



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE POBLACIONES
MICROBIANAS EN REACTORES DE
BIOPELÍCULA ANAEROBIA PARA
LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS”.

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

PRESENTA:

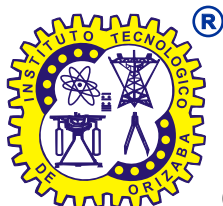
I.Q. Inés Adriana Juárez García

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Alvarado Lassman



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MAYO 2022

Orizaba, Veracruz **19/mayo/2022**
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación
Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. INÉS ADRIANA JUÁREZ GARCÍA
Candidato a Grado de Maestro en:
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE POBLACIONES MICROBIANAS EN REACTORES DE BIOPELÍCULA ANAEROBIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS".

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

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




Dr. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OG-13-F06



Orizaba, Veracruz, **04/abril/2022**
Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

C. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

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

INÉS ADRIANA JUÁREZ GARCÍA

La cual lleva el título de:

Análisis de la dinámica de poblaciones microbianas en reactores de biopelícula anaerobia para la producción de biogás.

Y concluyen que se acepta.


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


PRESIDENTE: DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA


SECRETARIO: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN


VOCAL: MIQ NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ

VOCAL SUP.: DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA



E.R.M.


A.A.L.


M.N.A.V.C.


O.L.E.

TA-09-21



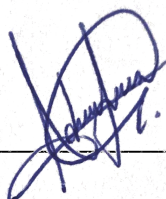
Declaración

Yo, Inés Adriana Juárez García, certifico que esta tesis, que tiene una extensión de 127 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza y Dr. Alejandro Alvarado Lassman y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Fui admitido como estudiante de la maestría en Enero 2020 y mi trabajo de tesis fue liberado para su impresión el 19 de Mayo de 2022.

También declaro que, al presentar esta tesis, el Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Orizaba tiene permiso para publicarla en formato electrónico bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

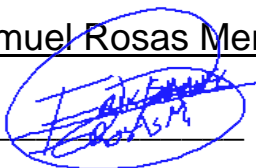
Fecha: 19 de mayo de 2022 Firma: _____



Vo. Bo.

Asesor: Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Firma del asesor: _____



DEDICATORIAS

A Dios, por su infinito amor y brindarme en cada momento de mi vida las herramientas para no tener miedo y superar cada etapa de mi vida. No me alcanzan las páginas de esta tesis para hacerte justicia por todo lo bondadoso que has sido conmigo.

A mis padres, les dedico esta tesis fruto de la educación que me han brindado durante mi vida, por la confianza y motivación puesta en mí, por dejarme ser libre de elegir, y por siempre estar para mí. Gracias por ser unos excelentes padres.

A mis hermanas, Karen y Lupita, gracias por ser mis compañeras de vida, les dedico este trabajo, en agradecimiento por la paciencia que me tuvieron durante todo este proceso. A mi abuelita Inés por todo su amor.

A mis amigos Marco, Fede, Héctor, y Adolfo hicieron que me ingreso a la maestría fuera muy agradable, así como también me motivaron en cada etapa.

A mi mejor amiga Jessica te dedico esta tesis esperando devolverle un pedacito de todo lo que me ha apoyado durante nuestra formación profesional.

A mi gran amigo Uriel en agradecimiento de todo el apoyo que me ha dado a pesar de la distancia.

A mis amigos de laboratorio: Diana por ser mi equipo desde el principio de esta aventura; Lily y Alexa por su amistad incondicional y mis confidentes haciendo divertidas todas las horas de trabajo. A Francisco, por su infinita paciencia transmitiéndome su conocimiento, y siendo mi soporte en el laboratorio durante mi estancia externa. A Joaquín, Israel, y Pablo por la disponibilidad y apoyo cuando lo necesite. Y a mis amigos Alfredo, Lute, Jessi M, y Karen, por acompañarme y hacer de esta etapa una de las mejores. A todos y cada uno de ellos gracias por estar en esta etapa.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza, primero por invitarme a la maestría y motivarme. Segundo por sus enseñanzas, apoyo y paciencia, con la dirección de esta investigación. Finalmente, no solo por el gran profesional e investigador que es, sino por la excelente persona y amigo que ha sido durante este proceso. De corazón gracias por la confianza puesta en mí para llevar a cabo esta investigación.

