respiratoria.</i>	65
<i>Figura 34. Estructura de las especies químicas que intervienen en la cadena de transporte de electrones. A) NADH; B) Succinato; C) Ubiquinona; D) Citocromo c.</i>	66
<i>Figura 35. 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; S⁰: Azufre; S₂O₃²⁻: Tiosulfato; SO₃²⁻: sulfito y SO₄²⁻: Sulfato. Tomado de Madigan et al. (2015).</i>	70
<i>Figura 36. Posibles rutas metabólicas propuestas para el sulfuro de hidrógeno. Es posible que no todas las rutas y enzimas estén presentes en un solo organismo. Adaptado de Dahl, Friedrich y Kletzin, (2008b)</i>	74
<i>Figura 37. Vía de reacción propuesta que dirige la formación de S⁰ y SO₄²⁻ de la oxidación biológica de sulfuro. Las líneas punteadas representan la Ruta para limitación de oxígeno (RLO), y las líneas sólidas representan la Ruta con suficiente oxígeno (RCO). La UB-pool= fuente de ubiquinona, Q/QH₂ = quinona oxidada/reducida, cyt-pool = fuente de citocromo Tomado de Klok et al., (2012)</i>	75
<i>Figura 38. Estructura del citocromo c. Son proteínas encargadas del transporte de energía química en todas las células vivas. Tomado de Hoffmeier, (2006)</i>	75
<i>Figura 39. A) Biofiltros escala laboratorio con empaque de composta y esponjas de poliuretano y medidas del biofiltro. B) Biofiltro con empaque de composta escala piloto y medidas del biofiltro. Tomado de Gómez-Borraz, (2017) y Huete Chevez, (2017).</i>	77

Lista de tablas

Tabla 1. Concentraciones de metano disuelto reportados en efluentes anaerobios. _____	20
Tabla 2. Ejemplos de sistemas de tratamiento para corrientes gaseosas con metano. Adaptado de Gómez-Borraz et al., (2017) _____	31
Tabla 3. Ejemplos de biofiltración de H ₂ S. _____	33
Tabla 4. Clasificación taxonómica de los microorganismos metanótrofos. Vía RuMP: Vía de la ribulosa monofosfato, Ciclo CBB: Ciclo de fijación de dióxido de carbono (Commons, 2013; Karthikeyan, Chidambarampadmavathy, Nadarajan, & Heimann, 2016) _____	40
Tabla 5. Valores cinéticos de la oxidación biológica de metano en diferentes materiales de suelo en función de la capacidad de la enzima MMO. tabla adaptada de Majdinasab y Yuan (2017). _____	41
Tabla 6. Tasas de oxidación de CH ₄ en estado estacionario medidas en núcleos de tierra de cubierta de relleno sanitario y en núcleos de arena gruesa después de la aplicación de CH ₄ durante 6 meses. Tomado de Kightley, Nedwell y Cooper (1995). _____	42
Tabla 7. Efectos de diferentes nutrientes en los microorganismos metanótrofos. _____	44
Tabla 8. Influencia de la presencia de nitrito (NO ₂ ⁻) y amonio (NH ₄ ⁺) en un inóculo de metanótrofos. Datos tomados de He et al., (2017) _____	45
Tabla 9. Cantidad promedio de metano consumido por día por bacterias metanótrofas durante 6 días a 32°C en una atmósfera inicial conteniendo 20% de CH ₄ , 10% de CO ₂ y variando las presiones parciales del oxígeno y el nitrógeno (Hutton y ZoBell, 1949). _____	47
Tabla 10. Estimaciones de velocidades de oxidación de metano de células específicas de metanótrofos (x10 ⁻¹⁶ mol cel ⁻¹ h ⁻¹) a diferentes concentraciones de metano y oxígeno. Tomado de Li et al., (2014). _____	48
Tabla 11. Velocidades de consumo de metano en diferentes relaciones porcentuales CH ₄ /O ₂ en ensayos de respirometría heterogénea, t=35°C. Tomado de Gómez-Borraz, (2017) _____	48
Tabla 12. Características de diferentes modelos de contenido y fuente reductora de pMMO. Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon, (2010). _____	59
Tabla 13. Efectos del sulfuro de hidrógeno en distintas concentraciones en el ser humano (SIGMA-ALDRICH, 2017). _____	64
Tabla 14. Valores de pH de diferentes especies de sulfooxidantes (Rabbani et al., 2016). _____	71
Tabla 15. Técnicas de Biología Molecular de primer acercamiento usadas en análisis de ecología microbiana en biofiltros. _____	80
Tabla 16. Plataformas de secuenciación de primera, segunda y tercera generación, se especifican los tamaños máximos de lectura. Tomado de López de Heredia (2016). _____	81
Tabla 17. Genes funcionales utilizados para el reconocimiento de microorganismos metanótrofos; (Henckel, Friedrich y Conrad, 1999; McDonald et al., 2008; Chowdhury y Dick, 2013; Lee, 2016). _____	82

Lista de abreviaturas

DNA: ácido desoxirribonucleico

AMCs: carbonos alcalinos mesoporosos (por las siglas en inglés)

anammox: oxidación anaerobia de amonio (por las siglas en inglés)

APS: enzima adenosina fosfosulfato reductasa

AQDS: 9,10-antraquinona2,6-disulfonato

ARISA: Análisis espaciado intergénico ribosómico automatizado

RNA: ácido ribonucleico

CBB: Ciclo de fijación de dióxido de carbono

CycA ox: citocromo c 550 oxidado

Cyt C ox: citocromo c oxidado

Cyt. bc1: Complejo III de la cadena transportadora de electrones

Cyt: citocromo

CytC: Citocromo C

DAMO: Denitrifying anaerobic methane oxidation

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

D-FalDH: enzima formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión o ligada al tinte/quinona

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

FAD/FADH: flavín adenín dinucleótido oxidado/reducido

FAD: flavina adenina dinucleótida

FADH: enzima formaldehido deshidrogenasa

FccAB: Flavocitocromo c sulfuro deshidrogenasa

FDH: formiato deshidrogenasa

FISH: Hibridación con fluorescencia in situ

HPR: hidroxipiruvato reductasa

ITS: Espaciador transcrito interno

Km: Valor de constante de Michaelis-Menten

MCL: malil coenzima A liasa

MDH: enzima metanol deshidrogenasa

MMO: metano monooxigenasa

MMOB: componente regulatorio de la sMMO

MMOH: componente hidroxilasa de la sMMO

MMOR: componente reductasa de la sMMO

MTK: malato tioquinasa

NADH/NAD⁺: nicotimamida adenina dinucleótico reducida/oxidada

NDH-2: deshidrogenasa NADH tipo 2;

N-FalDH: NAD(P)-ligada a formaldehido deshidrogenasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PHB: polímero poli-3-hidroxibutirato

pMMO: metano monooxigenasa particulada

pmoA: componente betha de la pMMO

pmoB: componente alfa de la pMMO

pmoC: componente gamma de la pMMO

PQQ: pirrolquinolina quinona

PTAR: plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR)

Q: ubiquinona

q_{max}: velocidad de biodegradación máxima específica

qPCR: PCR cuantitativa o en tiempo real

RCO: Ruta completa de oxígeno

RLO: Ruta límite de oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RuMP: vía de Ribulosa Monofosfato

sMMO: metano monooxigenasa soluble

Sqr: sulfuro quinona oxidoreductasa

SSCP: Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla

STHM: hidroximetil serina transferasa

T: Temperatura

TetH: tetrionato hidrolasa

TQO: tiosulfato quinona oxidoreductasa

T-RFLP: Polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal

TRLV: Tiempo de retención de lecho vacío

UASB: upflow anaerobic sludge blanket

V_{máx}: Velocidad máxima

1 Introducción

1.1 Planteamiento del problema

El consumo de agua en México es de más de 8 000 m³/s, de acuerdo a la cifra del año 2016 (CONAGUA, 2016), del cual el uso doméstico y público representa aproximadamente el 15% de todo el país.

Las aguas residuales municipales son la combinación de diversas corrientes de agua utilizadas por la población, combinada con aguas subterráneas o de lluvia y que son descargadas a sistemas de drenaje urbanos. En México, se producen aguas residuales municipales en un volumen de 229.3 m³/s y en el año 2015 se aplicó algún tratamiento de agua residual a 120.9 m³/s en 2477 plantas en todo el país, representando el 57% de las aguas residuales producidas al año.

El tratamiento de agua residual se puede llevar cabo por diferentes tipos de tratamiento: físico, químico o biológico. Dentro de los procesos biológicos, están los procesos aerobio y anaerobio. En el proceso anaerobio existen ventajas importantes que lo favorecen, como requerimientos bajos de energía, menor producción de lodos activados y producción de biogás.

En las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) pequeñas (que producen flujos de agua tratada <5 L/s) cuentan con reactores anaerobios, donde existen reacciones bioquímicas que producen biogás, una mezcla de metano (CH₄) 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).

El H₂S representa un riesgo para la salud de los trabajadores de estas plantas, además provoca daños a las instalaciones por ser un gas corrosivo en presencia de oxígeno y agua (formando ácido sulfúrico), y un inconveniente adicional es su mal olor característico, que provoca molestias a la población circundante. Por otra parte, el metano es un potente gas de efecto invernadero con un efecto 34 veces mayor que el CO₂ (Myhre et al., 2013) y, en las plantas tratadoras de agua residual, se trata aproximadamente el 80% del gas metano producido en el tratamiento, mientras que el resto se disuelve en la fase acuosa o es ventilado al ambiente, sumando contaminantes a la atmósfera (Noyola et al., 2016).

Por la producción de emisiones gaseosas con contaminantes se ha decidido el uso de la biofiltración en la que se puede aprovechar la capacidad de degradación de microorganismos y

convertir esos contaminantes a compuestos menos perjudiciales al ambiente siendo el ejemplo del metano y el sulfuro de hidrógeno convertidos a dióxido de carbono y iones sulfato, respectivamente (Nikiema, Brzezinski y Heitz, 2007); además 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 utilizarse en temperatura y presión ambientales (Noyola, Morgan-Sagastume y López-Hernández, 2006).

Es de relevancia la identificación de las condiciones ambientales en las que exista un balance dinámico entre las diferentes comunidades de microorganismos metanótrofos y sulfooxidantes, con el objetivo de mejorar la eficiencia de la eliminación (oxidación) del CH_4 y H_2S en los biofiltros. También, es necesario el estudio del efecto inhibitorio del H_2S en la oxidación del CH_4 para lograr un mejoramiento de los métodos de biofiltración de emisiones gaseosas de las plantas tratadoras de agua residual municipal. Otro punto importante de estudio, es la bioquímica involucrada en los microorganismos que forman parte del sistema, para dejar de ver estos procesos biotecnológicos como cajas negras.

El objetivo de esta investigación es realizar una amplia revisión bibliográfica que involucre a los microorganismos metanótrofos y sulfooxidantes y su interacción en biofiltros; también, conocer las técnicas recientes de Biología Molecular dedicadas al estudio de las dinámicas poblacionales en los biofiltros. Para esto, es importante abarcar el estudio de los mecanismos de las vías metabólicas, así como la repercusión que pueden tener factores externos al proceso metabólico de los microorganismos metanótrofos y sulfooxidantes.

1.2 Objetivos

- Analizar la literatura reciente sobre la biodiversidad y la actividad microbiana de los microorganismos metanótrofos y sulfooxidantes presentes en biofiltros de gases y otros sistemas donde coexistan.
- Identificar las mejores condiciones de trabajo propuestas en la literatura para operar biofiltros alimentados con CH₄ y H₂S.
- Revisar y analizar las técnicas de Biología Molecular más utilizadas en el estudio de las dinámicas poblacionales de los microorganismos en biofiltros de emisiones gaseosas.

2 Información general sobre el tema

2.1 Tratamiento de agua residual y derivados.

El consumo de agua en México es de 8 452.5 m³/s, de acuerdo a la cifra del año 2016 (CONAGUA, 2016), del cual el uso doméstico y público representa el 14.6% de todo el país.

Las aguas residuales son descargas provenientes de uso público urbano, doméstico, industrial, entre otros. Las descargas de aguas residuales se clasifican en municipales y no municipales. Las municipales son generadas en los núcleos de población, lo que incluye descargas industriales y de servicios, y son recolectadas en los sistemas de alcantarillado urbanos y rurales. Mientras que las aguas residuales no municipales son generadas por otros usos, como puede ser la industria autoabastecida y se descargan directamente a cuerpos de aguas nacionales sin ser colectadas por sistemas de alcantarillado municipal (CONAGUA, 2016).

Se producen aguas residuales municipales en un volumen de 229.3 m³/s y en el año 2015 se aplicó algún tipo de tratamiento a 120.9 m³/s de agua residual en 2 477 plantas en todo el país, representando el 57% de las aguas residuales municipales producidas al año. En la Figura 1 se observa el aumento del caudal de aguas residuales municipales tratadas desde 1998 al 2015. Se observa que el tratamiento de agua residual desde 1998 hasta 2015 ha aumentado cerca de 3 veces respecto a la cifra de ese año.

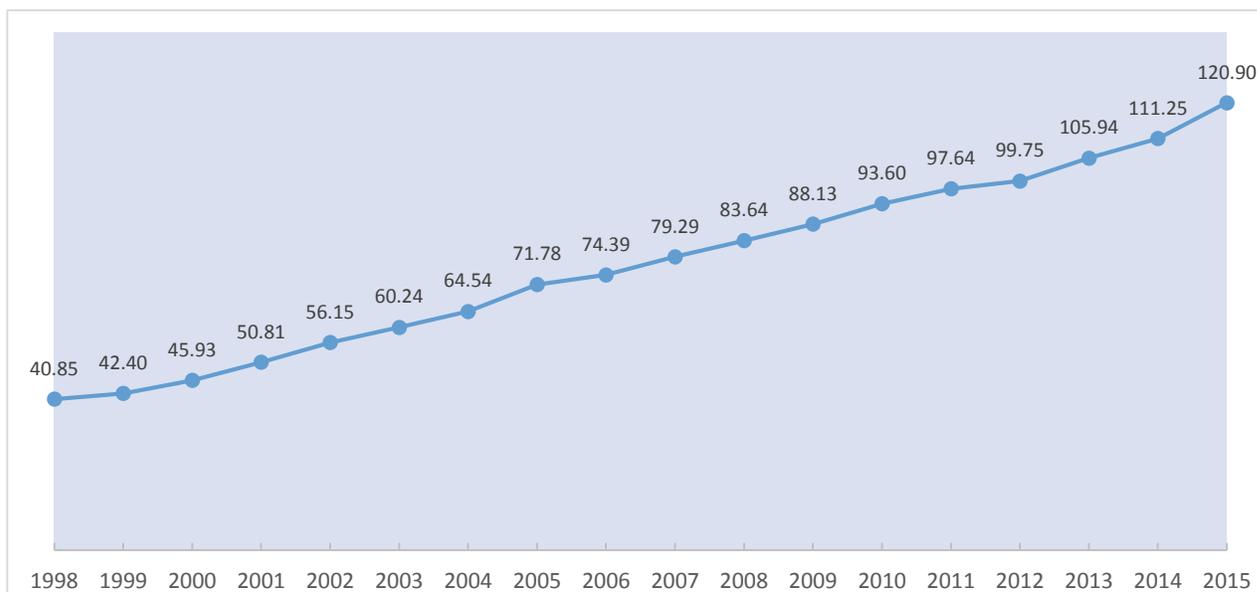


Figura 1. Caudal de aguas residuales municipales tratadas (m³/s). Datos tomados de SEMARNAT, (2013); CONAGUA (2016).

En la producción de aguas residuales no municipales (incluyendo a la industria) se produce 214.6 m³/s que son tratadas en 2 832 plantas con un caudal de 70.5 m³/s tratados; comparando con el dato 1998 (21.95 m³/s) ha aumentado el tratamiento 3.2 veces comparando con el dato del 2015.

En una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) se realizan una serie de procesos físicos, químicos y biológicos con la finalidad de eliminar los contaminantes orgánicos e inorgánicos (partículas en suspensión o disueltas) hasta alcanzar una calidad de agua necesaria para su reutilización o la requerida por la normativa de descarga.

El tamaño de las PTAR se define por el flujo de agua a tratar - flujo de diseño - y por el flujo másico orgánico, que es medido como kg de demanda bioquímica (o química) de oxígeno en el influente por unidad de tiempo. Existen plantas municipales que tratan desde 0.1 L/s hasta flujos mayores a 2 500 L/s y en la Figura 2A se puede observar una muestra representativa de las plantas municipales en Latinoamérica de acuerdo con el volumen de agua tratada. Se observa que es mayor el número de PTAR que utilizan flujos menores a 25 L/s. En la Figura 2B se puede ver que es mayor el número de PTAR que tratan flujos por debajo de 5 L/s con 919 PTAR de una muestra de 2722 instalaciones (Noyola et al., 2012).

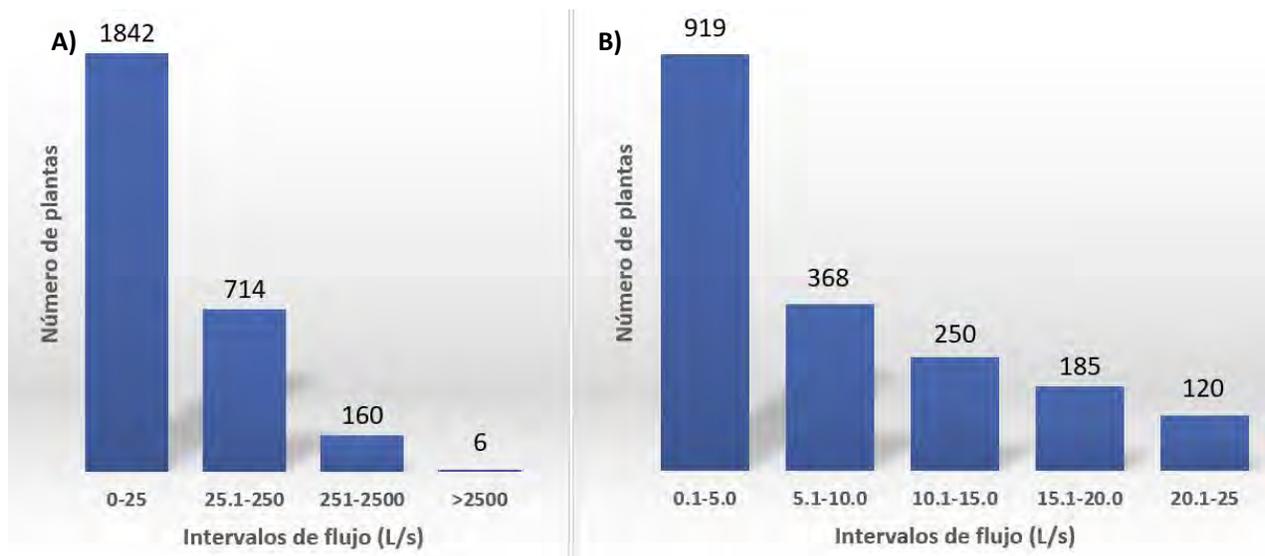


Figura 2. Distribución de tamaño de las PTAR en función del caudal del agua residual a tratar en Latinoamérica. Tomado de Noyola et al. (2012).

En la Figura 3, se puede observar el esquema general de integración de un proceso de tratamiento de agua residual, el cual se divide en 3 etapas: tratamiento preliminar y primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario o avanzado.



Figura 3. Integración del proceso de tratamiento de agua residual con algunos ejemplos de métodos. Tomado de Noyola, Morgan y Güereca (2013).

En el tratamiento secundario se realiza la separación de materia orgánica biodegradable, principalmente mediante dos tipos de procesos: aerobio y anaerobio, existiendo ventajas importantes que favorecen el proceso anaerobio, como los requerimientos bajos de energía (porque no requiere aeración), menor producción de lodos activados (al no ser alimentados los microorganismos por oxígeno), simplicidad y bajos costos de construcción. Sin embargo, este proceso no alcanza la calidad de agua de descarga que los aerobios, por lo que con frecuencia se instala un proceso anaerobio y después un proceso aerobio.

El proceso anaerobio mas utilizado en América Latina es el reactor UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*; Figura 4; Noyola et al. 2012). De acuerdo con la descripción de Chong (2012) este sistema está compuesto por dos partes: una columna y un separador de fases gas-líquido-sólido.



Figura 4. Esquema de un reactor UASB. Influyente: agua residual entrante; Efluente agua residual tratada saliente. Tomado de Chong et al. (2012)

Primero, el reactor es alimentado con agua residual (influyente) en la parte inferior del reactor donde está la biomasa activa (cama o lecho de lodos), en donde se llevan a cabo las reacciones biológicas sobre los contaminantes del agua residual. Conforme el flujo de agua residual pasa por el reactor UASB, los compuestos orgánicos solubles se convierten en biogás, compuesto principalmente por CH_4 y CO_2 . Segundo, el biogás producido y el lodo generado atrapado por las burbujas de gas son apartadas por el separador de fases (que se encuentra sumergido en el reactor). Los deflectores se encargan de evitar el lavado de la materia bacteriana o del lodo en gránulos flotante, deslizando los sólidos a la zona de cama de lodos (Chong et al., 2012). Por último, el agua residual tratada (efluente) sale por un conducto para un posterior tratamiento, mientras que el biogás pasa a un separador para recolección (van Haandel et al., 2006).

El efluente anaerobio contiene metano disuelto que es liberado a la atmósfera una vez fuera del reactor UASB. Tal situación provoca un aumento de las emisiones del CH_4 a la atmósfera, lo que contribuye al fenómeno del cambio climático, por lo tanto, las emisiones de

metano deben ser controladas (Noyola, Morgan-Sagastume y López-Hernández, 2006; Souza, Chernicharo y Aquino, 2011).

En el proceso secundario del tratamiento del agua residual en las plantas de tratamiento pequeñas (flujos de agua tratada <5 L/s) existen ciertos inconvenientes: baja producción de biogás por el limitado flujo másico orgánico; con frecuencia existe operación deficiente de las PTAR debido a que cuentan con pocos recursos financieros y técnicos; y, liberación del biogás sin quemarlo, transfiriendo el metano a la atmósfera potenciando el efecto invernadero en el planeta. (Noyola, Morgan-Sagastume y López-Hernández, 2006).

2.1.1 Biogás y sistemas de separación gases disueltos en el efluente anaerobio.

El biogás es una mezcla que contiene aproximadamente 60% de metano (CH_4), 40% dióxido de carbono (CO_2) y pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno (H_2S), hidrógeno (H_2) y amoníaco (NH_3) obtenido por la degradación anaerobia de residuos orgánicos por medio de bacterias (Wu et al., 2017) y por el contenido de metano, el biogás es posible utilizarlo como combustible.

La producción de electricidad se restringe a PTAR medianas y grandes (tratamiento de flujos de agua residual mayores a 500 L/s), esto debido a que para producir 7.5 kWh de electricidad se requiere de tres metros cúbicos de biogás con una concentración mínima del 65% de metano (Jørgensen, 2009).

Después del proceso de separación de fases que se efectuó en el reactor UASB, en el efluente existe una significativa fracción disuelta de metano en el agua tratada, que varía del 20 al 40% del metano producido en los reactores UASB (Noyola, Capdeville y Roques, 1988; Lobato, Chernicharo y Souza, 2012). En la Tabla 1 se pueden observar las concentraciones de metano diluido en los efluentes tratados, las cuales depende altamente de la temperatura en la que se encuentre este efluente (Matsuura et al., 2015). Por lo tanto, se requiere pasar por otro proceso: la desorción o *stripping*.

Tabla 1. Concentraciones de metano disuelto reportados en efluentes anaerobios.

Concentración de metano disuelto en efluente (mg/L)	Temperatura (°C)	Referencia
18-22	24.5	(Souza, Chernicharo y Aquino, 2011)
19	25	(Heffernan, Blanc y Spanjers, 2012)
17.6 (verano) 19.8 (invierno)	26.7 Verano 12.2 invierno	(Matsuura et al., 2017)

El proceso de desorción consiste en eliminar el gas metano disuelto en el efluente por medio del arrastre con un gas inerte; este proceso pasa por una columna empacada (Figura 5) con material que favorece el contacto entre la fase líquida y gaseosa, como pueden ser los anillos tipo Pall (Figura 6).