A la Mtra. Norma Vallejo y el Dr. Alejandro Alvarado, por ser un gran equipo de investigadores, y brindarme las facilidades desde el principio con las instalaciones del laboratorio, así como sus correcciones y enseñanzas.

A la Dra. Ofelia Landeta, por ser una excelente profesora, por sus comentarios y asesorías, así como la gran disposición de apoyo en cada situación presentada en el trayecto.

Al Dr. Raúl Snell Castro, por el tiempo de enseñanza que me brindó, por guiarme en cada duda, y por abrirme las puertas del laboratorio con esa confianza, que hicieron posible la culminación de esta investigación, lo respeto y admiro.

Agradezco al Maestro Luis Briseño por su tiempo, apoyo y paciencia durante mi estancia en la Universidad de Guadalajara.

Al Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, por recibirme durante mi estancia y hacer uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología gracias por concederme la beca con No. 1032605 para conseguir el grado académico de Maestría y obtener los productos:

- Bioenergy potential from agroindustrial wastes of the state of Veracruz. Publicado en Renewable Energy, Biomass & Sustainability. Noviembre 2020.
- Assessment of bioenergy potential from agroindustrial wastes using anaerobic digestion. A case study. CIGR International Conference 2021. May 11-14, 2021.
- Monitoreo de un reactor de biopelícula para la producción de bioenergéticos. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. Octubre 2021.
- Desarrollo de la biopelícula durante el arranque de un reactor anaerobio híbrido. Congreso Internacional de Desarrollo Sustentable y Energías Renovables. Noviembre 2021.

RESUMEN

Análisis de la dinámica de poblaciones microbianas en reactores de biopelícula anaerobia para la producción de biogás

Elaborada por: I.Q. Inés Adriana Juárez García

Dirigida por: Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Actualmente, el estudio de la dinámica microbiana ofrece un panorama general de la digestión anaerobia que permite conocer el comportamiento de los microorganismos frente a cambios operativos. Estos estudios se han realizado en reactores de lodo granular, sin embargo, los reactores de biopelícula ofrecen una mejor eficiencia en el proceso de producción de biogás, ya que poseen una mayor área de contacto entre el sustrato y la biomasa que les permite tratar efluentes con altas cargas orgánicas. En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo analizar la dinámica de poblaciones microbianas sometidas a cambios operativos en reactores de biopelícula para la producción de biogás durante la digestión anaerobia de la fracción líquida de residuos sólidos orgánicos. Se utilizó un reactor de biopelícula llamado Reactor Anaerobio Híbrido (RAH), con 1.5 L de Extendsphere™ colonizado como inóculo, con volumen útil del RAH de 2.5 L, operado a temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y pH de 6.8-7.2. El RAH operó en cuatro etapas cada una con una Cva diferente, E1=5-8 gDQO/L•d, E2=7-8 gDQO/L•d, E3= 15-16 gDQO/L•d y E4= 20-21 gDQO/L•d. Se monitoreó el proceso en el influente y efluente del RAH por medio de pH, DQO_T, DQO_S SST, SSV, alcalinidad y AGV's. La caracterización de las comunidades microbianas se realizó tomando muestras de la biopelícula y por medio de extracción de ADN_g y Secuenciación Genética Masiva se determinaron las poblaciones microbianas presentes. La producción de biogás y el rendimiento de metano se analizaron por cromatografía de gases. Finalmente, se correlacionaron todas las variables del sistema mediante el Análisis de Componente Principales. Se alcanzaron remociones de DQO y sólidos mayores al 90%, así como la colonización del soporte supero el 80%. Se obtuvieron aproximadamente 20 L biogás con un rendimiento de metano alrededor de 0.33 LCH₄/gDQO_{rem}. Se encontraron más de 2000 OTUs diferentes tanto de *Archaea*

y Bacteria, siendo las bacterias las más diversas. La principal vía de producción de metano fue por el consumo de acetato, sin embargo, debido a la presencia de grupos tróficos de fermentadores e hidrogenótrofos, se asume que hubo producción de hidrógeno que fue consumido para producir metano y contribuir principalmente en la composición del biogás. La variación de la Cva en el RAH provocó la competencia de los diferentes grupos de microorganismos por el consumo de sustratos, la adaptabilidad y la resistencia. El análisis permitió conocer las ventajas del RAH y las áreas de oportunidad para optimizar el proceso.