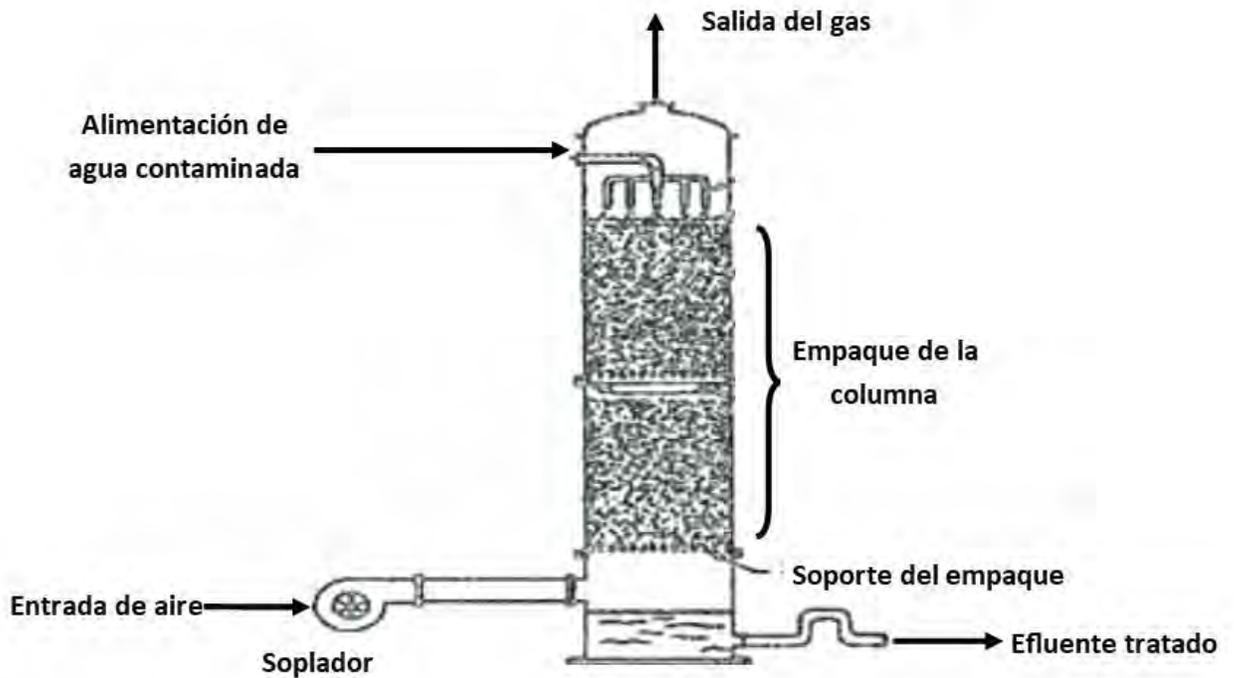


Figura 5. Esquema de la desorción con aire. Tomado de Huete Chevez (2017)



Figura 6. Anillos tipo Pall utilizados como material de empaque para la separación. Tomado de Huete Chevez (2017).

Esta fracción, además de representar la pérdida de una posible fuente de energía, contribuye al inventario de gases de efecto invernadero en la atmósfera y al calentamiento global. Por lo anterior, las PTAR municipales que utilizan reactores anaerobios no se pueden considerar como productoras de una fuente alternativa de energía, salvo cuando se tratan grandes caudales.

2.1.2 Tratamiento de emisiones gaseosas y control de olores en PTAR.

Existen diversas tecnologías que se han aplicado para el control de contaminantes del aire como la adsorción, incineración, oxidación catalítica, absorción, condensación, membranas y las biotecnologías. Las biotecnologías se han considerado de bajo costo de inversión y operación y poco mantenimiento respecto a otro tipo de tecnologías (Delhoménie y Heitz, 2005).

Dentro de los procesos de biotecnología para el tratamiento de emisiones gaseosas con contaminantes se encuentran los biolavadores, los biofiltros percoladores y los biofiltros, los cuales pueden tratar compuestos orgánicos volátiles (como metanol, aldehídos y algunos compuestos aromáticos) y compuestos inorgánicos (como sulfuro de hidrógeno y amoníaco).

Con el transcurso del tiempo, estos biorreactores fueron ampliando su campo de acción con hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular como el metano y pentano los cuales eran difíciles de degradar por su baja solubilidad en agua (Shareefdeen y Singh, 2005).

Las principales ventajas de los procesos biológicos en tratamiento de gases son: 1) se pueden realizar a temperaturas entre 10 y 40°C y a presión atmosférica; 2) son procesos de bajo costo, simples para operar y amigables con el ambiente. Para su selección se necesita tomar en cuenta la tasa de flujo del gas y la concentración del contaminante. Se sabe que para poder utilizar sistemas biológicos, se recomienda un flujo de aire de ~1 000 a 100 000 m³/h y concentración de contaminante de ~0.1 a 7 g/m³ (Shareefdeen y Singh, 2005).

Otros factores importantes, que es importante tomar en cuenta en este tipo de procesos, son: la temperatura, el contenido de oxígeno del gas residual, composición de la corriente, solubilidad, programa de operación, servicios; también se deben evaluar los costos de inversión y mantenimiento y los posibles impactos ambientales secundarios.

2.1.2.1 Biolavadores

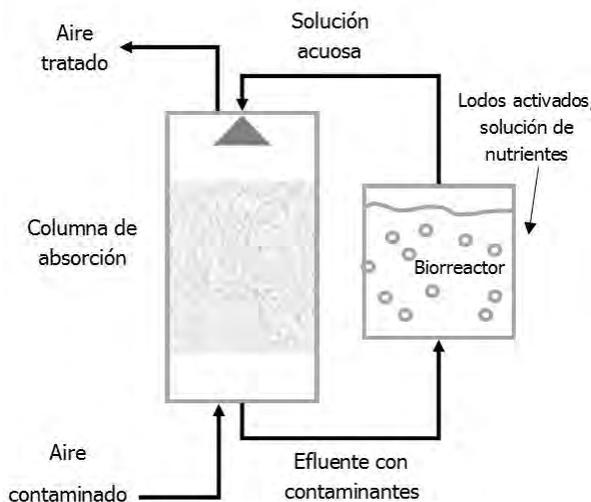


Figura 7. Biolavador. Tomado de Gómez-Borraz (2017).

En el sistema de los biolavadores, los contaminantes en la fase gaseosa son removidos por absorción en una corriente de agua que es recirculada en una torre de lavado (Figura 7). Después, esta corriente con contaminantes disueltos es tratada por microorganismos en un biorreactor con flujo de aire y regresa a la torre de lavado. Los parámetros que es de importancia controlar son: los nutrientes y pH por la alta actividad microbiana (Shareefdeen y Singh, 2005).

2.1.2.2 Biofiltros percoladores

En estos sistemas el aire contaminado pasa a través de una columna empacada donde la fase líquida es continuamente recirculada a través del empaque en flujo descendente; se solubiliza el contaminante en la corriente líquida y es transferido a la película de microorganismos que está adherida a la superficie de estos soportes (Figura 8). La fase líquida provee humedad, nutrientes, control de pH en la biopelícula y permite la separación de productos inhibitorios.

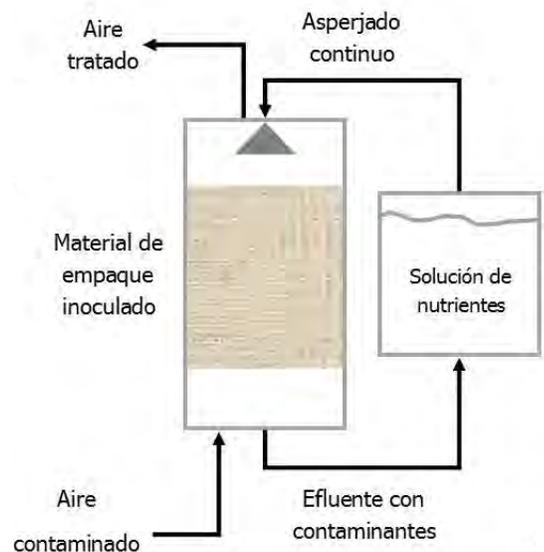


Figura 8. Biofiltro percolador. Tomado de Gómez-Borraz (2017).

2.1.2.3 Biofiltros

La mezcla de gases a tratar es pasada por el lecho de material biológicamente activo, que, asegurando un contenido de humedad mínimo, llevará a cabo las reacciones de interés. (Figura 9); la biopelícula depende de la densidad microbiana y de las condiciones del medio (temperatura, disponibilidad de nutrientes, humedad y pH).



Figura 9. Biofiltro. Tomado de Gómez-Borraz (2017).

Las diferencias entre los biofiltros y los biofiltros percoladores son: 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, mientras que en los biofiltros es de material orgánico (Delhoménie y Heitz, 2005).

El biogás con concentraciones bajas de metano producido en las PTAR pequeñas puede ser controlado por medio de la combustión o de la oxidación biológica. La eliminación del biogás por medio de la combustión se da sin recuperación de energía y con medidas de precaución para evitar una explosión no controlada. Este proceso es factible si existen flujos de biogás mayores a 10-15 m³/h y la concentración de metano está por encima del 20% v/v (Nikiema, Brzezinski y Heitz, 2007).

La biofiltración puede ser una alternativa para la eliminación de biogás que se encuentre en volúmenes pequeños y con concentración de metano menor al 20% v/v, circunstancias que existen en PTAR pequeñas. De esta forma, la biofiltración puede ser utilizada para evitar la

liberación del biogás colectado en PTAR pequeñas al ambiente; así como eliminar el metano disuelto en el efluente del reactor anaerobio previamente desorbido del agua. Como se ha mencionado, de no tratarse estas emisiones gaseosas, se pueden generar malos olores (debido al sulfuro de hidrógeno que también se encuentra disuelto en el efluente tratado) y se contribuye al aumento de concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera (Nikiema, Brzezinski y Heitz, 2007).

2.2 Biofiltración

La biofiltración de corrientes gaseosas consiste en el paso del gas a través de un material poroso empacado (Figura 10), donde los contaminantes son consumidos por la población microbiana transformándose en productos oxidados del metabolismo, como CO_2 y agua (Leson y Winer, 1991; Noyola, Morgan y Guereca, 2013). El gas por tratar ingresa por la parte inferior del biofiltro, pasa por el material de empaque y el aire tratado es emitido por la parte superior.

El material de empaque del medio biológico filtrante es una mezcla de materiales naturales con porosidad grande, tal como composta, tierra orgánica o turba; el medio biológico se mezcla con material que aumente el volumen y la porosidad de la mezcla. El medio debe proporcionar la superficie, humedad y nutrientes necesarios para que en ella se pueda desarrollar una biopelícula de microorganismos degradadores de los contaminantes.

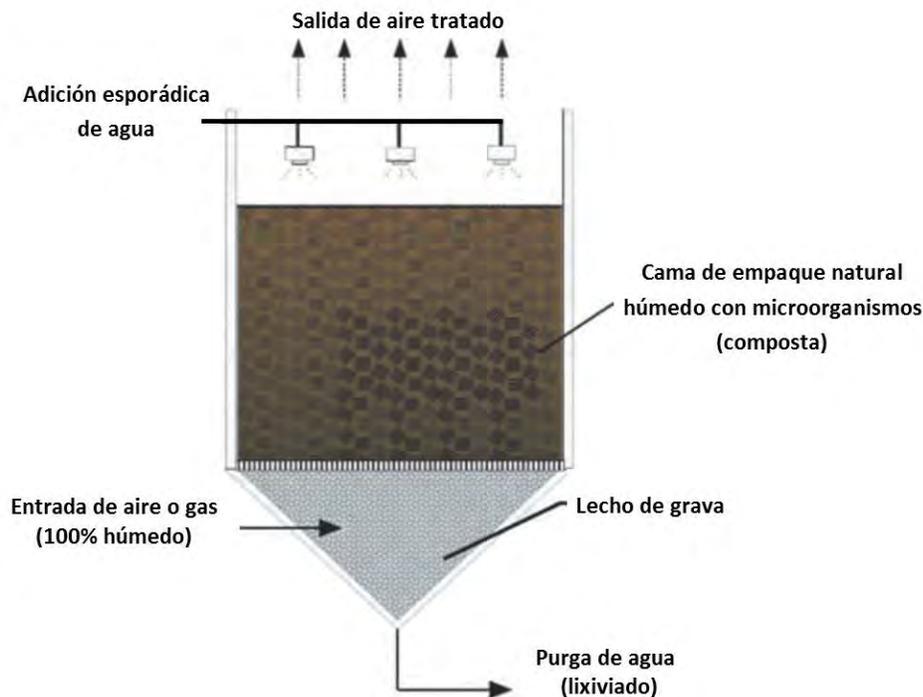


Figura 10. Esquema de un biofiltro. Tomado de Noyola et al. (2013).

El proceso de biofiltración está recomendado cuando existan concentraciones de contaminantes menores a 1 mg/L y con coeficientes de Henry menores a 10, que es un coeficiente de reparto entre aire y agua (van Groenestijn y Hesselink, 1993). Dentro de las ventajas del biofiltro, se encuentra la existencia de una gran superficie de contacto gas-líquido y bajos costos de operación e inversión. Sin embargo, las desventajas son el poco control sobre

los fenómenos de reacción y la limitada respuesta ante variaciones del flujo de gas (Noyola, Morgan y Guereca, 2013; Sanchez Rodriguez, 2015).

En una PTAR municipal con tratamiento secundario mediante un reactor anaerobio, se produce biogás con concentración aproximada al 75% de metano, el cual es colectado y evacuado del reactor hacia un quemador. Por su parte, el efluente tratado transporta metano disuelto hacia afuera del reactor, exponiéndolo a condiciones atmosféricas. Ese metano debe ser capturado antes de que se desorba hacia la atmósfera, como resultado de la turbulencia en su conducción o de aeración en la unidad de postratamiento. Un esquema adecuado para esto es recurrir a su desorción controlada en una torre empacada, donde se separa el gas metano de la corriente acuosa con ayuda de una corriente de aire. La corriente de aire que sale de la columna contendrá el metano desorbido así como sulfuro de hidrógeno; esta corriente se dirige hacia el sistema de biofiltración donde el metano es oxidado a CO_2 y el sulfuro de hidrógeno a SO_4^{2-} o azufre elemental.

En la figura 11 se puede observar el diseño propuesto en los trabajos de investigación en el Instituto de Ingeniería de la UNAM para tratar las emisiones gaseosas producto del reactor anaerobio tanto el que es recolectado (línea morada) como el que se disuelve en el agua ya tratada (línea azul oscuro).

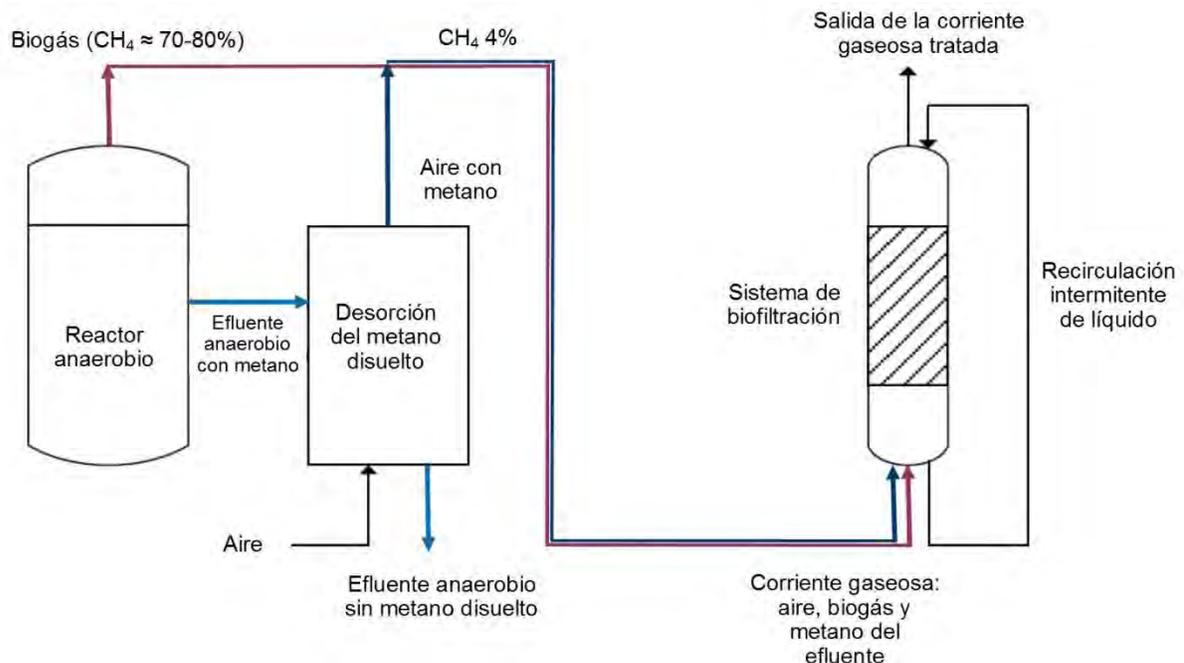


Figura 11. Sistema de biofiltración propuesto para tratar las corrientes de metano provenientes de un sistema de tratamiento anaerobio. Tomado de Sanchez Rodriguez (2015).

En la Figura 12, se puede observar un sistema de una planta piloto del acoplamiento del tratamiento anaerobio (el reactor UASB) y el tratamiento aerobio de la emisión gaseosa producto del reactor (el biofiltro) empleado en un trabajo previo (Huete et al., 2017).



Figura 12. Sistema piloto para la desorción y eliminación biológica de metano y sulfuro de hidrógeno disueltos en el efluente (agua tratada saliente) del reactor UASB. Tomado de Huete Chevez (2017).

Para realizar la biofiltración, es relevante conocer los contaminantes principales a tratar (metano y sulfuro de hidrógeno), la dinámica presente en los microorganismos encargados de la degradación, el material de empaque a utilizar y los recursos con los que cuentan las PTAR. Al respecto, han obtenidos buenos resultados con composta como medio de empaque (Gómez-Borraz et al., 2017).

Los parámetros de rendimiento que es importante estudiar en la biofiltración son (Sanchez Rodriguez, 2015):

- a) Tiempo de retención de lecho vacío (TRLV), es el tiempo de residencia del gas considerando el volumen del biofiltro sin empaque (expresado en minutos).
- b) Flujo del gas, es el volumen de gas introducido por unidad de tiempo (L/min).
- c) Concentración inicial de metano (ppm_v).

d) Capacidad de eliminación (CE), es la masa de contaminante degradada por unidad de volumen de medio filtrante por unidad de tiempo; (se expresa con las unidades $\text{g m}^{-3} \text{d}^{-1}$).

En la siguiente figura se muestra una gráfica donde se ha visto el incremento de las publicaciones arbitradas relacionadas con la biofiltración en general, observándose un incremento en el 2005 y 2012. Esta búsqueda se realizó en la base de datos Scopus.

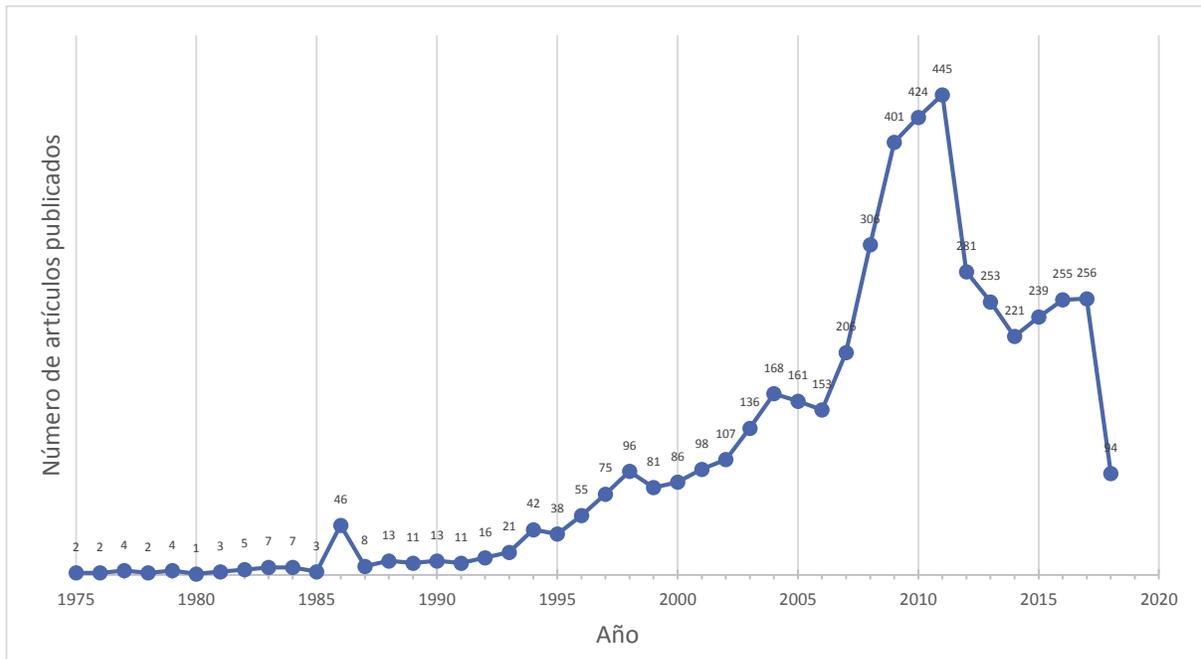


Figura 13. Número de artículos de investigación publicados sobre el tema biofiltración. Búsqueda realizada en la plataforma Scopus el 31 de mayo de 2018.

2.2.1 Biofiltración de metano

Dentro de las biotecnologías reportadas para la eliminación de metano se encuentran el uso de biofiltros y biofiltros de lecho escurrido, descartando el uso de los biolavadores por la baja solubilidad en agua del metano.

Las primeras investigaciones sobre la biofiltración de metano fueron los trabajos de Apel W. A. en 1991 y Sli Ly en 1993. W. A. Apel y colaboradores utilizaron el potencial de la bacteria metanotrófica *Methylomonas metanica* para eliminar el metano de la atmósfera de una mina de carbón en un biorreactor fase gas a escala laboratorio. El experimento consistió en una columna de vidrio empacada con bio-anillos donde se inoculó con la bacteria y se mantuvo su crecimiento. Se mezcló metano con aire en relaciones que variaban de 0 a 50.9% y se recirculó cada mezcla a través del biorreactor a una velocidad de 200 ml min^{-1} . El resultado obtenido con una mezcla

de 35% de metano/aire, fue la eliminación de metano en 90.4% en 24 horas. Esto equivale a una velocidad de eliminación de ~38 mg de metano por hora. Usando una mezcla de metano/aire al 12%, la tasa de eliminación fue ~23 mg de metano por hora. A partir de estos resultados, se concluyó que las bacterias metanotróficas cultivadas en biorreactores en fase gaseosa son capaces de eliminar cantidades significativas de metano de mezclas de metano/aire y pueden ser de uso práctico para eliminar el metano de las atmósferas de las minas de carbón (Apel, Dugan y Wiebe, 1991).

En 1993 se publicó el primer trabajo donde se usó el término biofiltro; el empaque en el biofiltro consistió en tubos de vidrio, de aproximadamente 10 mm por 8 mm de diámetro a una altura de 560 mm, inoculados con bacterias metanótrofas procedentes de una mina de carbón. En el intervalo de 0.25-1.00% de metano en aire, más del 70% de metano fue removido con un tiempo de residencia de 15 minutos y con un 90% de reducción, a 20 minutos (Sly et al., 1993).

Para fines de este trabajo se exponen en la Tabla 2 algunos parámetros de rendimiento obtenidos en biofiltros con empaques de composta y con ciertas variaciones.

Tabla 2. Ejemplos de sistemas de tratamiento para corrientes gaseosas con metano. Adaptado de Gómez-Borraz *et al.*, (2017)

Empaque	TRLV	Flujo	Concentración inicial (% v/v)	Eficiencia de remoción (eliminación)	Autores
Corteza de pino compostada	20-400 min	variable	0.1-2.5	ER>70% Para TRLVs>30 min	(Du Plessis et al., 2003)
Composta a partir de residuos municipales	100 min	0.02 L/min	9-10	100%	(Pawłowska, Rozej y Stepniewski, 2011)
Suelo de un relleno sanitario	> 2 h	variable	Variable	Mayor a 90%	(Pratt et al., 2012)
Composta	18 min	0.06 L/min	4	80-100	(Sanchez Rodriguez, 2015)
Trozos de madera, perlita y composta	4.4 min	1.34 L/min	0.01-2.40	76.5%	(Barcón et al., 2015)
Composta combinada con materiales inorgánicos (esponja de poliuretano, vermiculita o Biobob)	20-43 min	variable	0.17-3.60	Mayor a 90%	(Brandt et al., 2016)
Composta	40 min	0.1 L/min	~2	12-39.8%	(Lebrero et al., 2016)
Composta	23 min	15 L/min	2.7-4.3	75%	(Huete et al., 2017)

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.

2.2.2 Biofiltración de sulfuro de hidrógeno

Dentro de las biotecnologías más adecuadas para el tratamiento de H_2S se encuentran los biofiltros de lecho escurrido y biolavadores, esto es por la alta solubilidad en agua del H_2S . Para pequeños caudales, el biofiltro simple puede ser el más adecuado.

Desde 1923, existen datos en publicaciones arbitradas donde H. Bach discutió los conceptos básicos para el control de misiones de H_2S de plantas de tratamiento de agua residual; se comenzó aplicar este tipo de tratamiento en países como Alemania, Estados Unidos y los Países Bajos (Leson y Winer, 1991). En 1994, se presentaban los primeros trabajos de biofiltración con composta obteniéndose resultados de eliminación de H_2S mayores al 99%, siendo una excelente alternativa porque no requiere otra fuente de energía más que el metabolismo de los microorganismos (Yang y Allen, 1994; Delhoménie y Heitz, 2005).

En la tabla 3 se presentan algunos resultados de la aplicación de este tipo de biofiltración para el control de emisiones de sulfuro de hidrógeno.

Tabla 3. Ejemplos de biofiltración de H₂S.