ABSTRACT

Analysis of the dynamics of microbial populations in anaerobic biofilm reactors for biogas production

By: I.Q. Inés Adriana Juárez García

Advisor(s): Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Currently, the study of microbial dynamics offers a general overview of anaerobic digestion that allows understanding the behavior of microorganisms in the face of operational changes. These studies have been carried out in granular sludge reactors, however, biofilm reactors offer a better efficiency in the biogas production process, since they have a larger contact area between the substrate and the biomass that allows them to treat effluents with high organic loads. In this context, the present research aims to analyze the dynamics of microbial populations subjected to operational changes in biofilm reactors for biogas production during the anaerobic digestion of the liquid fraction of organic solid waste. A biofilm reactor called Anaerobic Hybrid Reactor (AHR) was used, with 1.5 L of colonized Extendsphere™ as inoculum, with useful volume of the HAR of 2.5 L, operated at temperature of $35\pm 2^\circ\text{C}$ and pH of 6.8-7.2. The RAH operated in four Stages each with a different Cva, E1=5-8 gCOD/L-d, E2=7-8 gCOD/L-d, E3= 15-16 gCOD/L-d and E4= 20-21 gCOD/L-d. The process was monitored in the influent and effluent of the RAH by means of pH, τCOD , $s\text{COD}$, TSS, VSS, alkalinity and VFA's. The characterization of the microbial communities was carried out by taking samples of the biofilm and by means of gDNA extraction and Massive Genetic Sequencing the microbial populations present were determined. Biogas production and methane yield were analyzed by gas chromatography. Finally, all system variables were correlated by Principal Component Analysis. COD and solids removals greater than 90% were achieved, and the colonization of the support exceeded 80%. Approximately 20 L biogas were obtained with a methane yield around $0.33 \text{ LCH}_4/\text{gCOD}_{\text{rem}}$. More than 2,000 different OTUs of both Archaea and Bacteria were found, with Bacteria being the most diverse. The main pathway of methane

production was by acetate consumption, however, due to the presence of trophic groups of fermenters and hydrogenotrophs, it is assumed that there was hydrogen production that was consumed to produce methane and contribute mainly in the biogas composition. The variation of OLR in the AHR led to competition of different groups of microorganisms for substrate consumption, adaptability, and resistance. The analysis provided insight into the advantages of the AHR and areas of opportunity to optimize the process

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
NOMENCLATURA	xiv
INTRODUCCIÓN	15
OBJETIVO.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
1.1 Producción de biogás en México	19
1.1.1 Perspectivas de la producción de biogás en México.....	19
1.2 Poder calorífico y calidad del biogás	20
1.3 Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos como sustrato para la producción de biogás.....	21
1.4 Proceso de producción de biogás: digestión anaerobia	23
1.4.1 Etapas de la digestión anaerobia	23
1.5 Microorganismos presentes en el proceso de digestión anaerobia	25
1.5.1 Diferencias entre <i>Archaeas</i> y Bacterias	29
1.6 Parámetros de control del proceso de DA	30
1.7 Tecnología de alta carga en digestión anaerobia	32
1.7.1 Reactores UASB	32
1.7.2 Reactores de lecho de lodo granular expandido (EGSB).....	32
1.7.3 Reactores de biopelícula.....	33

1.8 Eficiencia del proceso de producción de biogás	34
1.9 Técnicas de biología molecular para el análisis de poblaciones microbianas .	35
1.9.1 Reacción en cadena Polimerasa (PCR)	36
1.9.2 Secuenciación de próxima generación (NGS)	38
1.10 Antecedentes y avances	39
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.1 Metodología general	46
2.2 Recolección de sustrato	47
2.3 Obtención de inóculo	47
2.4 Operación del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)	47
2.4.1. Etapas de la operación continua del RAH	49
2.5 Monitoreo del proceso	50
2.5.1 Determinaciones analíticas	50
2.5.2 Análisis físico de la biopelícula	54
2.5.3 Caracterización de las comunidades microbianas	54
2.6 Correlación de la dinámica microbiana con las variables operativas	60
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1 Caracterización del sustrato	62
3.2 Caracterización del inóculo	63
3.3 Montaje y mantenimiento del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)	64
3.4 Operación continua del Reactor Anaerobio Híbrido	66
3.4.1 Relación Sustrato-Biomasa	66