Empaque	TRLV	Flujo (L/h)	Concentración inicial (ppmv)	Eficiencia de Remoción (eliminación)	Referencia
Células de <i>Thiobacillus thioeparus</i> CH11 inmovilizadas en alginato de calcio	28 s	36	5, 20, 60	97.5-98.0%	(Chung, Huang y Tseng, 1996)
Composta	50 s	600	100	~100%	(Morgan-Sagastume y Noyola, 2006)
Fibra de coco	313 s	26.7-6.7	2300-11567	94.7 %	(Chaiprapat et al., 2011)
Turba	60 s	82.5-423	131-854	89-99%	(Omri et al., 2013)
Agregados de arcilla expandida (bio-carrier)	14.6 min	3000-7800	1.2-8.5	7.7-100%	(Su et al., 2013)
Estrato de corteza de pino cubierto por estrato de madera compostada	63 s	4000	133-250	~100%	(Jaber et al., 2014)
Composta con paja y virutas de madera	33.9 s 45.2 s 56.5 s	600	50-100	88.60 93.58 96.78	(Hou et al., 2016)

Alginato de calcio: (C₆H₇Ca_{1/2}O₆)_n. Turba: Masa esponjosa vegetal que puede ser usada para combustible o abono. TRLV: Tiempo de retención de lecho vacío.

Como se puede observar, la biofiltración de H₂S se lleva a cabo con muy buenas eficiencias de remoción, además que ya se ha realizado una investigación extensa sobre este tema.

2.3 Metano

El metano es un gas orgánico compuesto de un átomo de carbono y cuatro átomos de hidrógeno. Es una molécula no polar, incolora y soluble en líquidos orgánicos. A temperatura ambiente, es un gas inflamable, no tóxico, incoloro, sin olor característico y más ligero que el aire (SIGMA-ALDRICH, 2016).

La principal fuente de obtención del metano es el gas natural, del cual forma el 97% de la composición de este combustible; de igual forma, se obtiene del producto final de la degradación anaerobia en PTAR. Otras fuentes de emisión son el ganado (rumiantes), actividades agrícolas como la siembra de arroz y la degradación de residuos sólidos orgánicos en vertederos municipales (EPA, 2012).

El metano es un compuesto orgánico estable en ambientes anóxicos y si no existe una previa oxidación por organismos metanótrofos, escapa hacia la atmósfera. En la Figura 14, se puede observar la distribución del metano en la superficie terrestre desde los niveles bajo tierra hasta llegar a la estratósfera.

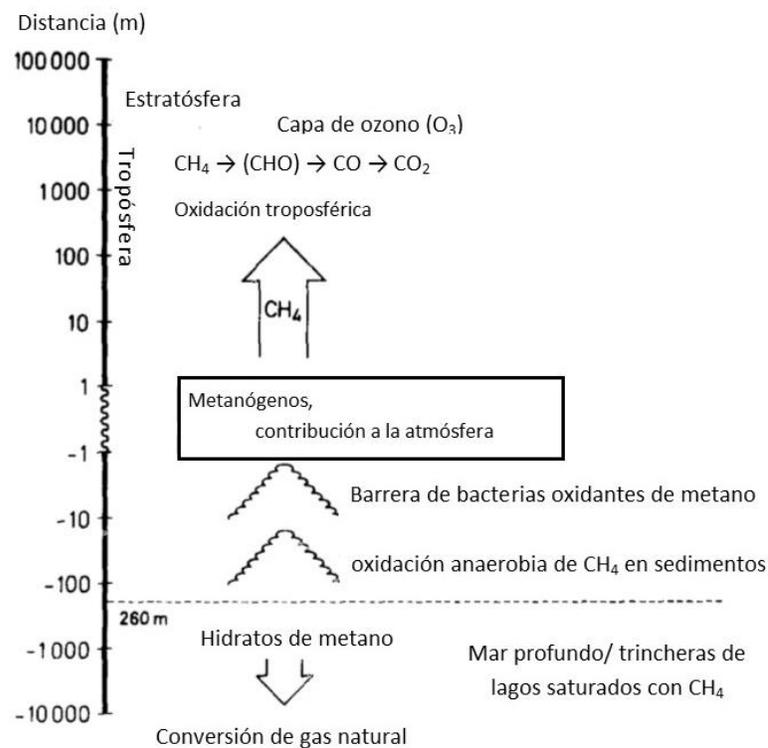


Figura 14. Movimiento del metano producido por metanógenos en diversas zonas de la superficie terrestre. Tomado de Vogels (1979).

2.3.1 Metano como gas de efecto invernadero

En la capa atmosférica se encuentra el gas metano (alrededor de 1 800 ppb) en conjunto con otros gases de efecto invernadero (CO_2 y N_2O como los más relevantes); en conjunto con otros factores, estos gases determinan la temperatura de la capa de aire en la cual existe la vida terrestre, determinado por el flujo entrante y saliente de radiación solar que son regulados por medio de la atmósfera.

Las moléculas del metano tienen una opacidad hacia radiación infrarroja mucho mas efectiva que las moléculas del dióxido de carbono. El CO_2 es considerado como el gas referente para las contribuciones de los diversos gases de efecto invernadero, con un potencial de calentamiento global de 1, y para el metano, es 34. Dentro de los límites de modelos altamente idealizados, existe evidencia que el aumento de las emisiones de CO_2 y CH_4 lleva a incrementar la temperatura del planeta (Juliarena, 2013).

Las emisiones del gas metano han aumentado desde la década de los setenta, llegando a una meseta entre los años 1999-2006; sin embargo, en el año 2007 la concentración ha aumentado a valores entre 1700 y 1850 ppb (Ciais et al., 2013).

2.4 Oxidación biológica del metano. Microorganismos metanótrofos

Existen microorganismos que utilizan compuestos orgánicos que carecen de enlaces C-C como donadores de electrones y fuente de carbono para su crecimiento. Estos se pueden clasificar de acuerdo con el medio en el que crecen y el sustrato que metabolizan: los metilótrofos crecen en metano, en metil-aminas, o en metanol (Hou, 1984). Los metilótrofos pueden ser del dominio *Archea* o *Bacteria*, de los cuales los filos correspondientes pueden ser del *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Verrucomicrobia* para *Bacteria* y *Eucaryarchaeota* para *Archea* (Madigan et al., 2015).

Dentro de la clasificación de los microorganismos metilótrofos existe una subdivisión donde se definen los organismos metanótrofos, que exclusivamente oxidan al metano por medio de la enzima metano monooxigenasa (MMO) la cual puede ser soluble o particulada (Figura 15). La oxidación de metano requiere la ruptura de un enlace con alta estabilidad termodinámica ($\Delta H = -435 \text{ kJ mol}^{-1}$) termodinámicamente estable y puede ocurrir tanto en ambientes anaerobios (teniendo como aceptor de electrones el ion nitrato (NO_3^-) o en ambientes aerobios.

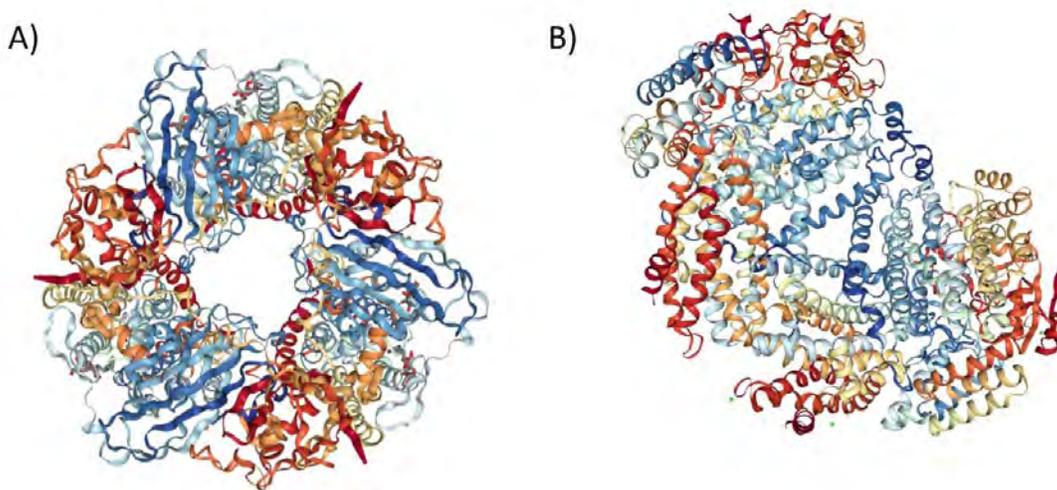


Figura 15. Ejemplos de estructuras cristalinas de la enzima metano monooxigenasa. A) Estructura de la pMMO de *Methyломicrobium alcaliphilum* 20Z. Tomado de Ro et al., (2018). B) Estructura de la componente hidroxilasa de sMMO de *Methylococcus capsulatus* (Bath) Tomado de Whittington y Lippard, (2001).

Por lo regular, los metanótrofos aerobios se encuentran en el suelo y en ambientes acuáticos; mientras que los metanótrofos anaerobios se encuentran en sedimentos marinos y en suelos, asociados con las raíces de plantas y en la superficie de las hojas y en la interfase óxica de muchos ambientes anóxicos como lagos, sedimentos y humedales (Madigan et al., 2015).

Estos microorganismos también habitan en lugares como campos de arroz, humedales y pantanos, donde existe producción de metano (Bodelier et al., 2011).

Se han planteado elementos básicos en la taxonomía de los metanótrofos asociados con sus características que incluyen: organización de la membrana intracitoplasmática, contenido de sustancia proteica específica de su DNA, vía de consumo de carbono (Figura 15) y la morfología microbiana.

Tomando como referencia la subdivisión de microorganismos aislados en 1970, contribución de R. Whittenburg y sus colaboradores, se clasifican en (Majdinasab y Yuan, 2017):

Grupo I

- Tipo I; microorganismos que procesan el aldehído por la vía de Ribulosa Monofosfato (RuMP; Figura 17) y presentan en sus membranas celulares arreglos cocoides. Se sabe que éstos pertenecen a la clase γ -Proteobacteria (Tabla 4). En la membrana citoplasmática tienen ácidos grasos de 14 a 16 átomos de carbono.
- Tipo X; poseen bajos niveles de enzimas de la vía de la Serina teniendo como base la ruta RuMP (Hanson, Hanson y Hanson, 1996; Madigan *et al.*, 2015).

Grupo II

- Tipo II; microorganismos que siguen la ruta de Serina (Figura 18) y estos organismos tienen arreglos membranales del tipo vibrio. Además, pertenecen a la clase α -proteobacteria (Tabla 4). En la membrana citoplasmática tienen ácidos grasos de 18 átomos de carbono.
- Tipo III: el género *Methylocapsa* (Tabla 4) se caracteriza por tener una estructura de la membrana intracitoplasmática empaquetada en paralelo solo de un lado de la membrana celular. No expresa MMO soluble. También, en la membrana citoplasmática presentan ácidos grasos de 18 átomos de carbono (Dedysh et al., 2002).

Grupo III o Tipo IV

- Este grupo incluye a los Verrucomicrobia (Kalyuzhnaya, Puri y Lidstrom, 2015). Son metanótrofos termoacidófilicos (que se desarrollan en ambientes con pH cercanos a 1 y temperaturas superiores a 65°C); carecen de membranas intracitoplasmáticas (Op den Camp et al., 2009).

El proceso de oxidación del metano comienza con la conversión del metano a metanol por medio de la enzima metano monooxigenasa (MMO). De esta enzima existen dos tipos que son: la particulada o asociada a la membrana citoplasmática (pMMO) y la soluble (sMMO).

La enzima sMMO se presenta en el citoplasma, expresada en condiciones limitadas de cobre y tiene un sitio activo Fe-Fe que consta de tres componentes: una hidroxilasa, que es un dímero de tres subunidades ($\alpha\beta\gamma$); una proteína reguladora (proteína B); y una reductasa (proteína C) (Bedard y Knowles, 1989; Lee, 2016; Ross y Rosenzweig, 2016).

La enzima pMMO se encuentra en la membrana de la célula en condiciones suficientes de cobre y tiene un centro catalítico de cobre. La enzima pMMO ha sido reportada en todos los metanótrofos excepto en el género *Methylocella*, mientras que la sMMO se expresa en la mayoría de metanótrofos.

En la Figura 16 se presenta el proceso general de oxidación del metano y sus derivados hasta llegar a CO_2 . La primera reacción de conversión de metano a metanol puede ser catalizado por cualquiera de las dos enzimas MMO. Si es por la enzima pMMO, utiliza como agente reductor el citocromo C reducido y como agente oxidante, al oxígeno pasando a obtenerse el citocromo c oxidado y agua, respectivamente. Por otro lado, para la enzima sMMO se utiliza como agente reductor la nicotimamida adenina dinucleótico reducida (NADH) que pasa a su forma oxidada (NAD^+) y utilizando una molécula de oxígeno para obtener una molécula de agua.

Posteriormente, la conversión de metanol a formaldehído es realizada por la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) con el apoyo del Citocromo C oxidado (agente oxidante).

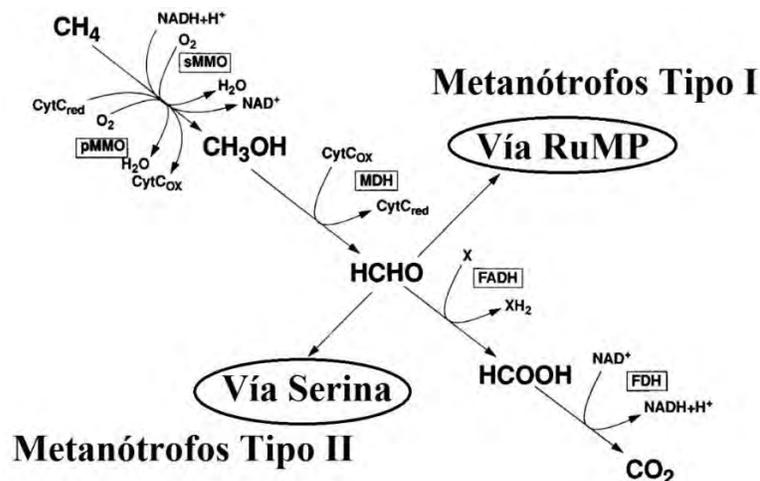


Figura 16. Vías de oxidación del metano y asimilación del formaldehído. Abreviaturas: CytC, Citocromo C; pMMO, metano monooxigenasa particulada; sMMO, metano monooxigenasa soluble; MDH: metanol deshidrogenasa; FADH, formaldehído deshidrogenasa; X/XH₂: agente oxidante/agente reductor, puede ser ubiquinona (Q); FDH, formiato deshidrogenasa. Tomado de Hanson, Hanson y Hanson (1996)

El formaldehído se cataboliza mediante una de tres posibles vías, una es la oxidación del formaldehído a iones formiato; y dos llevan a la asimilación del formaldehído como material celular en los metanótrofos.

La oxidación del formaldehído a formiato es mediada por la enzima formaldehido deshidrogenasa (FADH), con apoyo de un agente oxidante, como la ubiquinona. La asimilación del formaldehído en el material celular es una de las características que se han utilizado para diferenciar los tipos de metanótrofos; esta asimilación puede ser por vía de la Ribulosa monofosfato, para microorganismos Tipo I (Figura 17); o, por la vía de la serina, para microorganismos Tipo II (Figura 18).

Por último, la conversión del ion formiato a dióxido de carbono es mediada por la enzima formiato deshidrogenasa, utilizando como agente oxidante NAD^+ .

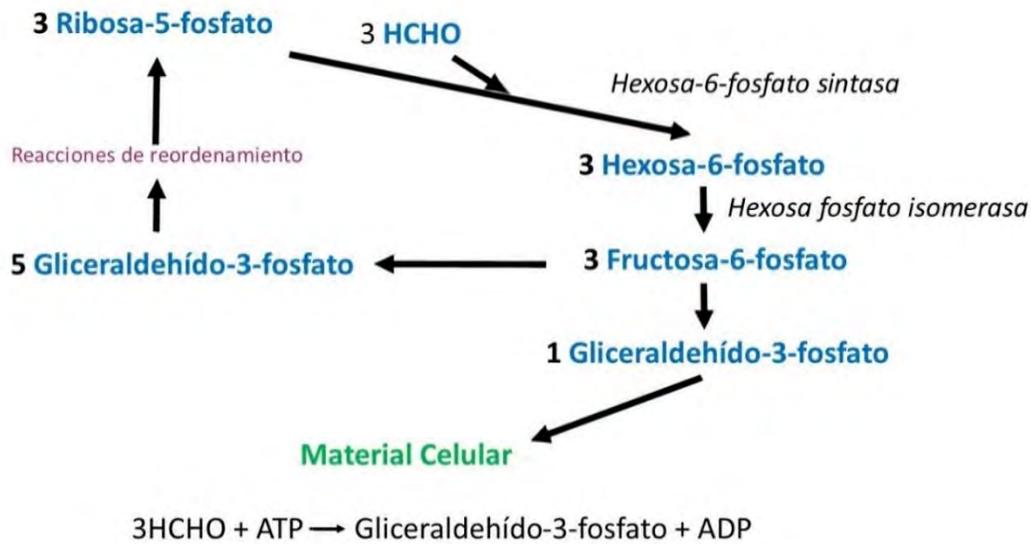


Figura 17. Vía RuMP para la fijación de formaldehído. Tomado de Hanson, Hanson y Hanson (1996)

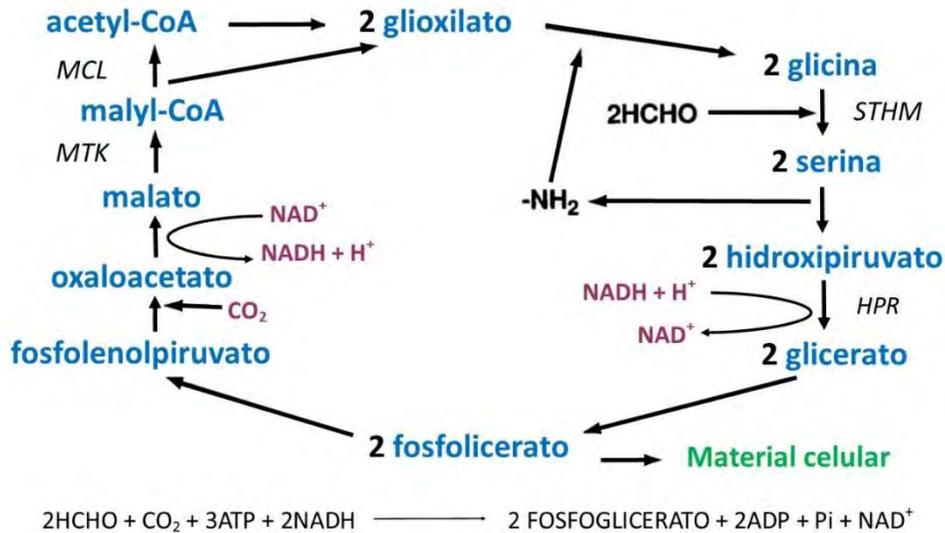


Figura 18. Vía de la serina para fijación de formaldehído. Únicas reacciones catalizadas por hidroximetil serina transferasa (STHM), hidroxipiruvato reductasa (HPR), malato tioquinasa (MTK) y malil coenzima A liasa (MCL) son identificadas. Tomado de Hanson, Hanson y Hanson (1996)

En la tabla 4 se puede observar la clasificación taxonómica general de los metanótrofos (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de los microorganismos metanótrofos. Vía RuMP: Vía de la ribulosa monofosfato, Ciclo CBB: Ciclo de fijación de dióxido de carbono (Commons, 2013; Karthikeyan et al., 2016)

Filo	Proteobacteria		Verrucomicrobia
Clase	<i>Gamma-proteobacteria</i>	<i>Alfa-proteobacteria</i>	
Familia	<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocystaceae</i>	<i>Beijerinckaceae</i>
Género	<i>Methylobacter</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylocaldum</i> <i>Methylohalobius</i> <i>Methylomicrobium</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylosoma</i> <i>Methylosphaera</i> <i>Methylosarcina</i> <i>Methylotherrmus</i> <i>Clonothrix</i> <i>Crenothrix</i>	<i>Methylocystis</i> <i>Methylosinus</i>	<i>Methylocapsa</i> <i>Methylocella</i>
Grupo y vía de degradación de CH ₄	Grupo I Vía RuMP	Grupo II Ciclo de la serina	
			Grupo III Ciclo CBB

2.4.1 Factores principales involucrados en la oxidación biológica del metano

Concentración de CH₄

En la tabla 5, se muestran valores de velocidad y constante de reacción de la oxidación de metano en diferentes tipos de suelos, observándose mayores valores de rapidez de la reacción en suelo con arena. Además, se ha establecido que los metanótrofos del Tipo I soportan mejor los cambios de concentración de metano, mientras que para los metanótrofos del Tipo II su crecimiento se favorece en altas concentraciones de metano (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

Tabla 5. Valores cinéticos de la oxidación biológica de metano en diferentes materiales de suelo en función de la capacidad de la enzima MMO. tabla adaptada de Majdinasab y Yuan (2017).

Contenido de material del suelo	V _{max} (cm ³ kg ⁻¹ s ⁻¹)	K _M (Vol. %)	Concentración de CH ₄ (Vol. %)	Referencia
Loam para relleno sanitario	(4.8-6.2) x 10 ⁻³	0.75	<10	(Stein & Hettiaratchi, 2001)
Tierra de relleno sanitario	(0.88-1.09) x 10 ⁻³	0.18-0.70	1.7x10 ⁻⁴ -1.0	(Whalen & Reeburgh, 1990)
Grava y arena (columna de ensayo)	(0.11-0.86) x10 ⁻³	0.6-2.9	1-16	(Małgorzata & Witold, 2006)
Suelo de arena gruesa de cubierta de relleno sanitario	(6.20±0.36) x10 ⁻³	0.60-2.41	0.05-5.00	(Kightley, et al., 1995)

Loam: roca sedimentaria con proporción equilibrada de partículas de arena, limo y arcilla. Km: Valor de constante de Michaelis-Menten; Vmax: Velocidad máxima.

Textura del suelo

La textura del suelo afecta la penetración de O₂ y el transporte de CH₄ dentro de sus capas; en consecuencia, regula la oxidación y las emisiones de CH₄ en los vertederos, por lo que es importante favorecer la porosidad en el medio donde se encuentren los microorganismos (Gebert y Groengroeft, 2009; Reddy *et al.*, 2014). Kightley y colaboradores (1995) trabajaron con diferentes texturas de suelo de un mismo relleno sanitario, utilizando concentraciones de 40 nmol/mL de CH₄. En la Tabla 6, se puede observar las tasas de variación de la oxidación obtenidas de este compuesto (Kightley, Nedwell y Cooper, 1995).

Tabla 6. Tasas de oxidación de CH₄ en estado estacionario medidas en núcleos de tierra de cubierta de relleno sanitario y en núcleos de arena gruesa después de la aplicación de CH₄ durante 6 meses. Tomado de Kightley, Nedwell y Cooper (1995).

Tipo de suelo	Tasa de oxidación de CH ₄ (mol*m ⁻² *día ⁻¹)	% de Oxidación
Arena gruesa	10.4±0.1	61
Suelo superficial de arcilla	6.8±0.3	40
Arena fina	6.3±0.3	41

Humedad

En general, se ha determinado un intervalo óptimo de humedad de 15 a 32% para el crecimiento de estos microorganismos (Boeckx, Van Cleemput y Villaralvo, 1996). La capacidad de oxidación del metano aumenta, debido a que la función de la humedad con una adecuada adición de nutrientes, ayuda a su continua distribución, incluyendo el metano que debe transferirse a la fase líquida.

Por otra parte, un exceso de humedad impediría el flujo del gas metano y del oxígeno, lo que limitaría la reacción. En las cubiertas de rellenos sanitarios se ha estudiado la variación de la oxidación del metano al variar el contenido de humedad y se ha observado una importante variación entre cada tipo de ambiente en el que se encuentran los microorganismos, por lo que es conveniente encontrar el intervalo de contenido de humedad óptimo para cada suelo específico (Majdinasab y Yuan, 2017).

Temperatura y pH

El intervalo óptimo de temperatura para la oxidación de CH₄, en pH igual a 7.3, está entre 15°C a 35°C, en sistemas de biocubierta de vertederos (Boeckx, Van Cleemput y Villaralvo, 1996). Otros investigadores reportan una temperatura de cultivo desde 20°C a 45°C a pH neutro, así como valores entre 25°C y 30°C como intervalo de temperatura de actividad óptima en biofiltros de escala laboratorio (Gómez-Borraz, 2017).

También, existe el reporte de aislamiento de metanótrofos en ambientes con temperaturas entre a 50°C y 75°C y temperaturas menores a 10°C. Además, se han reportado metanótrofos que pueden crecer en ambientes de pH desde 4.2 hasta 9 (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 del consumo de metano 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. Existe una menor estabilidad de crecimiento por parte de los microorganismos metanótrofos en ambientes con valores de pH menores a 5 (Majdinasab y Yuan, 2017).

Nutrientes

La adición de nutrientes necesarios para el crecimiento de metanótrofos es muy importante, con el objetivo de proporcionar los elementos necesarios para el metabolismo de estos microorganismos. La tabla 7 presenta el impacto de la adición de nutrientes y micronutrientes sobre la actividad metanótrofa (Albanna, Fernandes y Warith, 2007).

Tabla 7. Efectos de diferentes nutrientes en los microorganismos metanótrofos.

Nutrientes	Efecto sobre metanótrofos	Referencia
<p>NO₃⁻ (nitrato) + PO₄³⁻ (fosfatos) (nitrato 600-700 mg/Kg peso en seco)</p>	<p>Incremento en la densidad de población de 3-5 órdenes de magnitud. Dependencia mayor de NO₃⁻ que de PO₄³⁻ en materiales de cubierta (T=12°C)</p>	<p>(Piffner <i>et al.</i>, 1997; Maanoja y Rintala, 2015)</p>
<p>N-NH₄⁺ (iones amonio) (15mg/1kg de suelo)</p>	<p>Aumenta ~50% el potencial de oxidación, con humedad del 5%</p>	<p>(Lee <i>et al.</i>, 2009)</p>
<p>N-NH₄⁺ (25, 50 y 75 mg*kg⁻¹)</p>	<p>Actividad inhibitoria por parte de las bacterias nitrificantes al existir una posible competencia en el nicho donde habitan. Inconveniente la presencia de hidroxilamina (por toxicidad) y la producción de nitrito (NO₂⁻) los cuales es inhibitoria.</p>	<p>(Boeckx, Van Cleemput y Villaralvo, 1996; Hanson, Hanson y Hanson, 1996; He <i>et al.</i>, 2017)</p>
<p>Cu²⁺ 0.05 a 25 mM</p>	<p>Incremento del valor de Vmax (CH₄ al 1%) y Km (constante de Michaelis-Menten) en un promedio de 2.8 veces.</p>	<p>(Cantera <i>et al.</i>, 2016)</p>
<p>Metales traza (Cu²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Mo⁶⁺)</p>	<p>Mejora el máximo potencial de oxidación y mayor crecimiento en 16% en T<4°C. No hay mejora en T=12°C</p>	<p>(Maanoja y Rintala, 2015)</p>

Como se mencionó antes, es importante la relación entre el porcentaje de humedad y la presencia de nutrientes para que sean transportados hacia el nicho microbiológico y lleguen al mayor número de microorganismos (Majdinasab y Yuan, 2017).

Existe diversa información respecto al efecto que tienen los compuestos de nitrógeno como NH₄⁺ 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 con el metano en esta vía metabólica (Hanson, Hanson y Hanson, 1996); además, 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).

En metanótrofas anaerobias, el nitrito que se encuentre en cantidades de 40 a 140 mg de N L⁻¹ (Hu et al., 2014) favorece el metabolismo anaerobio. Sin embargo, en metanótrofas aerobias, es posible observar un decremento de su actividad metabólica (Tabla 8). De acuerdo con Hoefman *et al.*, (2014) se cree que la fijación de nitrógeno es característica de los metanótrofos Tipo I y Tipo IV, por eso existe un intervalo donde no se ve afectado el metabolismo de estos microorganismos.

Tabla 8. Influencia de la presencia de nitrito (NO₂⁻) y amonio (NH₄⁺) en un inóculo de metanótrofas. Datos tomados de He et al., (2017)

[NO ₂ ⁻] mM	[NH ₄ ⁺ -N] mM	Consumo de CH ₄
1.4	10.7	No se ve afectado
3.5	21.4	Disminuye en 78%
7.1	No disponible	Cercano a cero.

Otros investigadores estudiaron específicamente cuales especies eran afectadas por la presencia de NO₂⁻ y NH₄⁺-N en concentraciones de 0.5 y 5 mM (*M. álbum*, *M. methanica*, *Methylocystis sp.* y *M. sporium*). En el caso del nitrito las especies que se vieron afectadas fueron *M. methanica* y *M. sporium*; la presencia del amonio afectó a todas las especies de metanótrofas (Nyerges y Stein, 2009).

Cualquier intento de aumentar el consumo de CH₄ *in situ* mediante la adición de nitrógeno debe considerar la composición inicial de la comunidad, la capacidad de los miembros individuales para fijar el nitrógeno suplementado y fijar una concentración límite de iones amonio (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

En relación con el cobre, una exhaustiva revisión por parte de Bedard y Knowles (1989) y Farhan y colaboradores (2017) muestra que este metal tiene una influencia en la expresión de la naturaleza de la enzima metano 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, así como la

actividad de estas enzimas (Bedard y Knowles, 1989; Farhan Ul Haque *et al.*, 2017). En ensayos enzimáticos, con concentraciones de metano al 1% v/v, el incremento en el medio de la concentración de Cu^{2+} de 0.05 a 25 mM aumentó el valor de la velocidad de biodegradación máxima específica del CH_4 en un factor de 2.3, respecto al valor de velocidad con menor cantidad de cobre (Cantera *et al.*, 2016).

En los metanótrofos se ha identificado un mecanismo de absorción de cobre por medio de un cromó-peptido llamado metanobactina (Figura 19). Existe regulación en la expresión del grupo de genes para la producción de sMMO porque se encuentra relacionado con la expresión de la metanobactina (Kenney, Sadek y Rosenzweig, 2016).

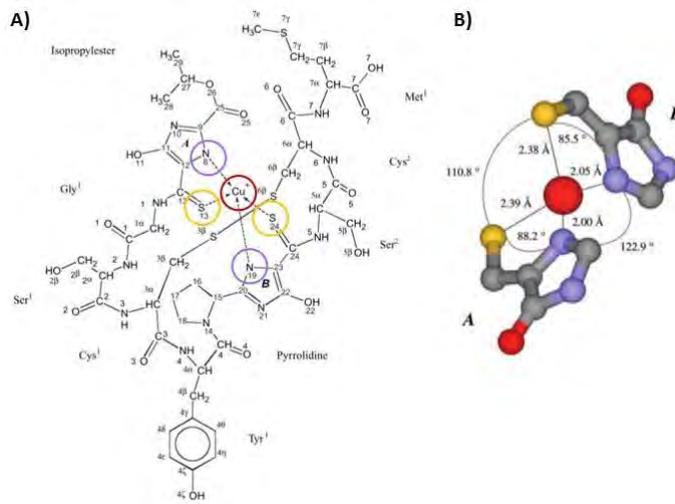


Figura 19. A) Dibujo esquemático de metanobactina junto con el esquema de numeración de átomos de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada B) Vista estereoscópica de la superficie de metanobactina modelada con el uso de la interacción disolvente-molécula (la interacción de la sonda es 1,4 Å. Tomado de Kim *et al.* (2004).

El polímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) apoya el crecimiento de los metanótrofos tipo II, porque el PHB es un sustrato que puede metabolizarse cuando existen condiciones de escasez de fuente de carbono; esto se observó al mezclar el PHB en los materiales de empaque de los biofiltros a bajas concentraciones de metano (~100 ppmv; Pieja, Sundstrom y Criddle, 2011; Ganendra *et al.*, 2014).

Flujo del O_2

De acuerdo con un estudio realizado por Hutton y ZoBell (1949), el potencial máximo de oxidación de CH_4 por medio de metanótrofos se obtuvo en concentraciones de O_2 entre 10 y 40%. Encontraron que las concentraciones de O_2 fuera de este intervalo dieron lugar a la

disminución del potencial de oxidación CH₄ (Tabla 9). Por lo tanto, es importante mantener un flujo suficiente de oxígeno en el ambiente donde habiten los metanótrofos (Hutton y ZoBell, 1949).

Tabla 9. Cantidad promedio de metano consumido por día por bacterias metanótrofas durante 6 días a 32°C en una atmósfera inicial conteniendo 20% de CH₄, 10% de CO₂ y variando las presiones parciales del oxígeno y el nitrógeno (Hutton y ZoBell, 1949).

Presión parcial O ₂ (%)	Presión parcial N ₂ (%)	Consumo por día Muestra A (mL)	Consumo por día Muestra B (mL)
0	70	0.00	0.00
10	60	1.05	0.94
20	50	0.88	0.88
30	40	1.05	1.05
40	30	-	0.94
60	10	0.35	0.52
70	0	0.23	0.29

En la Tabla 10, se observa cómo la velocidad de oxidación aumenta conforme se incrementa la presencia de O₂, indicando que se favorece el metabolismo de los metanótrofos asociado al consumo de CH₄ (Li et al., 2014).

Tabla 10. Estimaciones de velocidades de oxidación de metano de células específicas de metanótrofos ($\times 10^{-16}$ mol cel⁻¹ h⁻¹) a diferentes concentraciones de metano y oxígeno. Tomado de Li *et al.*, (2014).

O₂ (%) \ CH₄ (%)	1	2	5	10	20
5	4.66	8.75	14.2	33.1	69.9
10	5.01	9.05	15	34.2	74.3
15	5.09	9.67	18.5	36.4	-
20	5.72	10.8	18.1	38.1	76.6
35	-	-	22.5	43.3	82.4
55	-	-	-	47.9	-
75	-	-	-	-	98.7

De acuerdo con la tesis doctoral de Gómez-Borraz (2007), en valores de temperatura mayores a 30°C, se observó una menor eliminación de metano debido a la menor solubilidad del oxígeno y del metano; lo anterior se podría remediar por medio del aumento de la concentración de metano y de oxígeno lo cual se corroboró con datos experimentales de la Tabla 11 (Gómez-Borraz, 2017).

Tabla 11. Velocidades de consumo de metano en diferentes relaciones porcentuales CH₄/O₂ en ensayos de respirometría heterogénea, t=35°C. Tomado de Gómez-Borraz, (2017)

% CH₄	% O₂	Velocidad de consumo de metano (g/m³h)
4	25	58.5 ± 5.8
9	19	61.8 ± 4.9
9	25	60.3 ± 5.1

Los ejemplos anteriores son pruebas de la importancia que tiene la cantidad de oxígeno suministrada en el ambiente de los metanótrofos.

2.4.2 Ambiente artificial para los metanótrofos

Partiendo del estudio de los puntos anteriores, se busca generar ambientes artificiales para el desarrollo de microorganismos oxidantes de metano, haciendo énfasis en la adición de nutrientes, por lo que se ha buscado usar diferentes agregados (entre compuestos orgánicos y compuestos de nitrógeno), siendo el más eficiente, la adición de compuestos con el grupo formiato (Karthikeyan et al., 2016).

Se han realizado estudios sobre soportes sintéticos utilizando dióxido de silicio (SiO_2) lavado con ácido, contribuyendo a la adhesión de los microorganismos provenientes de sedimentos marinos e incrementando la oxidación del metano de 0.346 mM/día a 0.629 mM/día (Vekeman et al., 2016).

Se ha demostrado la utilidad efectiva del suelo de piedra pómez volcánica para eliminar niveles altos o bajos de metano, pero en ciertos sitios no está disponible, por lo que se ha mezclado con otro tipo de suelo como: suelo de granja-suelo de un estanque de heces de animales-, carbón de pino, composta verde de jardín, corteza de pino, logrando mejorar las tasas de eliminación de metano, en particular con suelo de granja y carbón al remover más del 80% de metano en comparación con los no inoculados con la piedra pómez volcánica (Syed et al., 2016).

Se ha utilizado el concreto poroso (con inclusión de aire) como material de empaque en biofiltros por su alta porosidad; se utilizaron discos de concreto con diámetro de 90 mm y 10 mm de grosor en flujos bajos de metano (0.1% a ~20% v/v), resultando con una alta eliminación de metano (desde 11.1 a 16.0 μg de CH_4 $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$) tanto en altas (~20% v/v) como en bajas concentraciones (~100 ppmv) de metano en diferentes cultivos de bacterias metanooxidantes (Ganendra et al., 2015).

Con el fin de aumentar la porosidad del material de empaque para lograr el paso del oxígeno y así, favorecer la oxidación del metano, se ha usado composta mezclada con carbono obtenido de la pirólisis o gasificación de biomasa (como residuos de cultivos agrícolas) casi en ausencia de O_2 ; con lo anterior se aumentan los sitios habitables y la retención de humedad que favorece la colonización de los metanótrofos (Reddy et al., 2014).

Se ha propuesto el uso de un biofiltro con dos fases líquidas para superar las limitaciones de transferencia de masa derivada de una pobre solubilidad acuosa del metano. Para ello, se ha experimentado con el crecimiento de metanótrofos hidrofóbicos en aceite de silicona para

disminuir la restricción de la solubilidad del metano en la fase orgánica (donde se encuentran los microorganismos); sin embargo, no se observó una mejora en las capacidades de remoción entre microorganismos en fase acuosa y los microorganismos en fase orgánica (Lebrero et al., 2015).

También, se empleó como material de empaque de biofiltros el carbón activado poroso, el cual actúa como agente que inmoviliza los metanótrofos para incrementar la eficiencia de remoción de metano, y se alcanzó una capacidad de eliminación final de metano 4 veces mayor que la oxidación del experimento control (sin bacterias inmovilizadas). En el experimento control tuvo una capacidad de eliminación (CE) de 2 a 2.5 mol h⁻¹ m⁻³ y la CE del biofiltro con carbón activado, de 8 a 9 mol h⁻¹ m⁻³ (Wu et al., 2017).

2.4.3 Oxidación anóxica o anaerobia de metano.

El proceso de oxidación anóxica de metano dependiente de nitrito enlaza de forma singular los ciclos microbianos del nitrógeno y carbón. Los aceptores de electrones indicados para el proceso anaerobio son nitrato, nitrito, sulfato, sulfito, Mn (IV) y Fe (III)

Se han propuesto estas ecuaciones para la oxidación (Ettwig et al., 2010; Hu et al., 2014):



La bacteria *Candidatus M. oxyfera* puede realizar la oxidación simultánea de metano y la reducción de nitrito a nitrógeno molecular y utilizar el metano como electrodonador bajo condiciones anóxicas. La vía bioquímica significativa de *M. oxyfera* fue recapitulada por Ettwig y colaboradores (2010), planteando que este microorganismo codifica, transcribe y expresa la vía bioquímica completa para oxidación aeróbica de metano, en la que el sustrato metano es convertido a metanol, formaldehído y ion formiato, llegando a dióxido de carbono como producto final (Chen et al., 2016; Ettwig et al., 2010).

Otros autores comentan que la posible clave para llevar a cabo la metanotrofia en condiciones anóxicas es la metanógenesis en reversa (Hallam, 2004). La relación que existe entre metanótrofos arquea anaerobios y las bacterias sulfato reductoras está mediada por el sulfato (SO_4^{2-}) que actúa como aceptor de electrones (Ec. 3; Rehder, 2014).



Se han acoplado aceptores de electrones artificiales para estimular la oxidación de metano sin la participación del sulfato; ejemplos de los aceptores de electrones son: 9,10-antraquinona 2,6-disulfonato (AQDS) e isómeros, ácidos húmicos, complejos solubles de Fe (III), como citrato férrico y EDTA-férrico. Con las sustancias anteriores, se ha presentado una velocidad de oxidación de $0.1 \mu\text{mol cm}^{-3} \text{ día}^{-1}$ (Scheller et al., 2016).

En biorreactores, se ha estudiado la relación de la desnitrificación por medio de la oxidación anaerobia de metano o DAMO (por sus siglas en inglés, *Denitrifying anaerobic methane oxidation*) con la oxidación anaerobia de amonio o anammox (acrónimo derivado del inglés); se observó que la población de metanótrofos se especializa en ciertos géneros. En la

figura 20, se muestra un modelo conceptual de la interacción de la oxidación anóxica de metano y la oxidación anóxica de amonio (Hu et al., 2015).

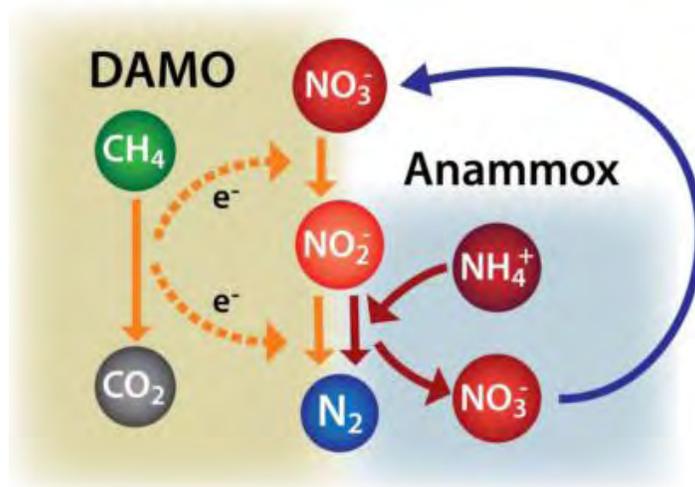


Figura 20. Modelo conceptual para la interacción entre los procesos DAMO y anammox en ambientes ricos en metano, amoníaco y nitrato o nitrito. Flujo de material y flujo de electrones se muestra en líneas continuas y líneas punteadas, respectivamente. Figura tomada de Hu *et al.*, (2015)

2.4.4 Mecanismo de acción de la enzima metano monooxigenasa

A continuación, se presenta el mecanismo de la oxidación aerobia de metano, el proceso más frecuentemente en los metanótrofos, debido a que el activador oxidante más común es el oxígeno.

El mecanismo de acción de la sMMO tiene pocas similitudes con la familia de las enzimas citocromo P450, considerado que catalizan reacciones similares de oxidación. Por lo que se ha investigado el mecanismo de acción de la enzima MMO con el objetivo de producir catalizadores sintéticos y acelerar el proceso de oxidación del metano a metanol. Los sustratos necesarios para el trabajo de la enzima son O_2 , H^+ , electrones y CH_4 .

Para la enzima sMMO, se conocen tres componentes: el componente hidroxilasa (MMOH), el componente regulatorio (MMOB) y el componente reductasa (MMOR) (Figura 21).

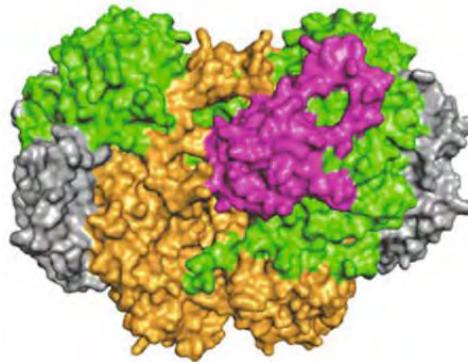


Figura 21. Enzima sMMO con los componentes hidroxilasa (verde, amarillo y gris) y reductasa (rosa). Las interacciones de estos dos componentes generan los cambios conformacionales importantes para que existan movimientos de protones y electrones en la región de los poros, permitiendo la entrada de metano y oxígeno molecular. Tomado de Lee, (2016).

El componente MMOH es un homodímero formado por dos protómeros que tienen tres subunidades distintas, llamadas $\alpha\beta\gamma$ (Figura 22).

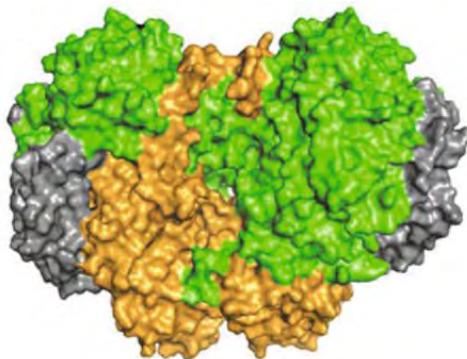


Figura 22. El componente hidroxilasa de MMO está constituida por distintas subunidades α -(verde) β (amarillo) y γ (gris). Tomado de Lee, (2016)

En la subunidad α , se encuentra el sitio activo diférrico no hemo en un espacio de 12 Å; el O_2 reacciona con el sitio activo Fe(II)-Fe(II), generando actividad catalítica intermediaria del O_2 (Figura 24).

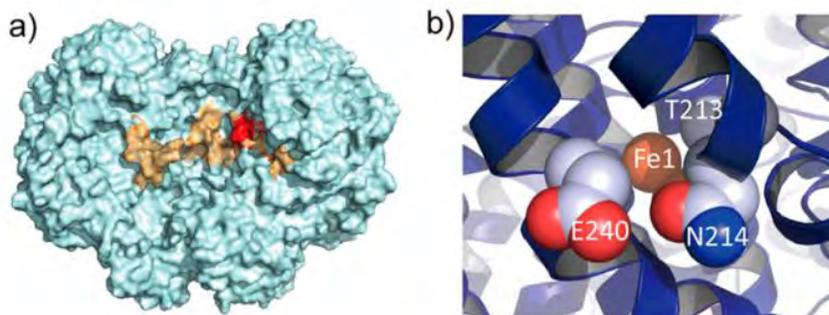


Figura 23. Sitio de unión entre el componente reductasa e hidroxilasa de la sMMO. a) Estructura del componente hidroxilasa que muestra una zona contenida en los 12 Å del centro diférrico en uno de los monómeros (rojo) y el sitio de unión al componente reductasa (naranja). b) Vista a detalle del poro en la hidroxilasa que muestra los tres residuos que definen el poro y el átomo de hierro 2+ (Fe1) del centro diférrico. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015).

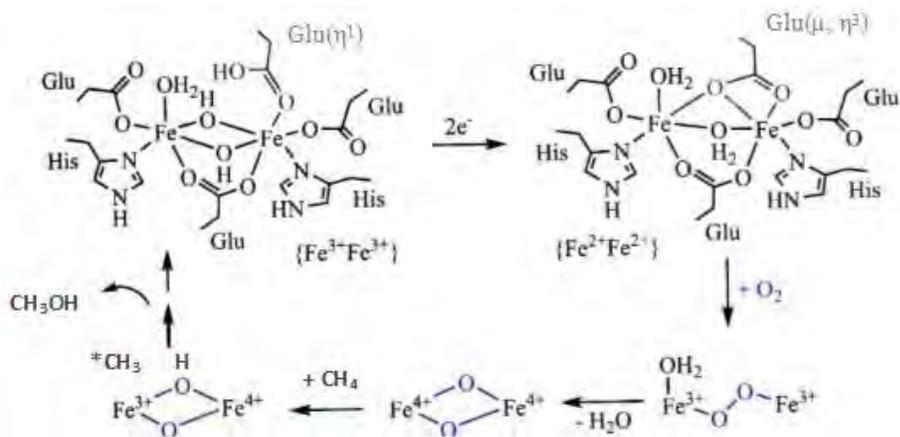


Figura 24. Metano monooxigenasa soluble, incluyendo pasos clave de la oxidación de metano a metanol. Tomado de Rehder, (2014).

Una de las propuestas planteada por Wang, Liang y Lippard del mecanismo de la enzima sMMO en condiciones óxicas es la que se describe a continuación. Para iniciar la catálisis, el componente reductasa (MMOR) suministra dos electrones al centro diférrico por medio de la unión del poro de la hidroxilasa. En MMOR, el extremo N-terminal de la reductasa tiene un dominio ferredoxina que contiene un cluster de [2Fe-2S] y la terminal C tiene una flavina adenina dinucleótida (FAD; Figura 25).

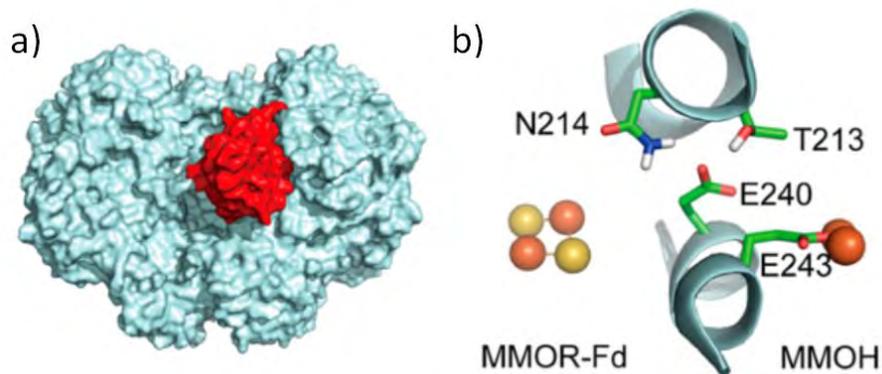


Figura 25. a) Modelo acoplado en computadora del modelo del dominio proteico ferredoxina del complejo hidroxilasa-reductasa de sMMO. b) Vista superior de la interface acoplada en el modelo mostrado en a), mostrando el cluster $[Fe_2S_2]$ del componente reductasa (amarillo y naranja), el centro diférrico (naranja oscuro) y residuos seleccionados del componente hidroxilasa. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015)

El componente regulatorio (MMOB) desplaza al componente reductasa, acoplado a la misma superficie de la hidroxilasa, formándose el complejo regulatorio-hidroxilasa (MMOB-MMOH) en una relación 2:1 (Figura 26).

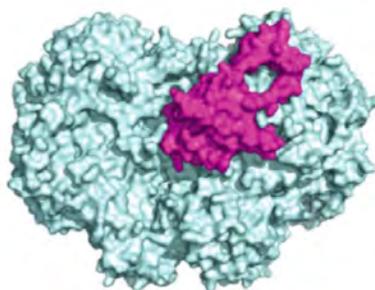


Figura 26. Estructura cristalina del complejo hidroxilasa-componente regulatorio de sMMO. El componente hidroxilasa se muestra en azul y el componente regulatorio, en morado. Tomado de Wang, Liang y Lippard, (2015)

El complejo MMOB-MMOH actúa de la siguiente forma:

- i) Induce cambios conformacionales de residuos de poros que pueden llevar protones al sitio activo.
- ii) Conecta las cavidades hidrofóbicas en la hidroxilasa que conduce desde el exterior al sitio activo de Fe(II)-Fe(II), facilitando una vía para O_2 y metano para su activación e hidroxilación.

- iii) Cierra el poro restringiendo el acceso de protones al centro Fe-Fe durante la formación de los intermedios "Fe₂O₂" necesarios para la oxidación de hidrocarburos (Figura 24).
- iv) Inhibe la transferencia no deseada de electrones a los intermedios de Fe₂O₂ bloqueando la unión de reductasa durante la activación de O₂

Así, la molécula de CH₄ encuentra su ruta al sitio activo a través de cavidades en sMMO, reaccionando posteriormente con el intermediario activo Fe₂O₂ (Figura 24).

En la Figura 27, se puede observar un acercamiento al sitio activo donde en el panel A muestra el sitio activo cuando no tiene el componente regulador (MMOB), teniendo el grupo carboxilato de Glu240 que comunica la zona accesible del disolvente para la liberación de protones y electrones; Phe188 cierra el poro para bloquear el acceso de sustrato como el metano y el oxígeno molecular a los sitios activos de Fe-Fe (esferas azules). Mientras que en el panel B, se observa el cambio cuando se agrega MMOB que provoca el reordenamiento de las cadenas laterales del sitio activo, y el Glu240 cierra la región del poro para bloquear la transferencia de electrones o protones y este reordenamiento se estabiliza mediante el enlace de hidrógeno con Thr213 (Wang, Liang y Lippard, 2015).

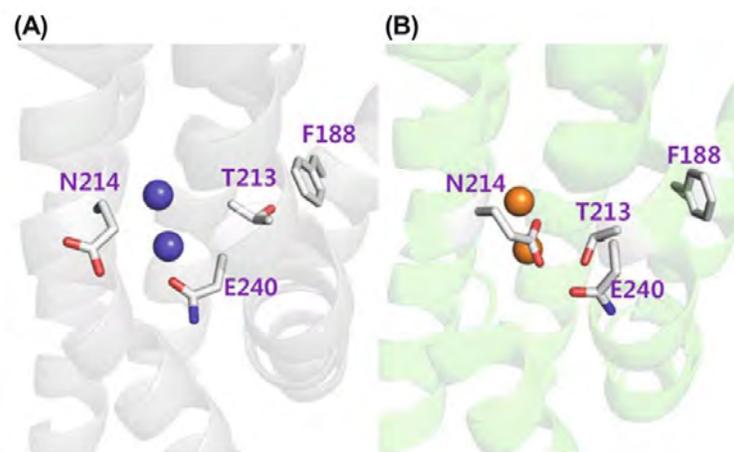


Figura 27. Cambios conformacionales en el sitio catalítico de sMMO. A) En ausencia del componente regulador (MMOB). B) Con el componente MMOB acoplado. Tomado de Lee, (2016).

La enzima MMO particulada (pMMO) está formada por tres polipéptidos alfa (*pmoB*), betha (*pmoA*) y gamma (*pmoC*) formando un trímero (Figura 28).

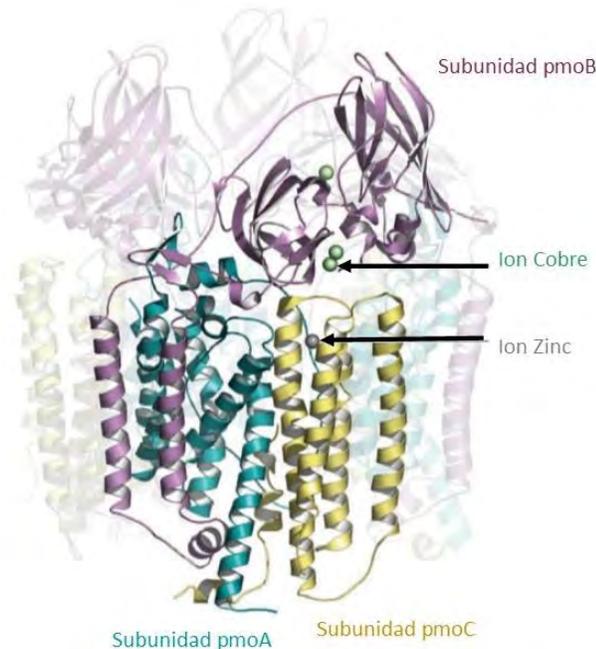


Figura 28. Trímero de pMMO con un protómero resaltado. Tomado de Hakemian y Rosenzweig, (2007).

La enzima pMMO contiene uno, dos o tres centros metálicos, de los cuales dos se conoce con certeza que contiene Cu, y el tercero puede variar con Zn o Cu (Figura 29).

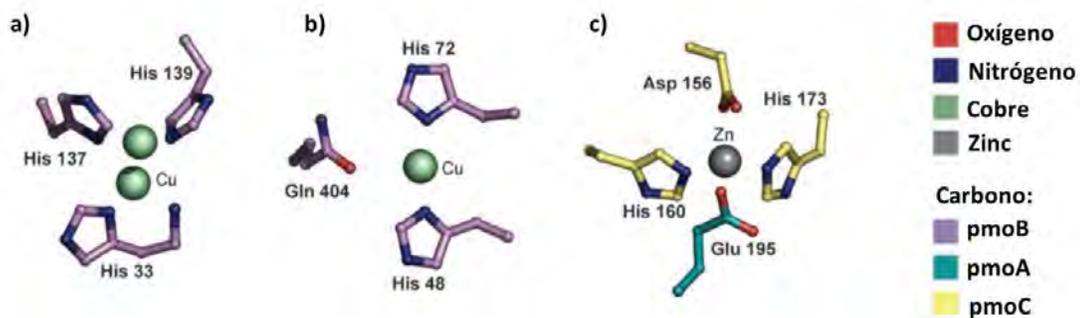


Figura 29. Centros metálicos de la estructura cristalina pMMO. A) De dos iones cobre, b) de uno ion cobre y c) un ion zinc. Tomado de Hakemian y Rosenzweig, (2007)

Existe un desacuerdo sobre el número, tipo y función de los centros de metal asociados con la MMO particulada, así como por la naturaleza del donante de electrones fisiológico. Todos los modelos coinciden en que el requerimiento para la enzima pMMO de Cu es alto, es decir, aproximadamente 10 veces mayor que el requerimiento de Cu observado en otros microorganismos (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

La metanobactina puede formar enlaces con el ion Cu(I) sin cambiar el estado de oxidación, o tomar iones Cu(II) para después reducirlo a Cu(I).

Con análisis de calorimetría isotérmica, se descubrió que la metanobactina de *M. trichosporium* OB3b (Figura 30) se une al Cu como un tetrámero con una constante de enlace inicial de $3.3 \times 10^{34} \pm 3.0 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, aproximadamente 17 a 19 órdenes de magnitud mayor que la unión de otros metales a la metanobactina. Y se estudiaron las constantes de enlace cambiando la proporción de Cu(II) y se observó que en 0.25 (cobre respecto metanobactina) es mayor en dos órdenes de magnitud que 0.5 de Cu por metanobactina. Con la información anterior, aparentemente la metanobactina es el primer ejemplo de calcóforo o de un mecanismo microbiano extracelular para tomar Cu específicamente del ambiente (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

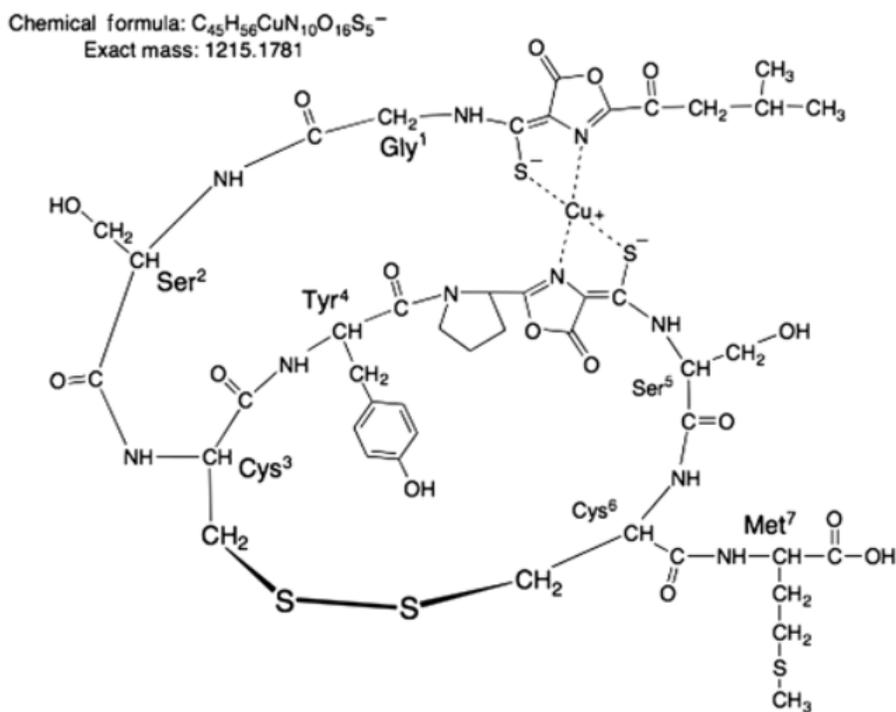


Figura 30. Estructura propuesta para la metanobactina de *Methylosinus trichosporium* OB3b. Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon, (2010).

Existen cuatro propuestas sobre la fuente reductora y la estructura de la pMMO, los detalles se encuentran resumidos en la tabla 12.

Tabla 12. Características de diferentes modelos de contenido y fuente reductora de pMMO. Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon, (2010).

Propiedad	Modelo			
	I	II	III	IV
Metales	Número de átomos por subunidad $\alpha\beta\gamma^{-1}$			
Cu $\alpha\beta\gamma^{-1}$	3	15	2-3	2-3
Fe $\alpha\beta\gamma^{-1}$	0.75	0.17	1-2	1.2
Cu-mb $\alpha\beta\gamma^{-1}$	0	0	0	6-8
Reductor	Ubiquinol	NADH/Ubiquinol	MDH ferrocitocromo	Ubiquinol/Cu- mb
Sitio activo	Cluster de Cu dinuclear	Centro de Cu trinuclear	No identificado	Centro diférrico

Cu-mb: cobre asociado a metanobactina

En la figura 31, se observa la vía propuesta de oxidación de metano con la enzima pMMO en células cultivadas en altas y bajas concentraciones de cobre. La presencia de cobre en la célula del metanótrofo repercute en la regulación de la actividad enzimática y en la expresión de los genes que codifican para las enzimas MMO, que puede ser positiva para la enzima pMMO (en azul) y regulación negativa para la enzima sMMO (en rojo). Aun se mantiene el estudio específico del papel del cobre de esta vía metabólica (Semrau, Dispirito y Yoon, 2010).

Para la oxidación del metano por parte de la enzima sMMO (en rojo; Figura 31), el proceso se describe a continuación:

- 1) el metano se oxida en el sitio activo de la subunidad α en el citoplasma de la célula bacteriana.
- 2) El metanol es expuesto al periplasma donde es oxidado por la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) utilizando como cofactor la pirrolquinolina quinona (PQQ) y usando como agente oxidante el citocromo c oxidado (Cyt C ox) formándose formaldehído.
- 3) En este punto existe una bifurcación de destinos para el formaldehído; uno es el que lo utiliza para la fijación de material celular por medio del ciclo de la serina o el ciclo de la RuMP. El formaldehído que se oxidará regresa al citoplasma y con la enzima formaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD(P) y con ayuda del agente oxidante y cofactor NAD^+ , es oxidado a ácido fórmico.

- 4) El ácido fórmico es oxidado a dióxido de carbono por medio de la enzima formiato deshidrogenasa con NAD^+ .

Para la oxidación del metano por parte de la enzima pMMO (en azul), las diferencias radican en que pMMO está asociada a la membrana y el sitio catalítico depende de cobre. Los pasos 2 y 4 son similares a los descritos anteriormente:

- 1) el metano se oxida en la zona intermembranal donde está la enzima pMMO con el suministro de agente oxidante por parte del complejo III (Cyt. bc_1) de la cadena de transporte de electrones
- 3) En este punto existe una bifurcación de destinos para el formaldehído; uno es que se utiliza para la fijación de material celular por medio del ciclo de la serina o el ciclo de la RuMP.

Otro camino es la oxidación en una reacción catalizada por la enzima formaldehído deshidrogenasa independiente de glutatión (D-FalDH) que se encuentra asociada a la membrana y utiliza como cofactor la PQQ (Zahn et al., 2001).

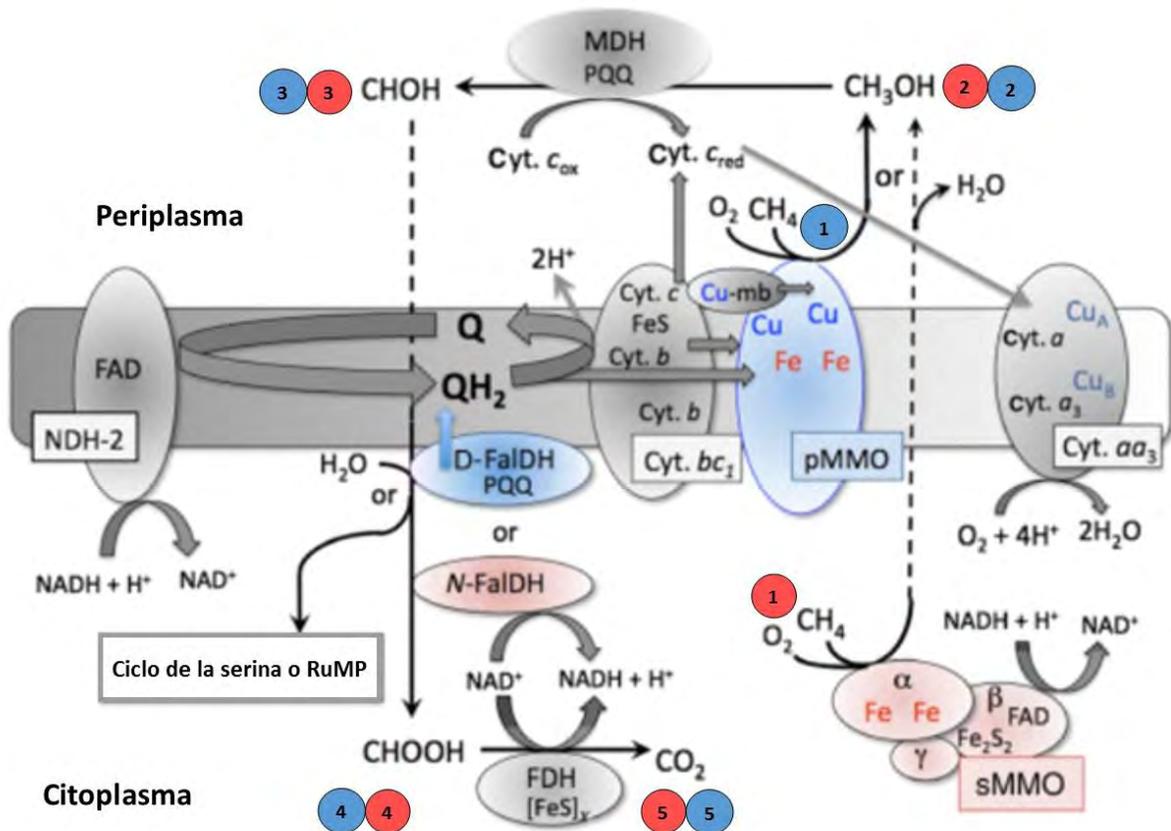


Figura 31. Vía propuesta de oxidación de CH_4 en células cultivadas en altas y bajas condiciones de Cu. La regulación que favorece la expresión génica de las proteínas en presencia de cobre a alta concentración se muestra en azul; mientras que la regulación que favorece la expresión de proteínas en presencia de cobre a baja concentración se muestra en rojo. Cyt: citocromo; D-FalDH: formaldehído deshidrogenasa ligada al tinte/quinona; FDH: formato deshidrogenasa; N-FalDH, NAD(P)-ligada a formaldehído deshidrogenasa; NDH-2, deshidrogenasa NADH tipo 2; pMMO: metano monooxigenasa particulada; Q: Ubiquinona; FAD: flavín adenín dinucleótido; MDH: metanol deshidrogenasa; PQQ pirrolquinolina quinona; sMMO metano monooxigenasa soluble; RuMP, ribulosa monofosfato
Tomado de Semrau, Dispirito y Yoon (2010).

2.5 Sulfuro de hidrógeno

2.5.1 El sulfuro de hidrógeno en la naturaleza.

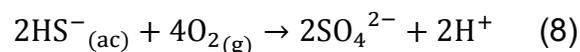
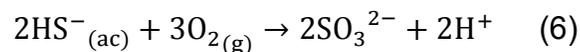
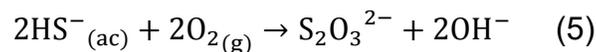
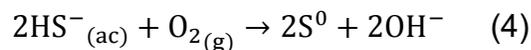
El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas inorgánico incoloro, de mal olor, que en concentraciones mayores a 0.13 ppm presenta olor a huevo putrefacto y perceptible a partir de 0.002 ppm. Es más denso que el aire y tiene una solubilidad en agua de 3.85 g por kg de agua a 1 atm a 20°C, por lo que se considera muy soluble (Cáceres et al., 2014).

El H₂S se encuentra en forma natural en gases de volcanes, manantiales de azufre, emanaciones de grietas submarinas, pantanos, ciénagas y llanuras cubiertas por las mareas, sedimentos marinos, manantiales sulfurosos y sistemas hidrotermales que lo liberan. Por lo regular, estos hábitats se encuentran a altas temperaturas y en condiciones ácidas o en condiciones mesofílicas a pH ácido, neutro o alcalino.

Las fuentes industriales del H₂S están en la producción y transporte de petróleo y gas, refinerías, plantas de gas natural, plantas petroquímicas, hornos de coque, industria alimentaria, industria del papel, plantas depuradoras de aguas residuales, entre otras.

A pH fisiológico (aproximadamente de 7.4), este compuesto se encuentra de forma predominante como HS⁻. La molécula del sulfuro de hidrógeno tiene dos protones dissociables y pueden ser sustituidos por ataque nucleofílico (Ono *et al.*, 2014).

Se sabe que el azufre se oxida a azufre elemental (S⁰), iones tiosulfato (S₂O₃²⁻), iones sulfito (SO₃²⁻), dióxido de azufre (SO₂) y iones sulfato (SO₄²⁻; Ec. 4-8; Nielsen, Vollertsen y Hvitved-Jacobsen, 2003); casi cualquier agente oxidante (aceptor de electrones) es capaz de realizar estas reacciones:



El ion sulfuro es soluble con facilidad en agua, obteniéndose un aumento de pH por dicho equilibrio ácido-base:



Y se puede seguir la protonación, si el medio reacciona con los radicales OH^- y disminuye el pH:



Existe un ciclo por medio del cual el azufre es consumido y excretado al ambiente por los seres vivos que se observa en la Figura 32, pasando desde HS^- , S^0 , SO_4^{2-} y azufre orgánico. En la Figura 32 se muestra en un recuadro punteado el proceso que es de interés en este trabajo.

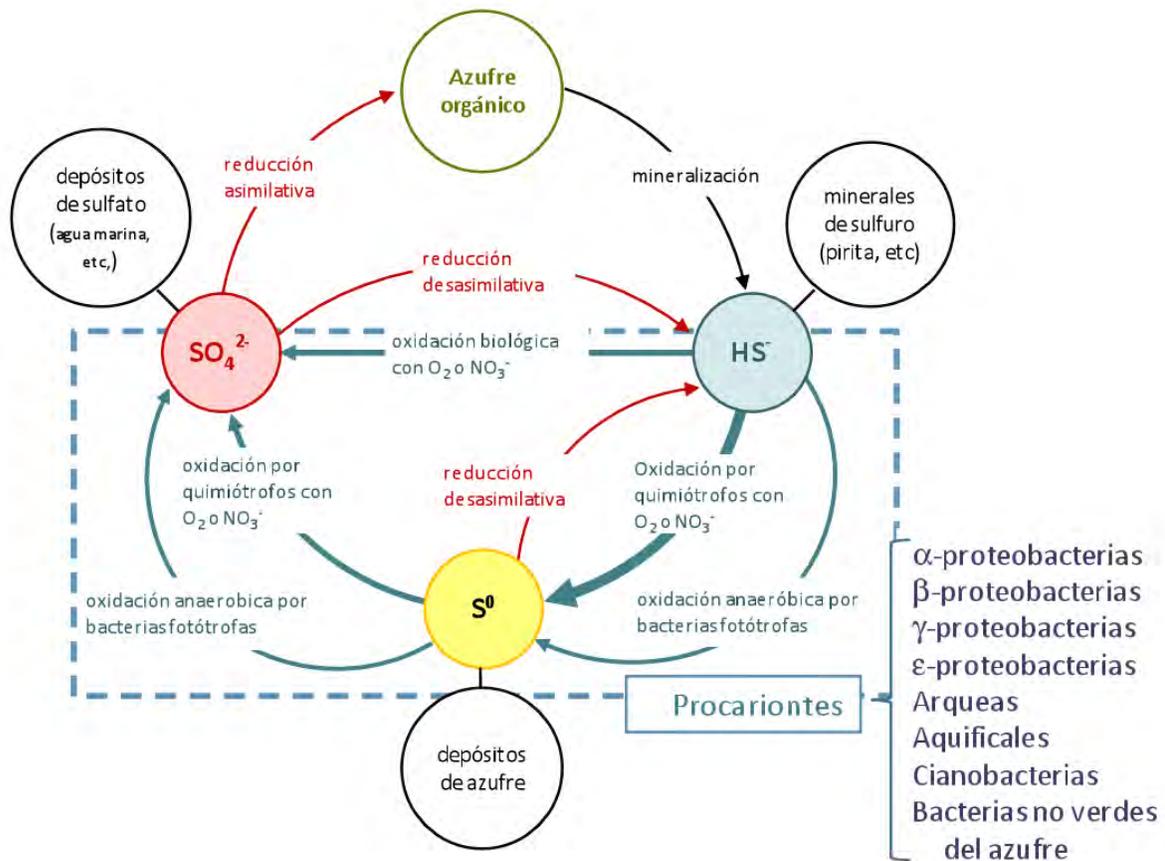


Figura 32. Ciclo biogeoquímico del azufre. Tomado de Espinoza, Revah y Le Borgne, (2010)

El papel biológico del H_2S radica en ser la fuente de azufre para asimilación en las células y su incorporación en compuestos orgánicos; o puede ser un donante de electrones (Dahl, Friedrich y Kletzin, 2008a).

La emisión de H_2S puede ser resultado de la reducción del sulfato y se ha vuelto un serio problema de salud y de seguridad ecológica. Por lo que se ha buscado su reducción a partir de diversos métodos como el incremento del potencial de óxido-reducción en el medio del par redox que involucre al ion S^{2-} ; la inhibición de la actividad de las bacterias sulforreductoras; la

eliminación química del sulfuro de hidrógeno y la aplicación de compuestos que eviten la producción de sulfuro de hidrógeno (Talaiekhosani et al., 2016).

2.5.2 Toxicidad del sulfuro de hidrógeno

El H₂S es tóxico en concentraciones mayores a 300 ppm, concentración a partir de la cual comienzan a presentarse efectos irreversibles a la salud (SIGMA-ALDRICH, 2017). En la Tabla 13 se muestran los efectos en la salud ante la exposición de este gas a distintas concentraciones.

Tabla 13. Efectos del sulfuro de hidrógeno en distintas concentraciones en el ser humano (SIGMA-ALDRICH, 2017).

Concentración de H ₂ S (ppm)	Efectos en el humano
0.13	Detección olfativa
20	Irritación en membranas mucosas de los ojos y del tracto respiratorio
>100	Fatiga olfativa rápida
250 (exposición prolongada)	Edema pulmonar
>500	Somnolencia, mareo, excitación, cefalea, marcha inestable y otros síntomas sistémicos.
>700	Pérdida del conocimiento, ansiedad
1000-2000	Hiperpnea, colapso rápido e inhibición respiratoria. Absorción rápida puede causar coma
5000	Muerte inminente

Para explicar la toxicidad del H₂S es necesario recordar que en las mitocondrias de células eucariontes se lleva a cabo el proceso llamado Cadena de transporte de electrones (Figura 33).

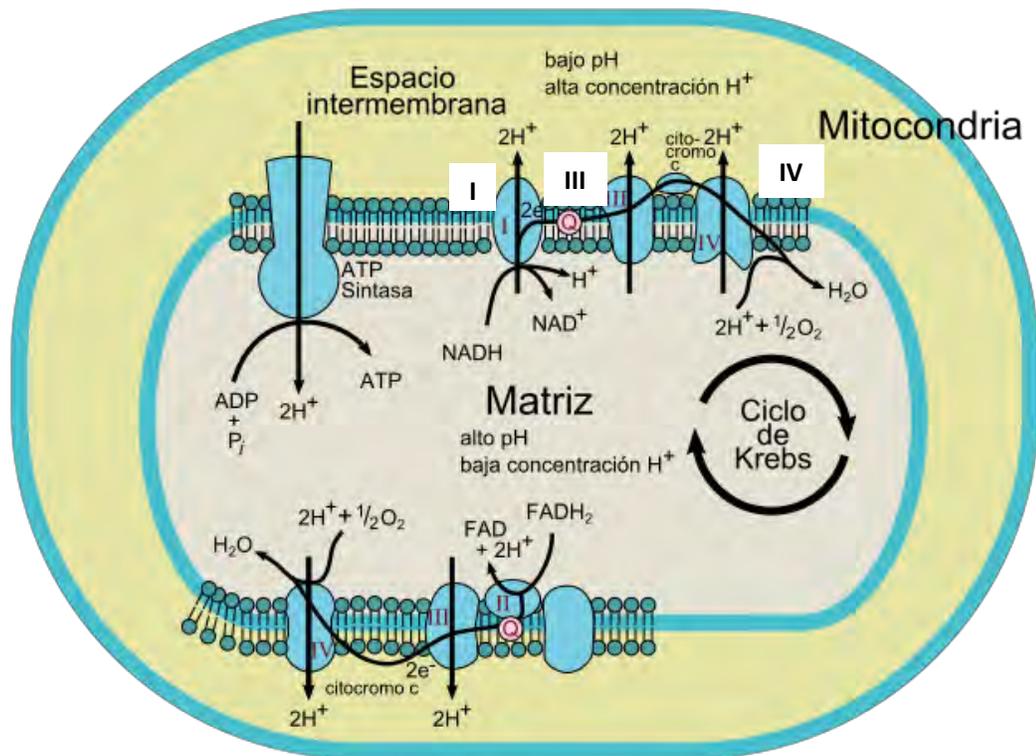


Figura 33. Cadena de transporte de electrones. En números romanos se muestran los complejos que forman la cadena respiratoria.

La cadena de transporte de electrones o la cadena respiratoria está organizada por complejos supramoleculares embebidos en la membrana mitocondrial; estos complejos pueden ser separados físicamente en 5 complejos con un tratamiento adecuado con detergentes de la membrana mitocondrial. Cada complejo es capaz de catalizar la transferencia de electrones en una parte de la cadena. El complejo I y II catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona desde dos diferentes donadores de electrones: NADH (en el complejo I; Figura 34-A) y succinato (en el complejo II; Figura 34-B). El complejo III lleva los electrones de la ubiquinona reducida (Figura 34-C) al citocromo c (Figura 34-D); y el complejo IV completa la transferencia de electrones desde del citocromo c al O₂ (Nelson y Cox, 2013).

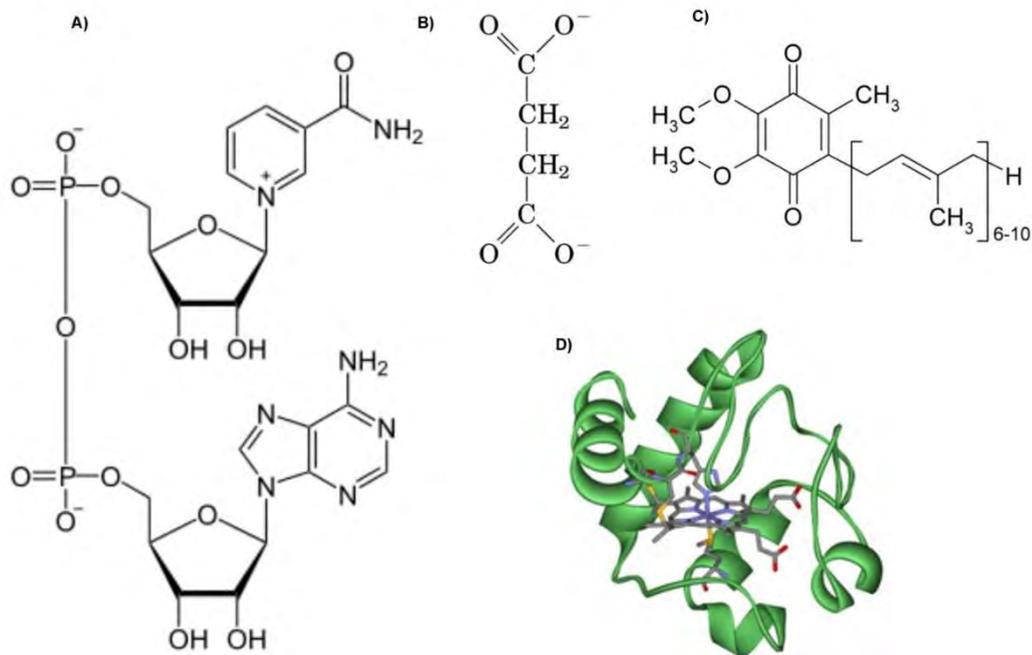


Figura 34. Estructura de las especies químicas que intervienen en la cadena de transporte de electrones. A) NADH; B) Succinato; C) Ubiquinona; D) Citocromo c.

Estas reacciones están acopladas a la generación de un gradiente de protones por los complejos I, III y IV. Dicho gradiente es utilizado para generar ATP mediante el complejo ATP sintasa, también llamado complejo V.

La molécula H_2S es tóxica para el ser humano porque bloquea la enzima citocromo c oxidasa (complejo IV) de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este complejo es el eslabón final del transporte de electrones y es necesario para oxidar componentes del complejo IV, reducir el O_2 transportado por la hemoglobina y generar un gradiente de protones (H^+). El complejo IV contiene dos grupos hemo llamados citocromo a y citocromo a3, que contienen iones Fe(II) en el sitio reactivo.

El mecanismo de bloqueo consiste en que tres moléculas de H_2S se unen al citocromo aa3 provocando una inhibición de tipo competitiva (el H_2S ocupa el sitio activo que debería ocupar el O_2 , i.e. el sustrato), interrumpiendo el transporte de electrones del cual depende el transporte de protones para la síntesis de ATP por la ATP sintasa (Szabo et al., 2014). Este bloqueo del citocromo a3 inhibe la producción de energía, por lo que los tejidos susceptibles a esta inhibición de energía son afectados. Los tejidos que manifiestan dicha afectación con mayor evidencia son las membranas mucosas y tejidos con alta demanda de oxígeno, como el tejido nervioso y cardiaco (INSHT, 2011; Jiang *et al.*, 2016).

2.5.3 Oxidación y eliminación del sulfuro de hidrógeno

El estado de oxidación del átomo de azufre en el sulfuro de hidrógeno es de -2, siendo este el estado estable de menor oxidación. La estequiometría de las reacciones posibles que puede tener S^{2-} es compleja por los diversos productos e intermediarios que se pueden formar (Ec.4 a 8; Nielsen, Vollertsen y Hvitved-Jacobsen, 2003).

Existen métodos en los que se da un tratamiento al H_2S producido por medio de: i) precipitación química de H_2S por adición de Fe (II) o Fe (III) directamente al agua residual; ii) ventilación de redes de recolección de aguas residuales para la eliminación posterior por métodos físicos, químicos y biológicos; iii) oxidación biológica por adición de donadores de electrones (nucleófilos) como nitratos y nitritos al agua residual; y iv) la aplicación de oxidación avanzada (Talaiekhosani et al., 2016).

Otros métodos actuales de eliminación de H_2S sobre corrientes gaseosas son: i) el uso de columnas con material rico en carbono obtenido por descomposición térmica de biomasa (residuos agrícolas/forestales, cultivos energéticos, etc.) en condiciones de limitación de oxígeno (Kanjanaarong et al., 2016), con escoria de cemento (Ng, Xie y Leung, 2016), ii) uso de nanocompuestos de Cu-Fe cargados con oxidación simultánea en bajas temperaturas (Li et al., 2017) y iii) el uso de biofiltros con material de empaque de bagazo de caña para bajas concentraciones de H_2S (>120 ppmv). En procesos de eliminación de H_2S en PTAR, la oxidación química del H_2S puede ocurrir de forma espontánea en el agua residual. Se sabe con certeza que pentasulfuro (S_5^{2-}) y tetrasulfuro (S_4^{2-}) son las especies iniciales predominantes en la oxidación química por oxígeno en condiciones alcalinas (Chen y Morris, 1972).

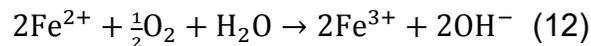
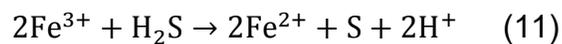
Diversos factores se involucran en la estequiometría y la cinética de la oxidación del H_2S como la relación molar sulfuro-oxígeno, pH, temperatura, fuerza iónica y la presencia de catalizadores o inhibidores. En general, el exceso de oxígeno favorecerá productos con un estado de oxidación más altos (como iones sulfato); las velocidades de reacción de oxidación aumentan conforme aumentan el pH y la temperatura (Nielsen, Vollertsen y Hvitved-Jacobsen, 2003).

Se han desarrollado catalizadores para mejorar la rapidez de la reacción de oxidación del sulfuro de hidrógeno y se ha ocupado la síntesis general de carbonos alcalinos mesoporosos (AMCs, por las siglas en inglés) sobre la base de un método simplificado de plantilla de sílice. En este método, los puntos importantes para que se lleve a cabo la reacción de oxidación son: una

buena disolución de las plantillas de sílice para crear la estructura mesoporosa interconectada y dejar partes de los productos alcalinos en los poros, siendo un material efectivo para la eliminación de H₂S (Zhang et al., 2017).

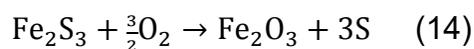
De acuerdo a la revisión realizada por Abatzoglou y Boivin (2009) la absorción química de H₂S se lleva a cabo por la afinidad que tiene el S²⁻ con cationes metálicos y este proceso se puede realizar en dos categorías: 1) mediante la oxidación de S²⁻ a S⁰ o 2) basado en la captura de S²⁻ a partir de la precipitación de las sales metálicas poco solubles en agua.

En la primera categoría se tienen las siguientes reacciones involucradas con Fe(III)-HEDTA a pH de 6.5 (Ec. 10) y la regeneración del ión Fe(III) con el suministro de O₂ (Ec. 11) (Abatzoglou y Boivin, 2009; Philip y Brooks, 1974):



Otros procesos involucrados en el tratamiento del H₂S contenido en el biogás son LO-CAT[®] y Sulferox[®] los cuales son procesos patentados donde se involucra la oxidación catalítica por medio de complejos de Fe(II) y Fe(III) con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para evitar la precipitación de hidróxido de hierro (II) (Fe(OH)₂) o sulfuro de hidrógeno (FeS); en estos procesos existe la regeneración redox para reutilizar los cationes (Abatzoglou y Boivin, 2009; Noyola et al., 2006).

En la segunda categoría del proceso de eliminación de H₂S es la conversión de los iones S²⁻ en sulfuros metálicos poco solubles en agua, usando condiciones de pH por debajo de la neutralidad. Existe otra opción donde no se involucra una fase líquida como es el uso de una esponja de hierro (formado de una mezcla de óxidos Fe₃O₄ [Fe₂O₃.FeO]) que funciona como absorbente de H₂S; se recomienda para bajos flujos de gas y bajas concentraciones de H₂S; las relaciones de eliminación son del 2.5kg H₂S/kgFe₂O₃ (Baspinar et al., 2011). En este proceso están presente las siguientes reacciones químicas:



2.6 Bio-oxidación del sulfuro de hidrógeno. Microorganismos sulfooxidantes.

El azufre forma parte esencial en el ambiente y los seres vivos, teniéndose identificado el ciclo biogeoquímico de este elemento, en el que participan diferentes microorganismos, ya sea bacterias quimiótrofas o fotótrofas.

Los microorganismos sulfooxidantes son litótrofos porque obtienen equivalentes reductores de compuestos inorgánicos y dentro de éstos, pueden ser fotótrofos (obtienen energía de la luz) y quimiótrofos (obtienen energía mediante reacciones químicas).

Los microorganismos quimiótrofos que oxidan compuestos reducidos de azufre (posibles donadores de electrones) para proveerse de energía, por lo regular, tienen como producto final iones sulfato. Los compuestos de azufre que comúnmente forman parte de la generación de energía son H_2S , S^0 y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. De lo anterior, se ha demostrado que existen al menos 3 rutas de oxidación del azufre en los microorganismos quimiolitótrofos (Figura 21):

- 1) conversión directa de S^{2-} a SO_4^{2-} por el Sistema Sox;
- 2) conversión de S^{2-} pasando a sulfito (SO_3^{2-}) y terminando en iones SO_4^{2-} con la enzima sulfito oxidasa -ruta más común entre estos microorganismos-;
- 3) de nuevo la conversión de iones S^{2-} que pasa a SO_3^{2-} y por la acción de la actividad de la enzima adenosina fosfosulfato reductasa (APS reductasa) -enzima esencial en las bacterias reductoras de sulfato- los iones SO_3^{2-} se convierten a SO_4^{2-} .

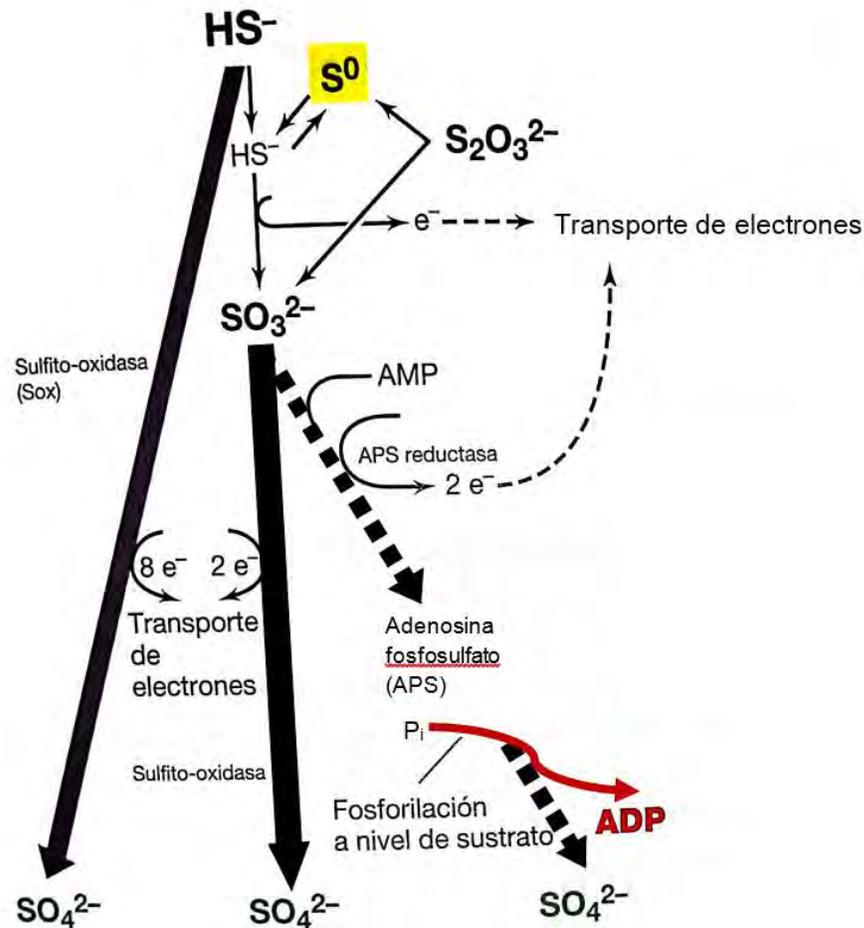
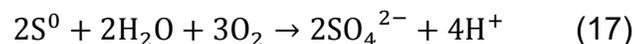
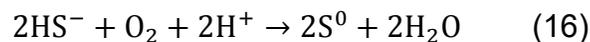
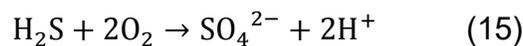


Figura 35. Oxidación de compuestos reducidos de azufre por quimiolitótrofos del azufre. Etapas en la oxidación de diferentes compuestos reducidos del azufre. Se conocen tres rutas diferentes. Compuestos involucrados: HS⁻: sulfuro; S⁰: Azufre; S₂O₃²⁻: Tiosulfato; SO₃²⁻: sulfito y SO₄²⁻: Sulfato. Tomado de Madigan et al. (2015).

En general, las bacterias sulfooxidantes usan oxígeno molecular (O₂) como aceptor final de electrones (Ecuaciones 15 y 16), sin embargo, en ausencia, algunas especies como *Thiobacillus denitrificans* ocupan iones nitrato (NO₃⁻; Ecuación 17; Espinoza, Revah y Le Borgne, 2010; Guerrero *et al.*, 2016):



Filogenéticamente, estos microorganismos se encuentran identificados en tres *phyla* de Bacteria (*Proteobacteria*, *Aquificae* y *Deinococcus-Thermus*) en los géneros *Acidianus*,

Acidithiobacillus, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus* y *Xanthobacter*; los cuales son procariones aerobios sulfooxidantes y se desarrollan en ambientes mesofílicos. También, existen bacterias anaerobias sulfooxidantes fototróficas que son neutrofílicas y mesofílicas pertenecientes a los géneros como *Chromatium*, *Clorobium*, *Rhodobacter*, *Rodopseudomonas*, *Rhodovulum*, y *Thiocapsa* (Friedrich et al., 2001).

Los microorganismos quimiolitótrofos se pueden encontrar donde exista H₂S en forma natural que, por lo regular, son hábitats a altas temperaturas y condiciones ácidas (donde pueden habitar los termófilos Gram positivos del género *Sulfobacillus*) o condiciones mesofílicas a pH ácido, neutro o alcalino (donde se pueden encontrar microorganismos del *phylum Proteobacteria*).

2.6.1 Condiciones en los hábitats de los sulfooxidantes

En los microorganismos sulfooxidantes se han identificado características ambientales bajo las cuales pueden desarrollarse de forma favorable. Para la temperatura óptima se ha determinado en un intervalo entre 25 y 40°C en un ambiente mesofílico y si se encuentra por encima o por debajo de este intervalo de temperatura, la oxidación se observa notablemente afectada; sin embargo, también se han reportado la presencia de microorganismos termófilos que viven a temperaturas entre 60-90°C (Liu, Beer y Whitman, 2012). También, estos microorganismos disminuyen el pH del ambiente en donde metabolizan el azufre (Rabbani et al., 2016) y, a pesar de lo anterior, se ha determinado un amplio intervalo de pH para el hábitat de las diferentes especies de sulfooxidantes. En la tabla 14 se resume esta variabilidad.

Tabla 14. Valores de pH de diferentes especies de sulfooxidantes (Rabbani et al., 2016).

Especie	pH óptimo para el crecimiento
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6.8-7.4
<i>Thiobacillus thioparus</i>	5.5-7.0
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	1.8-2.5

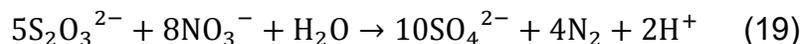
A valores de pH superiores a 5, la fracción disponible de H₂S disminuye debido a la disociación que existe en HS⁻, volviéndose soluble en agua por el equilibrio ácido-base (Long

et al., 2016) y, por ende, se reduce la transferencia del líquido a gas, lo que favorece la oxidación del sulfuro de hidrógeno en fase acuosa, por medio de la oxidación química o la oxidación biológica, produciéndose polisulfuros y iones tiosulfatos (González-Sánchez, Revah y Deshusses, 2008).

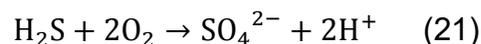
Existen ciertos componentes que podrían inhibir el proceso de oxidación del sulfuro, como es el nitrato, efecto que se ha seguido a concentraciones de 660 mg NO₃-N/L (Fajardo et al., 2014). Se ha reportado una inhibición por metales de transición como Zn, Cu a concentraciones 0.5 y 1.0 mg/L. Además, los compuestos con grupos funcionales tioles (R-SH) interfieren con la oxidación de H₂S por interacción hidrofílica, así como se presenta la inhibición por polisulfanos (H₂S_n) por interacción hidrofóbica (Guerrero et al., 2016; Roman et al., 2016).

2.6.2 Oxidación anóxica y óxica

Existen especies sulfooxidantes que se desarrollan en ambientes anóxicos, en este caso ocupan nitrato, mediante la desnitrificación autotrófica, que consiste en la oxidación del sulfuro y otros compuestos reducidos de azufre por óxidos de nitrógeno (Ec.18 al 20) produciendo iones sulfato y nitrógeno elemental. Ejemplo de estos microorganismos son las bacterias fotótrofas verdes y púrpuras, algunos quimiolitótrofos estrictos (como *Thiomargarita* y *Thiomicrospira*) o facultativos (por ejemplo, *Beggiatoa*). Los más estudiados son *Thiobacillus* y *Achromatium* (Guerrero et al., 2016; Madigan et al., 2015).



La oxidación biológica de H₂S en condiciones óxicas, se ve representada por la reacción biológica total mostrada en Ec. 21:



En este proceso (Ec. 21) se produce S⁰ o SO₄²⁻ dependiendo de la proporción de O₂ que exista en el aire tratado. La mayoría de estos organismos son aerobios estrictos (Quimiolitótrofos del azufre, *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, etc).

2.6.3 Bioquímica de la sulfooxidación

Debido a los diversos estados de oxidación del azufre (de -2 a +6) existe una amplia variedad de enzimas y conjuntos enzimáticos para oxidar y reducir compuestos de azufre. Ejemplos de enzimas que oxidan compuestos de azufre son tiosulfato quinona oxidorreductasa (TQO), tetrionato hidrolasa (TetH) y el sistema multienzimático Sox (estudiado en *Paracoccus denitrificans*). La bioquímica de la oxidación de compuestos de azufre es extensa, por lo que se enfocará únicamente en los que toman como sustrato el H₂S.

Existen vías de oxidación de sulfuro mediadas por la enzima Flavocitocromo c sulfuro deshidrogenasa (FccAB) y, como se muestra en la sección verde de la Figura 36, el aceptor de electrones es el citocromo c 550 oxidado (CycA ox), pasando a formar S⁰ o polisulfuros (Friedrich *et al.*, 2001; Dahl, Friedrich y Kletzin, 2008a).

La enzima sulfuro quinona reductasa (Sqr) es una proteína integral de la membrana celular interna y es una oxidorreductasa dependiente de quinona; el sitio activo de la Sqr se encuentra orientado hacia el periplasma. Probablemente sea la vía más común para la oxidación de sulfuro de hidrógeno, aunque no ha sido bien descrita. (Dahl, Friedrich y Kletzin, 2008a)

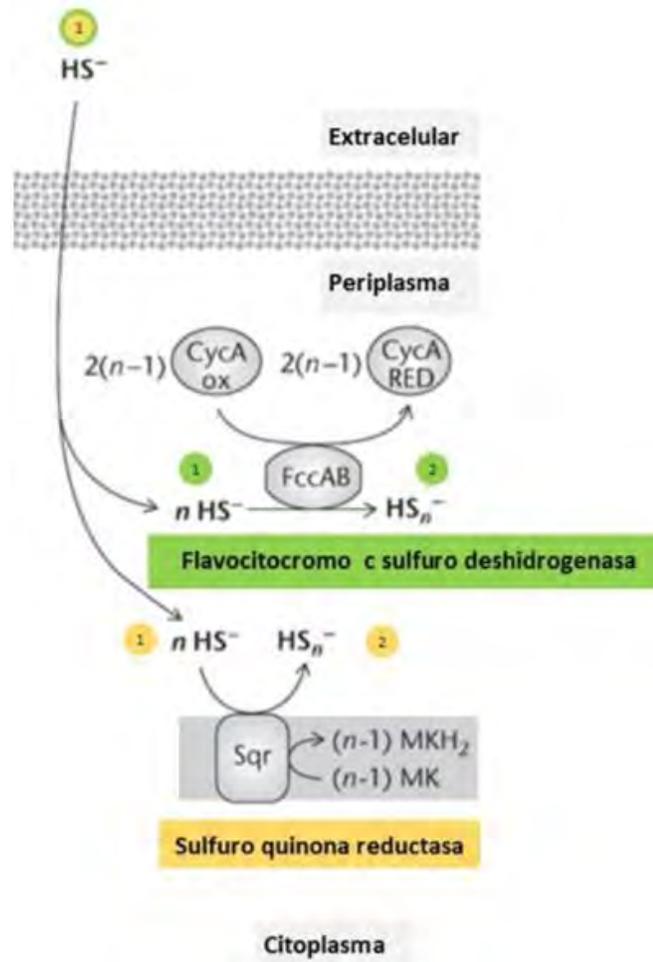


Figura 36. Posibles rutas metabólicas propuestas para el sulfuro de hidrógeno. Es posible que no todas las rutas y enzimas estén presentes en un solo organismo. Adaptado de Dahl, Friedrich y Kletzin, (2008b)

Otra forma de clasificar el mecanismo de oxidación del sulfuro de hidrógeno es según su requerimiento de oxígeno. Existen dos vías de oxidación del sulfuro de hidrógeno (Figura 37):

- 1) Ruta para oxígeno limitante que, como su nombre lo dice, está presente cuando hay oxígeno limitado y el aceptor de electrones es NAD^+ .
- 2) Ruta para oxígeno abundante, en la que el aceptor de electrones es el O_2 .

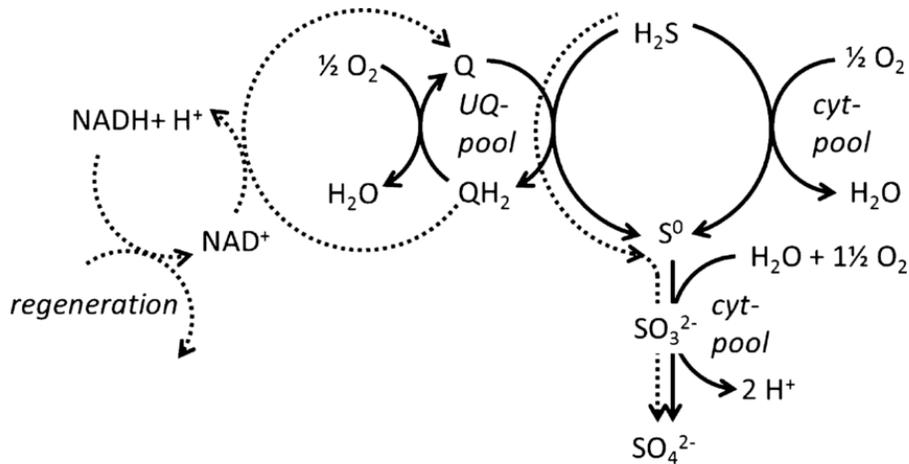


Figura 37. Vía de reacción propuesta que dirige la formación de S^0 y SO_4^{2-} de la oxidación biológica de sulfuro. Las líneas punteadas representan la Ruta para limitación de oxígeno (RLO), y las líneas sólidas representan la Ruta con suficiente oxígeno (RCO). La UB-pool= fuente de ubiquinona, Q/QH₂ = quinona oxidada/reducida, cyt-pool = fuente de citocromo Tomado de Klok *et al.*, (2012)

Los electrones resultantes de la oxidación del sulfuro entran en la cadena respiratoria al nivel de los citocromos tipo C (Figura 38) y con la participación de la flavocitocromo c oxidoreductasa (FCC). Como ya se mencionó, FCC forma parte del sistema respiratorio y HS⁻ se oxida a S⁰, con el citocromo C como aceptor de electrones. Las enzimas FCC y Sqr se relacionan por tener un ancestro en común y un dominio catalítico similar (flavina; Klok *et al.*, 2012).

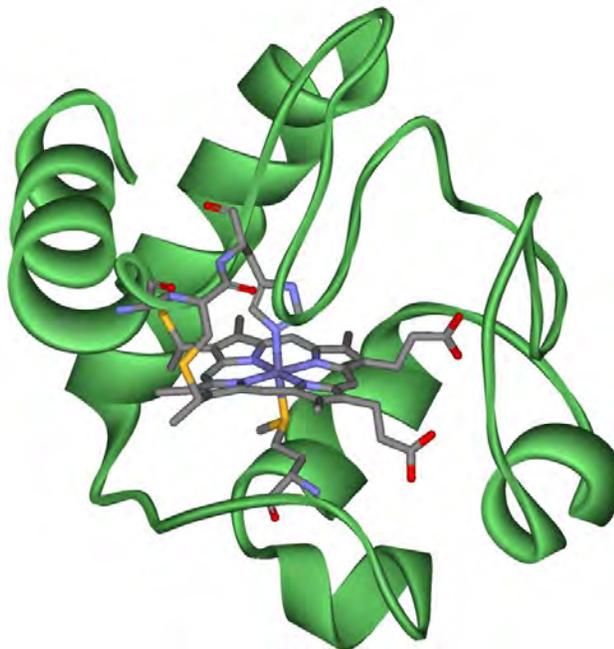


Figura 38. Estructura del citocromo c. Son proteínas encargadas del transporte de energía química en todas las células vivas. Tomado de Hoffmeier, (2006)

2.7 Efecto del sulfuro de hidrógeno sobre la oxidación del metano.

Se ha identificado altas concentraciones de H₂S en el biogás producido en digestores anaerobios desde 400 ppm hasta 5000 ppm (Rands *et al.*, 1981; Namgung, Ahn y Song, 2012; Souza, Chernicharo y Melo, 2012; Cherosky y Li, 2013).

En 2009, Yu y colaboradores reportaron el efecto del H₂S en la biooxidación del CH₄ en minas de carbón donde se detectó una ligera inhibición en diferentes concentraciones de H₂S (Yu *et al.*, 2009).

Sin embargo, en otro estudio se realizaron pruebas con residuos sólidos municipales a concentraciones mayores al 20% de metano, encontrando que el H₂S no inhibe la oxidación de metano (Long *et al.*, 2013). Se ha reportado que ciertos metanótrofos como *Methylobacterium album* no resultan afectados en su capacidad de oxidar metano a concentraciones muy bajas de H₂S, a 70 ppm-700 ppm (0.007-0.07% v/v; Cáceres, Gentina y Aroca, 2014).

No obstante, la actividad general metanótrofa se reduce a bajas concentraciones de metano (menores a 5%) y mas en tierra de vertedero, que en residuos municipales (Long *et al.*, 2013). Se han realizado estudios cinéticos con la especie *Methylocystis sp* (aislada de un relleno sanitario) en los que se observó la inhibición de la oxidación de metano a una concentración de 200 ppm de H₂S (Lee *et al.*, 2011).

Algunas de las cepas mas generalizadas en sistemas de oxidación de emisiones gaseosas, como *Methylosinus trichosporium* OB3b, pueden ser inadecuadas para la conversión de CH₄ presente en biogás, ya que pueden ser inhibidas por H₂S o amoniaco (Ge *et al.*, 2014).

Los metanótrofos tipo II presentaron mayor tolerancia al H₂S y mas abundancia que los tipo I (Long *et al.*, 2013). Se han hecho estudios particulares con ciertas especies de microorganismos y se ha encontrado que la capacidad de oxidación del metano de *Methylocystis sp*. disminuye por la presencia de H₂S, a una concentración de 500 ppm (0.05%), mientras que *Methylobacterium album* es más resistente a la presencia de H₂S (Cáceres, Gentina y Aroca, 2014).

Se han aislado microorganismos metanótrofos como la bacteria *Methylocaldum sp.* (SAD2) y *Methylocystus parvus* OBBP resistentes a altas concentraciones de H₂S (500-1000ppm) manteniendo su metabolismo funcional (Zhang *et al.*, 2016). También, se ha encontrado un

microorganismo metanótrofo facultativo *Sphingopyxis* sp. (MD2) capaz de degradar H₂S como, dimetil sulfuro y metanoetiol. Este microorganismo expresa la enzima pMMO y resultó filogenéticamente diferente de los ya conocidos géneros de los metanótrofos (Lee, Kim y Cho, 2012).

En investigaciones realizadas en un biofiltro, a escala de laboratorio (Figura 39A), para el tratamiento anaerobio de aguas residuales municipales, se encontró que el crecimiento de un cultivo metanótrofo se ve detenido a 750 ppm (v/v) de H₂S. La velocidad de degradación de metano y la velocidad de producción de CO₂ disminuyen a partir de 200 ppm (v/v; Sanchez Rodriguez, 2015; Ruiz Ruiz, 2017). En un biofiltro escala piloto (Figura 39B), la degradación del metano se ve disminuida en una concentración a 500 ppmv de H₂S (Huete Chevez, 2017).

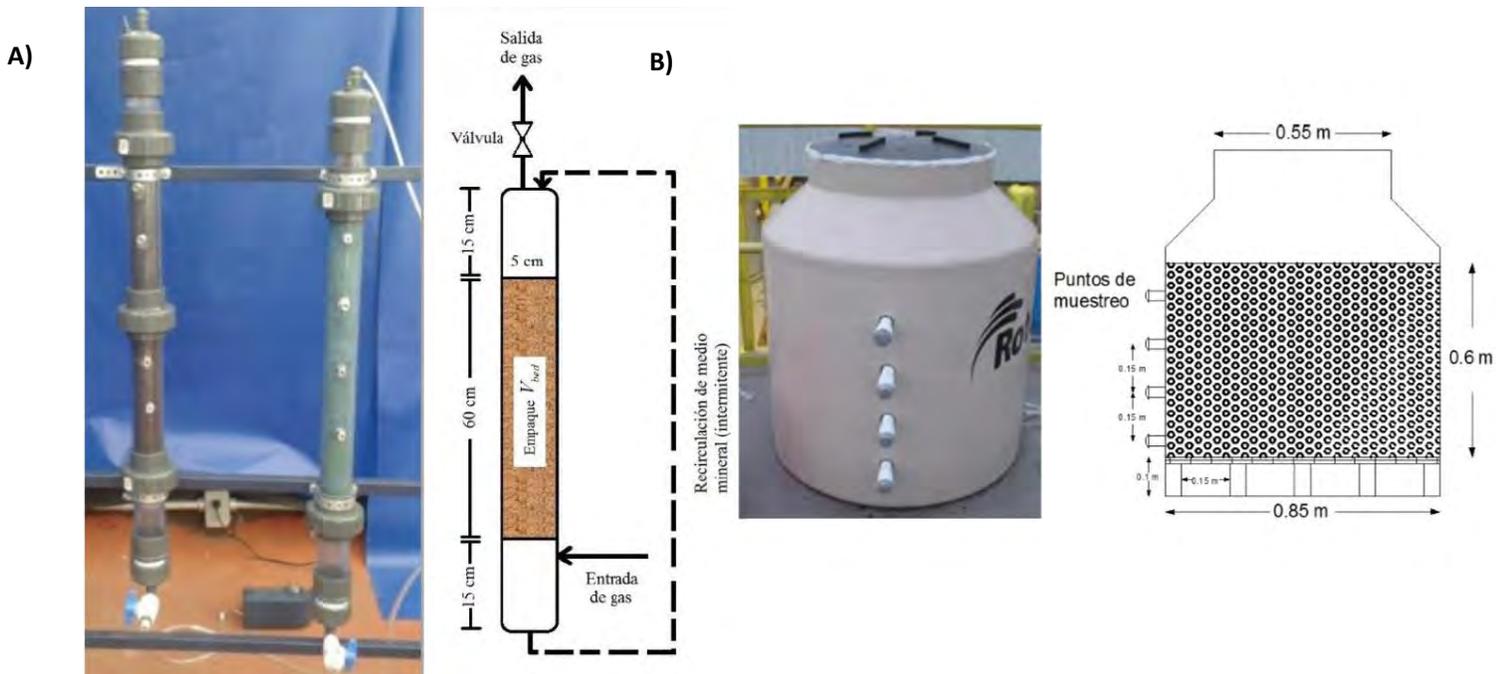


Figura 39. A) Biofiltros escala laboratorio con empaque de composta y esponjas de poliuretano y medidas del biofiltro. B) Biofiltro con empaque de composta escala piloto y medidas del biofiltro. Tomado de Gómez-Borraz, (2017) y Huete Chevez, (2017).

Como ya se ha mencionado antes, en la biofiltración de emisiones gaseosas en PTAR pequeñas existe la presencia de H₂S en el biogás que provoca interferencias en el proceso de oxidación del CH₄. Siendo este uno de los mayores retos, la inhibición de metanótrofos por medio de la presencia de H₂S en el biogás (Zhang et al., 2016).

La posible explicación para la inhibición de la oxidación de metano causada por H₂S, puede ser una inhibición competitiva y esto se respalda por estudios con compuestos sulfurados como metanotiol (CH₃SH) y dimetil sulfuro (CH₃SCH₃; Fuse *et al.*, 1998; Börjesson, 2001). Además, la toxicidad que presenta el H₂S es debida a su efecto sobre las actividades enzimáticas de la cadena de transporte de electrones (en específico en el complejo IV) de los seres aerobios, como lo son la mayoría de los metanótrofos (Szabo *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2009).

2.8 Herramientas de Biología Molecular para el estudio de metanótrofos y sulfooxidantes en biofiltros

Para tener un estudio a mayor profundidad de lo que sucede en el biofiltro durante la oxidación de CH₄ y H₂S es necesario buscar el apoyo de herramientas de Biología Molecular, para estudiar los microorganismos en su ambiente natural (ecología microbiana) y conocer cómo pueden variar los metanótrofos de acuerdo con los sulfooxidantes y viceversa. Finalmente, esa dinámica entre los microorganismos se reflejará en la capacidad de oxidación del CH₄ y del H₂S.

De acuerdo con Cabrol y Malhautier (2011), existen diversas formas de estudiar la ecología microbiana; la técnica de estudio que se usará dependerá de lo que se quiera saber. Como ejemplo, se pueden conocer:

1. La densidad bacteriana. Esta es la masa total del conjunto de la población en un volumen determinado de medio de cultivo (Romero Cabello, 2007). Utilizando tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol).
2. La diversidad bacteriana. Los parámetros que se estudian son la variabilidad espacial y temporal; así como otros factores comunitarios que impulsan la función del ecosistema, tales como la diversidad funcional de los microorganismos.
3. La estructura de comunidad microbiana. Se busca conocer la variabilidad espacial, temporal o entre réplicas; estudiar la estratificación (la separación de poblaciones en capas) y la homogeneidad.

En los biofiltros no es posible analizar el genoma de solo una especie de microorganismos; en su lugar, se extrae el DNA de todos los microorganismos contenidos en la muestra ambiental. A la rama que estudia el conjunto de varias comunidades de diferentes especies en una muestra ambiental se denomina metagenómica (Talbot et al., 2008).

La extracción de DNA requiere ser de buena calidad debido a que de esto dependerá la calidad del análisis del material genético resultante de la muestra analizada. Por lo tanto, es un proceso que requiere realizarse con sumo cuidado para obtener la concentración suficiente para análisis y con un buen grado de pureza (Allen y Banfield, 2005; Ruiz Ruiz, 2017).

Para conocer la ecología microbiana, existen diversas técnicas de identificación de la huella molecular en genética bacteriana. Estos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. 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
DGGE (Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante)	Diferencias en longitud y secuencia amplificando la secuencia específica del gen de la subunidad 16S rRNA	(Ruiz Ruiz, 2017)
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	Propiedad natural de las enzimas DNA polimerasas para replicar hebras de DNA utilizando ciclos de altas y bajas temperaturas alternados para separar las hebras de DNA recién formadas entre sí en cada fase de replicación y, dejar que las hebras de DNA vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.	(Baker, Smith y Cowan, 2003)
qPCR (PCR cuantitativa o en tiempo real)	Mismo fundamento que PCR convencional solo que se agrega un fluoróforo y se emplea un termociclador con sensores para medir fluorescencia. Esto permite medir la tasa de amplificación de uno o más productos específicos. La medición sigue a lo largo del proceso de amplificación.	(Kim, Jeong y Cho, 2014)
RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)	Reconoce secuencias de RNA por medio del DNA obtenido	(Pirolli et al., 2016)
FISH (Hibridación con fluorescencia in situ)	Detecta secuencias específicas de DNA	(Diniz Bezerra, 2015)
SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla)	Rastreo de mutaciones usada en el diagnóstico molecular basada en la migración electroforética del DNA.	(Vital-López et al., 2016)
ITS (Espaciador transcrito interno)	Secuencia de las regiones de DNA genes independientes para cierto RNA ribosómico (rRNAs) Estos genes parecen ser casi idénticos entre una gran variedad de especies, pero los espaciadores de DNA entre ellos son muy variables y pueden ser específicos.	(Forss et al., 2017)
ARISA (Análisis espaciado intergénico ribosómico automatizado)	Utiliza la proximidad de los genes de las subunidades 26S y 23S de rRNA, los cuales difieren entre especies.	(Andrus et al., 2014)
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)

Las técnicas descritas en la Tabla 15 están enfocadas en el análisis de primer acercamiento ante el material genético de los microorganismos presentes en el material de empaque del biofiltro; sin embargo, no permiten un estudio a profundidad de las secuencias establecidas en el genoma bacteriano. Por lo que existe una segunda fase de análisis genómico de la comunidad microbiana en el biofiltro que es la secuenciación.

La secuenciación consiste en conocer la secuencia de bases nitrogenadas que forman la molécula de DNA que contiene la información genética que se transporta en un segmento específico de DNA (NIH, 2015). En este proceso existen técnicas de diferente generación que inician en 1977 con el método de Sanger y actualmente llegan a la tercera generación. En la Tabla 16 se pueden ver las diferentes plataformas de secuenciación para generar la secuencia deseada.

Tabla 16. Plataformas de secuenciación de primera, segunda y tercera generación, se especifican los tamaños máximos de lectura. Tomado de López de Heredia (2016).

Generación	Plataforma	Tecnología	Tamaño máximo de lectura (pares de base)
<i>Primera</i>	Sanger	Longitud de didesoxinucleótidos	~1000
<i>Segunda</i>	Roche 454	Pirosecuenciación	~700
	SOLiD	Ligación y codificación por dos bases	2x75
	Illumina/Solexa	Secuenciación por síntesis	2x150
	PGM/Ion Proton	Tecnología de semiconductores	2 000
<i>Tercera</i>	Helicos	Secuenciación individual con moléculas fluorescentes	70
	PacBio	Secuenciación de una única molécula I en tiempo real	30 000
	Nanopore	Bioporos	200 000

Uno de los genes marcadores que es secuenciado para la identificación de organismos metanótrofos es el gen de la subunidad 16S rRNA (para conocer la identificación filogenética de metanótrofos y sulfooxidantes). Este gen puede ser utilizado debido a la alta conservación de la

secuencia que existe en los genomas de organismos vivos (Woese y Fox, 1977)- La información obtenida del gen de la subunidad 16S rRNA se ha manejado para aclarar las afinidades taxonómicas de una amplia gama de taxa y como una herramienta potente para evaluar la diversidad genética de muestras ambientales.

También, se identifican marcadores funcionales en la fisiología y metabolismo de los metanótrofos. En la Tabla 17 se muestran los genes funcionales que se secuencian para detectar la presencia de metanótrofos.

Tabla 17. Genes funcionales utilizados para el reconocimiento de microorganismos metanótrofos; (Henckel, Friedrich y Conrad, 1999; McDonald *et al.*, 2008; Chowdhury y Dick, 2013; Lee, 2016).

Gen u operón	Proteína que codifica
<i>pmoA</i>	pMMO
<i>mmoX</i>	sMMO (componente α Hidroxilasa)
<i>mmoY</i>	sMMO (componente beta Hidroxilasa)
<i>mmoZ</i>	sMMO (componente gamma Hidroxilasa)
<i>mmoB</i>	sMMO (componente regulatorio)
<i>mmoC</i>	Componente reductasa
<i>mmoG</i> <i>mmoQ</i> <i>mmoS</i> <i>mmoR</i>	Responsables de la regulación génica de sMMO
<i>mxoF</i>	subunidad metanol deshidrogenasa
<i>nifH</i>	dinitrógeno reductasa (clave del componente en el complejo de la enzima nitrogenasa)
<i>fhcD</i>	subunidad D del complejo formiltransferasa/hidrolasa (parte de la vía H4MPT para oxidación de formaldehído)

Para los microorganismos sulfooxidantes se encuentran identificados los genes marcadores como son el *aprBA* el cual codifica las subunidades alfa y beta de la enzima adenosina fosfosulfato reductasa (PAS reductasa), debido a que existe una alta conservación entre los procariontes reductores de sulfatos y oxidantes del azufre. También, se utiliza el gen *aprA* (Meyer y Kuever, 2007); también, se usa *soxB* el cual codifica la enzima clave de la vía Sox, la sulfato tiorhidrolasa (Tourova et al., 2013).

En técnicas de Biología Molecular aplicadas en biofiltros, las características por mejorar son la especificidad y la sensibilidad para la detección de las secuencias de DNA. Para así poder inferir las relaciones de filogenia entre la comunidad microbiana. Igualmente, se puede obtener información relacionada entre la función de alguna enzima en específica y la filogenia de la comunidad microbiana (Talbot *et al.*, 2008; Cabrol y Malhautier, 2011).

En el futuro, el manejo de las herramientas de la metatranscriptómica (extracción de mRNA para observar cuántos de estos genes evaluados son realmente activos), así como la metaproteómica (estudio de la presencia de proteínas para conocer realmente la expresión del gen que codifica a estas proteínas) serán herramientas con una mayor accesibilidad para la plena caracterización de la microbiota en biofiltros.

3 Conclusiones y perspectivas de investigación

3.1 Conclusiones

Existe un estudio extenso sobre las comunidades de metanótrofos y sulfooxidantes (más de las segundas que de las primeras) en procesos de biorremediación donde se identifican las mejores posibilidades de desarrollo de ambos microorganismos por separado. Sin embargo, aun son escasos los estudios donde se involucra la oxidación biológica simultánea de metano y sulfuro de hidrógeno, por lo que es necesario el estudio metagenómico, metatranscriptómico y proteómico para conocer a mayor profundidad la relación entre ambos tipos de poblaciones de microorganismos.

Las mejores condiciones reportadas para los organismos metanótrofos alimentados con concentraciones de metano alrededor del 4% son pH neutro, a temperatura ambiente (~20-30°C), así como un flujo suficiente de oxígeno (21%) en el inóculo, un porcentaje de humedad de 15-32%. Los nutrientes que podrían ayudar al metabolismo de los metanótrofos son el nitrato (600-700 mg/kg), iones amonio (15mg/1kg de suelo), adición de cobre (II) teniendo la certeza que existen metanótrofos predominantes que expresen pMMO. Los organismos sulfooxidantes presentan una mejor adaptación al medio debido a la variedad de especies que pueden adaptarse en ambientes extremófilos y mesófilos. De lo anterior, se puede establecer esas condiciones de trabajo para biofiltros de emisiones gaseosas de CH₄ y H₂S, además que se facilita por ser cercanas a las condiciones ambientales, únicamente habría que mantener la humedad necesaria con el debido riego del material de empaque.

Las corrientes gaseosas con sulfuro de hidrógeno y metano pueden provocar la inhibición de las metanótrofas por parte del primer gas, cuando se alcanzan concentraciones superiores a 500 ppm_v de H₂S y concentraciones de metano de alrededor de 4%. A concentraciones de 20% de metano, el H₂S no presenta claros efectos inhibitorios.

3.2 Perspectivas de investigación

Se han desarrollado avances sobre la investigación de los microorganismos metanótrofos por lo que es importante la identificación para un mejor análisis de estos microorganismos, y así conocer qué hábitat favorece o desfavorece en la capacidad quimiótrofa de los metanótrofos.

Se conoce de forma extensa la dinámica de los microorganismos sulfooxidantes, así como las mejores técnicas de eliminación de metano y sulfuro de hidrógeno por separado. Sin embargo, aun falta caracterizar la interacción entre ambos tipos de microorganismos (metanótrofos y sulfooxidantes) en biofiltros en escala piloto o real para entender mejor la relación entre ambos grupos y el efecto que tienen las condiciones de operación sobre ellos. Con esta información podrán, posteriormente, realizarse ajustes en diseño, operación y control de estos procesos.

Se requiere el desarrollo de marcadores moleculares para seguir estudiando la dinámica del proceso de oxidación del metano y ver cómo es inhibido por el H₂S en el metabolismo de los metanótrofos, como usar el ¹³C en el caso del metano o ³⁵S para sulfuro de hidrógeno.

Igualmente, en los biofiltros es necesario el estudio de la dinámica poblacional en diferentes puntos de la columna para conocer los cambios dentro del mismo sistema y poder predecir alguna eventual falla; así como realizar un experimento global donde se pueda hacer un análisis de la humedad, temperatura, pH, cantidad de nutrientes en la composta.

La profundización del estudio de las enzimas de los metanótrofos en presencia de H₂S es significativa para avanzar en la comprensión de su funcionamiento y así alcanzar la identificación de las mejores condiciones de trabajo que requiere el ambiente para aumentar su actividad metabólica.

Es necesaria una caracterización adecuada del inóculo con el que se trabaja, mediante estudios de metagenómica, metatranscriptoma o proteómica para conocer cuánto realmente se encuentra funcional la enzima MMO y conocer a más detalle como los diversos factores, como temperatura, humedad, nutrientes, entre otros afectan el funcionamiento de la proteína y no solo que afecte la expresión del conjunto de genes que expresa la enzima MMO.

Las técnicas de Biología Molecular utilizadas actualmente en la evaluación de las comunidades microbiana de biofiltros son útiles porque permiten un bosquejo de la comunidad microbiana. Sin embargo, se necesita un mayor desarrollo de estas técnicas para tener una especificidad y sensibilidad más altas, y así, tener la certeza que los organismos se encuentran

plenamente funcionales en los procesos de oxidación, teniendo una mayor certeza de lo que sucede en el medio durante estos procesos de oxidación biológica y en consecuencia, diseñar alguna estrategia para aumentar la eficiencia de estos procesos. También, es necesario realizar estudios sobre el RNA mensajero y la expresión de las proteínas, debido a que ya existen suficientes marcadores genéticos funcionales para el seguimiento del crecimiento de la población de microorganismos por medio de técnicas de Biología Molecular.

Indiscutiblemente, la investigación alrededor del mundo publicará más detalles que requerirán ser estudiados a profundidad, por lo que siempre es importante la recopilación continua del comportamiento de metanótrofos y sulfooxidantes.

4 Bibliografía

- Abatzoglou, N., Boivin, S., 2009. A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 3, 42–71. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- 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>
- Allen, E.E., Banfield, J.F., 2005. Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 489–498. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1157>
- Andrus, J.M., Porter, M.D., Rodríguez, L.F., Kuehlhorn, T., Cooke, R.A.C., Zhang, Y., Kent, A.D., Zilles, J.L., 2014. Spatial Variation in the Bacterial and Denitrifying Bacterial Community in a Biofilter Treating Subsurface Agricultural Drainage. *Microb. Ecol.* 67, 265–272. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0286-0>
- Apel, W.A., Dugan, P.R., Wiebe, M.R., 1991. Use of methanotrophic bacteria in gas phase bioreactors to abate methane in coal mine atmospheres. *Fuel* 70, 1001–1003.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- 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>
- Baspinar, A.B., Turker, M., Hocalar, A., Ozturk, I., 2011. Biogas desulphurization at technical scale by lithotrophic denitrification: Integration of sulphide and nitrogen removal. *Process Biochem.* 46, 916–922. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.001>
- Bedard, C., Knowles, R., 1989. CO Oxidation by Methanotrophs and Nitrifiers. *Microbiology* 53, 68–84.
- Bodelier, P.L.E., Bär-Gilissen, M.-J., Meima-Franke, M., Hordijk, K., 2011. Structural and functional response of methane-consuming microbial communities to different flooding regimes in riparian soils. *Ecol. Evol.* 2, 106–27. <https://doi.org/10.1002/ece3.34>

- 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)
- Börjesson, G., 2001. Inhibition of methane oxidation by volatile sulfur compounds (CH₃SH and CS₂) in landfill cover soils. *Waste Manag. Res.* 19, 314–319.
- 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>
- Cabrol, L., Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: The case of gas biofiltration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 837–849. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3191-9>
- 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>
- 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>
- Chaiprapat, S., Mardthing, R., Kantachote, D., Karnchanawong, S., 2011. Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. *Process Biochem.* 46, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.007>
- Chen, J., Dick, R., Lin, J.-G., Gu, J.-D., 2016. Current advances in molecular methods for detection of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria in natural environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9845–9860. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7853-5>
- Chen, K.Y., Morris, J.C., 1972. Kinetics of Oxidation of Aqueous Sulfide by O₂. *Environ. Sci. Technol.* 6, 529–537. <https://doi.org/10.1021/es60065a008>
- Cherosky, P., Li, Y., 2013. Hydrogen sulfide removal from biogas by bio-based iron sponge. *Biosyst. Eng.* 114, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.10.010>
- Chong, S., Sen, T.K., Kayaalp, A., Ang, H.M., 2012. The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment - A State-of-the-

art review. *Water Res.* 46, 3434–3470. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.066>

Chowdhury, T.R., Dick, R.P., 2013. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. *Appl. Soil Ecol.* 65, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.014>

Chung, Y.-C., Huang, C., Tseng, C.-P., 1996. Operation optimization of *Thiobacillus thioparus* CH11 biofilter for hydrogen sulfide removal. *J. Biotechnol.* 52, 31–38. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(96\)01622-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(96)01622-7)

Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., R., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni, R.B., Piao, S., Thornton, P., 2013. Carbon and Other Biogeochemical Cycles, *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.015>

Commons, M., 2013. Methanotroph Taxonomy | Methanotroph Commons [WWW Document]. URL <http://www.methanotroph.org/wiki/taxonomy/> (consultado 10.27.17).

CONAGUA, (Comisión Nacional del Agua), 2016. Estadísticas del Agua en México, edición 2016. Publicaciones Estadísticas y Geográficas. SINA 275. <https://doi.org/978-968-817-895-9>

Dahl, C., Friedrich, C., Kletzin, A., 2008a. Sulfur Oxidation in Prokaryotes, en: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021155>

Dahl, C., Friedrich, C., Kletzin, A., 2008b. Sulfur Oxidation in Prokaryotes, en: *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021155>

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>

Diniz Bezerra, T., 2015. Monitorización de la diversidad microbiana en biofiltros percoladores mediante pirosecuenciación tag-454 y optimización de protocolos para hibridación con fluorescencia in situ (FISH). Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.

- Du Plessis, C.A., Strauss, J.M., Seapalo, 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)
- EPA, 2012. Overview of Greenhouse Gases [WWW Document]. Epa. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Espinoza, J., Revah, S., Le Borgne, S., 2010. Rutas Metabólicas De Oxidación Del Azufre En Bacterias Quimiolitotróficas, Relevancia Ambiental Y Biotecnología. *Mensaje Bioquímico XXXIV*, 101–120.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–548. <https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Fajardo, C., Mora, M., Fernández, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R., 2014. Cross effect of temperature, pH and free ammonia on autotrophic denitrification process with sulphide as electron donor. *Chemosphere* 97, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.028>
- 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>
- Forss, J., Lindh, M. V., Pinhassi, J., Welander, U., 2017. Microbial biotreatment of actual textile wastewater in a continuous sequential rice husk biofilter and the microbial community involved. *PLoS One* 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170562>
- 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>
- Fuse, H., Takimura, O., Murakami, K., Inoue, H., Yamaoka, Y., Ohta, M., Oclarit, J.M., Omori, T., 1998. Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine *methylomicrobium* strain containing soluble methane monooxygenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1925–1931.
- Ganendra, G., De Muynck, W., Ho, A., Hoefman, S., De Vos, P., Boeckx, P., Boon, N., 2014.

Atmospheric methane removal by methane-oxidizing bacteria immobilized on porous building materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3791–3800. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5403-y>

Ganendra, G., Mercado-Garcia, D., Hernandez-Sanabria, E., Boeckx, P., Ho, A., Boon, N., 2015. Methane biofiltration using autoclaved aerated concrete as the carrier material. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7307–7320. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6646-6>

Ge, X., Yang, L., Sheets, J.P., Yu, Z., Li, Y., 2014. Biological conversion of methane to liquid fuels: Status and opportunities. *Biotechnol. Adv.* 32, 1460–1475. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.09.004>

Gebert, J., Groenigroeft, A., 2009. Role of Soil Gas Diffusivity for the Microbial Oxidation of Methane in Landfill Covers. XII Int. Waste Manag. Landfill Symp.

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). México.

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/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.011>

González-Sánchez, A., Revah, S., Deshusses, M.A., 2008. Alkaline Biofiltration of H₂S Odors. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7398–7404. <https://doi.org/10.1021/es800437f>

Guerrero, L., Montalvo, S., Huiliñir, C., Campos, J.L., Barahona, A., Borja, R., 2016. Advances in the biological removal of sulphides from aqueous phase in anaerobic processes: A review. *Environ. Rev.* 24, 84–100. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0046>

Hakemian, A.S., Rosenzweig, A.C., 2007a. The Biochemistry of Methane Oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 223–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061505.175355>

Hakemian, A.S., Rosenzweig, A.C., 2007b. The Biochemistry of Methane Oxidation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 223–241. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061505.175355>

Hallam, S.J., 2004. Reverse Methanogenesis: Testing the Hypothesis with Environmental Genomics. *Science* (80-.). 305, 1457–1462. <https://doi.org/10.1126/science.1100025>

- Hanson, R.S., Hanson, T.E., Hanson, R.S., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol.Rev.* 60, 439–471. <https://doi.org/10.1128/mre.60.3.439-471>
- 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>
- Heffernan, B., Blanc, J., Spanjers, H., 2012. Evaluation of greenhouse gas emissions from municipal UASB sewage treatment plants. *J. Integr. Environ. Sci.* 9, 127–137. <https://doi.org/10.1080/1943815X.2012.696546>
- Henckel, T., Friedrich, M., Conrad, R., 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1980–1990.
- Hoefman, S., van der Ha, D., Boon, N., Vandamme, P., De Vos, P., Heylen, K., 2014. Niche differentiation in nitrogen metabolism among methanotrophs within an operational taxonomic unit. *BMC Microbiol.* 14, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-83>
- Hoffmeier, K., 2006. File: Cytochrome c.png - Wikimedia Commons [WWW Document]. URL https://commons.wikimedia.org/wiki/File: Cytochrome_c.png (consultado 6.15.18).
- Hou, C.T., 1984. *Methylootrophs : Microbiology, biochemistry, and genetics*. CRC Pres, Boca Raton, Florida.
- Hou, J., Li, M., Xia, T., Hao, Y., Ding, J., Liu, D., Xi, B., Liu, H., 2016. Simultaneous removal of ammonia and hydrogen sulfide gases using biofilter media from the biodehydration stage and curing stage of composting. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 20628–20636. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7238-4>
- Hu, B., He, Z., Geng, S., Cai, C., Lou, L., Zheng, P., Xu, X., 2014. Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: Impact of reactor configuration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7983–7991. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5835-z>
- Hu, S., Zeng, R.J., Haroon, M.F., Keller, J., Lant, P. a., Tyson, G.W., Yuan, Z., 2015. A laboratory investigation of interactions between denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) and anammox processes in anoxic environments. *Sci. Rep.* 5, 8706. <https://doi.org/10.1038/srep08706>
- Huete, A., de los Cobos-Vasconcelos, D., Gómez-Borraz, T., Morgan-Sagastume, J.M., Noyola,

A., 2017. Control of dissolved CH₄ in a municipal UASB reactor effluent by means of a desorption - Biofiltration arrangement. *J. Environ. Manage.* 1–9. <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. México.

Hutton, W.E., ZoBell, C.E., 1949. The occurrence and characteristics of methane-oxidizing bacteria in marine sediments. *J. Bacteriol.* 58, 463–473.

Jaber, M. Ben, Anet, B., Amrane, A., Couriol, C., Lendormi, T., Cloirec, P. Le, Cogny, G., Fillières, R., 2014. Impact of nutrients supply and pH changes on the elimination of hydrogen sulfide, dimethyl disulfide and ethanethiol by biofiltration. *Chem. Eng. J.* 258, 420–426. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2014.07.085>

Jiang, J., Chan, A., Ali, S., Saha, A., Haushalter, K.J., Lam, W.L.M.R., Glasheen, M., Parker, J., Brenner, M., Mahon, S.B., Patel, H.H., Ambasudhan, R., Lipton, S.A., Pilz, R.B., Boss, G.R., 2016. Hydrogen Sulfide-Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. *Sci. Rep.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep20831>

Jørgensen, P.J., 2009. *Biogas - green energy.*, Second. ed. Digisource Danmark, Viborg, Dinamarca.

Juliarena, P., 2013. Gases de efecto invernadero. ¿Por qué estudiar el metano? [WWW Document]. *Divulg. Univ. UNICEN*. URL <http://www.unicen.edu.ar/content/gases-de-efecto-invernadero-¿por-qué-estudiar-el-metano> (consultado 10.26.17).

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>

Kanjanarong, J., Giri, B.S., Jaisi, D.P., Oliveira, F.R., Boonsawang, P., Chaiprapat, S., Singh, R.S., Balakrishna, A., Khanal, S.K., 2016. Removal of hydrogen sulfide generated during anaerobic treatment of sulfate-laden wastewater using biochar: Evaluation of efficiency and mechanisms. *Bioresour. Technol.* 234, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.009>

Karthikeyan, O.P., Chidambarampadmavathy, K., Nadarajan, S., Heimann, K., 2016. Influence of nutrients on oxidation of low level methane by mixed methanotrophic consortia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4346–4357. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6174-7>

- Kenney, G.E., Sadek, M., Rosenzweig, A.C., 2016. Metallomics Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Metallomics* 8, 801–1024. <https://doi.org/10.1039/C5MT00289C>
- Kightley, D., Nedwell, D.B., Cooper, M., 1995. Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. *Capacity for Methane Oxidation in Landfill Cover Soils Measured in Laboratory-Scale Soil Microcosms* 61, 592–601.
- Kim, H.J., Graham, D.W., DiSpirito, A.A., Alterman, M.A., Galeva, N., Larive, C.K., Asunskis, D., Sherwood, P.M.A., 2004. Methanobactin, a Copper-Acquisition Compound from Methane-Oxidizing Bacteria. *Science* (80-.). 305, 1612–1615. <https://doi.org/10.1126/science.1098322>
- Kim, T.G., Jeong, S.Y., Cho, K.S., 2014. Functional rigidity of a methane biofilter during the temporal microbial succession. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3275–3286. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5371-2>
- Klok, J.B.M., Van Den Bosch, P.L.F., Buisman, C.J.N., Stams, A.J.M., Keesman, K.J., Janssen, A.J.H., 2012. Pathways of sulfide oxidation by haloalkaliphilic bacteria in limited-oxygen gas lift bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7581–7586. <https://doi.org/10.1021/es301480z>
- Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., 2015. Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: Exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *J. Environ. Manage.* 151, 124–31. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.016>
- 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, E.H., Yi, T., Moon, K.E., Park, H., Ryu, H.W., Cho, K.S., 2011. Characterization of methane oxidation by a methanotroph isolated from a landfill cover soil, South Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 753–756. <https://doi.org/10.4014/jmb.1102.01055>
- Lee, J.H., Kim, T.G., Cho, K.S., 2012. Isolation and characterization of a facultative methanotroph degrading malodor-causing volatile sulfur compounds. *J. Hazard. Mater.* 235–236, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.047>
- 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>

- Lee, S.W., Im, J., Dispirito, A.A., Bodrossy, L., Barcelona, M.J., Semrau, J.D., 2009. Effect of nutrient and selective inhibitor amendments on methane oxidation, nitrous oxide production, and key gene presence and expression in landfill cover soils: Characterization of the role of methanotrophs, nitrifiers, and denitrifiers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2238-7>
- Leson, G., Winer, A.M., 1991. Biofiltration: An innovative air pollution control technology for voc emissions. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 41, 1045–1054. <https://doi.org/10.1080/10473289.1991.10466898>
- Li, H., Chi, Z., Lu, W., Wang, H., 2014. Sensitivity of methanotrophic community structure, abundance, and gene expression to CH₄ and O₂ in simulated landfill biocover soil. *Environ. Pollut.* 184, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.002>
- Li, S., Hao, J., Ning, P., Wang, C., Li, K., Tang, L., Sun, X., Zhang, D., Mei, Y., Wang, Y., 2017. Preparation of CuFe nanocomposites loaded diatomite and their excellent performance in simultaneous adsorption/oxidation of hydrogen sulfide and phosphine at low temperature. *Sep. Purif. Technol.* 180, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.02.044>
- Liu, Y., Beer, L.L., Whitman, W.B., 2012. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environ. Microbiol.* 14, 2632–2644. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02783.x>
- Lobato, L.C.S., Chernicharo, C.A.L., Souza, C.L., 2012. Estimates of methane loss and energy recovery potential in anaerobic reactors treating domestic wastewater. *Water Sci. Technol.* 66, 2745–2753. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.514>
- Long, Y., Fang, Y., Shen, D., Feng, H., Chen, T., 2016. Hydrogen sulfide (H₂S) emission control by aerobic sulfate reduction in landfill. *Sci. Rep.* 6, 38103. <https://doi.org/10.1038/srep38103>
- 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>
- López de Heredia, U., 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Nat.* 64, 1–26. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Maanoja, S.T., Rintala, J.A., 2015. Methane oxidation potential of boreal landfill cover materials: The governing factors and enhancement by nutrient manipulation. *Waste Manag.* 46, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.08.011>

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14°. 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>
- Matsuura, N., Hatamoto, M., Sumino, H., Syutsubo, K., Yamaguchi, T., Ohashi, A., 2015. Recovery and biological oxidation of dissolved methane in effluent from UASB treatment of municipal sewage using a two-stage closed downflow hanging sponge system. *J. Environ. Manage.* 151, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.026>
- Matsuura, N., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., Ohashi, A., 2017. Methanotrophic community composition based on pmoA genes in dissolved methane recovery and biological oxidation closed downflow hanging sponge reactors. *Biochem. Eng. J.* 124, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.05.003>
- McDonald, I.R., Bodrossy, L., Chen, Y., Murrell, J.C., 2008. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1305–1315. <https://doi.org/10.1128/AEM.02233-07>
- Meyer, B., Kuever, J., 2007. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using aprA as functional marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7664–7679. <https://doi.org/10.1128/AEM.01272-07>
- Morgan-Sagastume, J.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>

- Namgung, H.K., Ahn, H., Song, J., 2012. Development of a two-phase bioreactor for the biological removal of hydrogen sulfide from biogas. *Energy Procedia* 14, 1143–1148. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.12.887>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger's principles of biochemistry*, Journal of Chemical Information and Modeling. New York. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ng, C.W.W., Xie, M., Leung, A.K., 2016. Removal of hydrogen sulfide using soil amended with ground granulated blast furnace. *J. Environ. Eng. ASCE* 143, 1–8. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001206](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001206).
- Nielsen, A.H., Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T., 2003. Determination of kinetics and stoichiometry of chemical sulfide oxidation in wastewater of sewer networks. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3853–3858. <https://doi.org/10.1021/es034035l>
- NIH, 2015. Secuenciación del ADN - National Human Genome Research Institute (NHGRI) [WWW Document]. *Natl. Hum. Genome Res. Inst.* URL <https://www.genome.gov/27563183/secuenciacion-del-adn/> (consultado 10.30.17).
- 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>
- 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., Morgan, J., Guereca, L., 2013. Selección De Tecnologías Para El Tratamiento De Aguas Residuales Municipales, *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Noyola, A., Padilla-Rivera, A., Morgan-Sagastume, J.M., Güereca, L.P., Hernández-Padilla, F., 2012. Typology of Municipal Wastewater Treatment Technologies in Latin America. *Clean - Soil, Air, Water* 40, 926–932. <https://doi.org/10.1002/clen.201100707>
- 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>

Nyerges, G., Stein, L.Y., 2009. Ammonia cometabolism and product inhibition vary considerably among species of methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 131–136.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01674.x>

Omri, I., Aouidi, F., Bouallagui, H., Godon, J.-J., Hamdi, M., 2013. Performance study of biofilter developed to treat H₂S from wastewater odour. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 169–76.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.01.005>

Ono, K., Akaike, T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D.A., Tantillo, D.J., Hobbs, A.J., Nagy, P., Xian, M., Lin, J., Fukuto, J.M., 2014. Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: Implications of their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 82–94.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.007>

Op den Camp, H.J.M., Islam, T., Stott, M.B., Harhangi, H.R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M.S.M., Birkeland, N.K., Pol, A., Dunfield, P.F., 2009. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 293–306. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x>

Pawłowska, M., Rozej, A., Stepniewski, 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>

Pfiffner, S.M., Palumbo, A. V., Phelps, T.J., Hazen, T.C., 1997. Effects of nutrient dosing on subsurface methanotrophic populations and trichloroethylene degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 204–212. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900350>

Philip, C. V, Brooks, D.W., 1974. Iron(II) Chelate Complexes of Hydrogen Sulfide and Mercaptans in Aqueous Solution 13, 384–386. <https://doi.org/10.1021/ic50132a030>

Pieja, A.J., Sundstrom, E.R., Criddle, C.S., 2011. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6012–6019.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00509-11>

Pirolli, M., da Silva, M.L.B., Mezzari, M.P., Michelon, W., Prandini, J.M., Moreira Soares, H., 2016. Methane production from a field-scale biofilter designed for desulfurization of biogas stream. *J. Environ. Manage.* 177, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.013>

- Pratt, C., Walcroft, A.S., Tate, K.R., Ross, D.J., Roy, R., Reid, M.H., Veiga, P.W., 2012. Biofiltration of methane emissions from a dairy farm effluent pond. *Agric. Ecosyst. Environ.* 152, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.02.011>
- Rabbani, K.A., Charles, W., Kayaalp, A., Cord-Ruwisch, R., Ho, G., 2016. Biofilter for generation of concentrated sulphuric acid from H₂S. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 16781–16789. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6858-z>
- Rands, M.B., Cooper, D.E., Woo, C., Fletcher, G.C., Rolfe, K.A., Rands, M.B., Cooper, D.E., Woo, C., Fletcher, G.C., Rolfe, K.A., 1981. Compost filters for H₂S removal. *Water Pollut. Control Fed.* 53, 185–189.
- Reddy, K.R., Asce, F., Yargicoglu, E.N., Asce, S.M., Yue, D., Yaghoubi, P., 2014. Enhanced Microbial Methane Oxidation in Land fill Cover Soil Amended with Biochar. *J. Geotech. Geoenvironmental Eng.* Volume 140, 1–11. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)GT.1943-5606.0001148](https://doi.org/10.1061/(ASCE)GT.1943-5606.0001148).
- Rehder, D., 2014. *Bioinorganic Chemistry*, 1a ed. Oxford, University Press, Oxford.
- Ro, S.Y., Ross, M.O., Deng, Y.W., Batelu, S., Lawton, T.J., Hurley, J.D., Stemmler, T.L., Hoffman, B.M., Rosenzweig, A.C., 2018. From micelles to bicelles: Effect of the membrane on particulate methane monooxygenase activity. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.2210/PDB6CXH/PDB>
- Roman, P., Lipińska, J., Bijmans, M.F.M., Sorokin, D.Y., Keesman, K.J., Janssen, A.J.H., 2016. Inhibition of a biological sulfide oxidation under haloalkaline conditions by thiols and diorgano polysulfanes. *Water Res.* 101, 448–456. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.003>
- Romero Cabello, R., 2007. *Microbiología y parasitología humana*, 3a ed. Ed. Médica Panamericana.
- 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. México.
- Sanchez Rodriguez, A.D., 2015. *Biofiltración de metano y sulfuro de hidrógeno de biogás diluido*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.

- Scheller, S., Yu, H., Chadwick, G.L., McGlynn, S.E., Orphan, V.J., 2016. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction. *Science* (80-.). 351, 703–707. <https://doi.org/10.1126/science.aad7154>
- SEMARNAT, 2013. Aguas residuales [WWW Document]. *El Medio Ambient. en México 2013-2014*. URL http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html (consultado 5.30.18).
- Semrau, J.D., Dispirito, A.A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 496–531. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>
- 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
- SIGMA-ALDRICH, 2017. MSDS - 295442 (Sulfuro de hidrógeno) [WWW Document]. URL <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/295442> (consultado 10.27.17).
- SIGMA-ALDRICH, 2016. MSDS - 295477 (Metano) [WWW Document]. URL <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/295477?lang=es> (consultado 10.26.17).
- Sly, L.I., Bryant, L.J., Cox, J.M., Anderson, J.M., 1993. Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 400–404. <https://doi.org/10.1007/BF00192101>
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Aquino, S.F., 2011. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Sci. Technol.* 64, 2259–2264. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.695>
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Melo, G.C.B., 2012. Methane and hydrogen sulfide emissions in UASB reactors treating domestic wastewater. *Water Sci. Technol.* 65, 1229–1237. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.854>
- Su, J.-J., Chang, Y.-C., Chen, Y.-J., Chang, K.-C., Lee, S.-Y., 2013. Hydrogen sulfide removal from livestock biogas by a farm-scale bio-filter desulfurization system. *Water Sci. Technol.* 67, 1288. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.696>
- Syed, R., Saggar, S., Tate, K., Rehm, B.H.A., 2016. Assessment of farm soil, biochar, compost and weathered pine mulch to mitigate methane emissions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9365–9379. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7794-z>

- Szabo, C., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., Coletta, C., Olah, G., Yanagi, K., Bouillaud, F., 2014. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2099–2122. <https://doi.org/10.1111/bph.12369>
- Talaiekhosravi, A., Bagheri, M., Goli, A., Talaei Khoosravi, M.R., 2016. An overview of principles of odor production, emission, and control methods in wastewater collection and treatment systems. *J. Environ. Manage.* 170, 186–206. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.021>
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M.F., Massé, D.I., 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Res.* 42, 513–537. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.003>
- Tourova, T.P., Slobodova, N. V., Bumazhkin, B.K., Kolganova, T. V., Muyzer, G., Sorokin, D.Y., 2013. Analysis of community composition of sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline and soda lakes using *sox B* as a functional molecular marker. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84, 280–289. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12056>
- Trabajo, I.N. de S. e Hi. en el, 2011. Sulfuro de hidrógeno. Documentación Limites de Exposición Profesional.
- 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>
- van Groenestijn, J.W., Hesselink, P.G.M., 1993. Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation* 4, 283–301. <https://doi.org/10.1007/BF00695975>
- van Haandel, A., Kato, M.T., Cavalcanti, P.F.F., Florencio, L., 2006. Anaerobic Reactor Design Concepts for the Treatment of Domestic Wastewater. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 5, 21–38. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-4888-y>
- Vekeman, B., Dumolin, C., de Vos, P., Heylen, K., 2016. Improved enrichment culture technique for methane-oxidizing bacteria from marine ecosystems: the effect of adhesion material and gas composition. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 110, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0787-1>
- Vital-López, L., Cruz-Hernández, M., Fernández-Dávila, S., Mendoza-Herrera, A., 2016. Bacterial diversity in the rhizosphere of a transgenic versus a conventional maize (*Zea mays*). *Phyton, Int. J. Exp. Bot.* 85, 210–217.
- Vogels, G.D., 1979. The global cycle of methane. *Antonie Van Leeuwenhoek* 45, 347–352.

- Wang, W., Liang, A.D., Lippard, S.J., 2015. Coupling Oxygen Consumption with Hydrocarbon Oxidation in Bacterial Multicomponent Monooxygenases. *Acc. Chem. Res.* 48, 2632–2639. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00312>
- Whittington, D.A., Lippard, S.J., 2001. Crystal structures of the soluble methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) demonstrating geometrical variability at the dinuclear iron active site. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 827–838. <https://doi.org/10.2210/PDB1FZ1/PDB>
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–90.
- Wu, Y., Yang, J., Fan, X., Fu, S., Sun, M., Guo, R., 2017. Elimination of methane in exhaust gas from biogas upgrading process by immobilized methane-oxidizing bacteria. *Bioresour. Technol.* 231, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.020>
- Yang, Y., Allen, E.R., 1994. Biofiltration Control of Hydrogen Sulfide 1. Design and Operational Parameters. *Air Waste* 44, 863–868. <https://doi.org/10.1080/1073161X.1994.10467287>
- Yu, H.X., Min, H., Lv, Z.M., Liu, J., 2009. Influence of poisonous gases on the bio-oxidation of coalmine gas. *Int. J. Mining, Reclam. Environ.* 23, 121–131. <https://doi.org/10.1080/17480930802273764>
- Zahn, J.A., Bergmann, D.J., Boyd, J.M., Kunz, R.C., DiSpirito, A.A., 2001. Membrane-associated quinoprotein formaldehyde dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *J. Bacteriol.* 183, 6832–6840. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6832-6840.2001>
- 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>
- Zhang, Z., Jiang, W., Long, D., Wang, J., Qiao, W., Ling, L., 2017. A general silica-templating synthesis of alkaline mesoporous carbon catalysts for highly efficient H₂S oxidation at room temperature. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 2477–2484. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b13597>