3.4.2 Comportamiento del potencial de hidrógeno	67
3.4.3 Remoción de la Demanda Química de Oxígeno	68
3.4.3 Remoción de Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Suspendidos Volátiles	70
3.4.4. Alcalinidad del proceso de DA	71
3.4.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's) en el proceso	72
3.4.6. Producción de Biogás y rendimiento de metano	74
3.5. Desarrollo de la biopelícula en el RAH	76
3.6. Extracción y cuantificación del ADNg	80
3.6.1. Integridad del ADN genómico	80
3.6.2. Cantidad y pureza del ADNg extraído	81
3.7. Caracterización de la comunidad microbiana por secuenciación genética masiva	83
3.7.1 Dinámica poblacional de la comunidad <i>Archaea</i>	83
3.7.2 Dinámica poblacional de la comunidad Bacteria	86
CONCLUSIONES.....	97
RECOMENDACIONES	99
ANEXO A. Protocolo para la colecta y conservación de muestras destinadas a la extracción de ácidos nucleicos.....	100
ANEXO B Protocolo para la extracción, purificación, visualización y cuantificación de ADN (BIOMOL-1.1 Lodos anaerobios granulares	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.1	Panorama de producción de biogás 2024-2030 en México.	20
1.2	Diagrama general de microorganismos, productos y subproductos en la digestión anaerobia, por cada etapa.	28
1.3	Ubicación de las Bacterias, Archaeas y Eucarias en el árbol filogenético de la vida.	30
1.4	Presentación esquemática del principio de la reacción en cadena de la polimerasa.	37
2.1	Metodología de la presente investigación	46
2.2	Diagrama del RAH.	48
3.1	Biopelícula formada en soporte extenosphere, en la etapa inicial del proceso (a) Superior (b) Media (c) inferior.	64
3.2	Lecho Fijo del RAH.	65
3.3	Lecho Fluidizado del RAH.	65
3.4	Monitoreo del pH en la entrada, salida e interior, durante la operación del RAH.	68
3.5	Porcentajes de remoción de la DQO_T y DQO_s , durante la operación del RAH.	69
3.6	Porcentajes de remoción de SST y SSV, durante la operación del RAH.	70
3.7	Factor de alcalinidad por etapas de operación.	71
3.8	AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 2.	73
3.9	AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 3.	73
3.10	AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 4.	74
3.11	Cva alimentada al RAH y su producción de biogás, por etapas de operación.	75

Figura	Descripción	Página
3.12	Cva alimentada al RAH y el rendimiento de metano, por etapas de operación.	75
3.13	Desarrollo de la biopelícula durante la operación del RAH.	79
3.14	Visualización del ADN genómico extraído de las muestras de biomasa del reactor híbrido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %.	80
3.15	Abundancia relativa de la comunidad Archaea en el lecho fijo del RAH.	84
3.16	Abundancia Relativa por grupos tróficos de Archaea en el lecho fijo del RAH.	85
3.17	Abundancia relativa de la comunidad Archaea en el soporte fluidizado.	85
3.18	Abundancia Relativa por grupos tróficos de Archaea en el soporte fluidizado del RAH	86
3.19	Abundancia relativa de la comunidad Bacteria en el lecho fijo del RAH.	87
3.20	Abundancia Relativa por grupos tróficos de Bacteria en el lecho fijo del RAH.	88
3.21	Abundancia relativa de la comunidad Bacteria en el soporte fluidizado del RAH.	89
3.22	Abundancia Relativa por grupos tróficos de Bacteria en el soporte fluidizado del RAH.	89
3.23	Gráfico de selección de componentes principales basado en eigenvalores.	92
3.24	Correlación de las variables operativas, fisicoquímicas y biológicas del proceso de digestión anaerobia	94

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1.1	Composición típica del biogás.	21
1.2	Evolución del estado del arte empleando diferentes parámetros. para el análisis de poblaciones microbianas en el proceso de DA.	43
2.1	Duración de las etapas de operación del RAH.	50
2.2	Determinaciones analíticas del proceso de digestión anaerobia.	50
2.3	Muestreo para análisis de dinámica microbiana.	55
2.4	Clasificación de las muestras conservadas de biomasa.	57
3.1	Caracterización de la FLRSO vs otros autores.	62
3.2	Materia Volátil Adherida al soporte	63
3.3	Dimensiones para el lecho fijo del RAH.	64
3.4	Dimensiones para el lucho fluidizado inverso del RAH.	65
3.5	Relación Sustrato/Biomasa	66
3.6	Desarrollo de la biopelícula en el LFI.	77
3.7	Concentración del ADN extraído a 260 nm y pureza obtenida mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm.	82
3.8	Diseño de individuos y variables para el ACP.	91
3.9	Varianza de las componentes en el ACP.	92
3.10	Peso de las componentes 1 y 2 para cada variable.	93

NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
ADNg	Ácido Desoxirribonucleico Genómico
BaU	Business As Usual o Negocios Como Siempre
Cva	Carga Orgánica o Carga Volumétrica Aplicada
DA	Digestión Anaerobia
DQOs	Demanda Química de Oxígeno Soluble
DQO _T	Demanda Química de Oxígeno Total
EGSB	Reactores de lecho de lodo granular expandido
FLRSO	Fracción Líquida de Residuos Sólidos Orgánicos
GWhe	Gigawatt-hora eléctrico = 10 ⁶ kWhe
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Mdp	Millones de pesos
MVA	Materia Volátil Adherida
NGS	Secuenciación de Próxima Generación
PCR	Reacción en Cadena Polimerasa
RAH	Reactor Anaerobio Híbrido
RLFI	Reactor de Lecho Fluidizado Inverso
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulica
UASB	Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente y Manto de Lodos
YCH ₄	Rendimiento de Metano

INTRODUCCIÓN

El proceso de Digestión Anaerobia (DA) tiene más de un siglo de práctica y recientemente se ha utilizado como estrategia de aprovechamiento de desechos orgánicos, ayudando a disminuir las emisiones de gases que agotan la capa de ozono abordando el carbono de los residuos para convertirlo en biogás (Horan, 2018). La DA se lleva a cabo en una serie de etapas realizadas por comunidades microbianas (Corrales *et al.*, 2015), considera vital la composición del material a utilizar como sustrato, ya que da los complementos a la digestión de los microorganismos en cuestión y tiene una influencia directa en la generación de biogás (Wid y Horan, 2018).

En la Ciudad de Orizaba, Veracruz, el Mercado Municipal Emiliano Zapata es un generador de Residuos Sólidos Urbanos (RSU). La composición que presentan los RSU consta de 84.17 % de fracción orgánica de origen agrícola (residuos de frutas, verduras, leguminosas, tubérculos, cítricos, etc.) y el restante 15.83 % lo ocupan los residuos sólidos inorgánicos y residuos sólidos orgánicos de difícil biodegradabilidad (Apanco-Rosas, 2018). Esta fracción orgánica posee un alto contenido de humedad por lo que resulta ventajoso separar mecánicamente estos en dos fracciones líquida y sólida mediante pretratamiento para aprovechar adecuadamente todo el residuo (Alvarado-Lassman *et al.*, 2016).

La fracción líquida puede valorizarse a través del proceso de DA, por lo que surge la necesidad de utilizar tecnologías que unan una alta competencia de tratamiento con bajos costos de desarrollo y soporte (Lettinga *et al.*, 1983). Los principales tipos de reactores de alta carga son: Reactores UASB (reactor anaerobio de flujo ascendente y manto de lodos), Reactores EGSB (reactor de lecho de lodo granular expandido) y Reactores de biopelícula (Lorenzo y Obaya, 2005; Deng *et al.*, 2020).

Los procesos basados en biopelículas se han situado como una decisión valiosa para la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) y nutrientes sin varias de las restricciones de los procesos de lodos activados (Zinatizadeh y Ghaytooli, 2015). Las biopelículas son intrincadas redes microbianas que incorporan y descargan un marco

defensivo que adhiere firmemente la biopelícula a una superficie biótica o abiótica (Phillips *et al.*, 2010). Actualmente, en la DA se ha utilizado Extendsphere™ como superficie abiótica o soporte para la adhesión de la biopelícula.

Por otro lado, el biogás es el producto generado por la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el proceso de DA, resulta importante evaluar dicha actividad en las diferentes etapas del proceso cuando se presentan cambios en las variables operativas de los reactores anaerobios, como la carga volumétrica aplicada (Cva), ya que esta variable operativa es la alimentación de los microorganismos, y tiene una influencia significativa en el rendimiento del metano (CH₄) (Lebuhn *et al.*, 2015).

El estudio de la dinámica y composición de los microorganismos contribuyen a obtener el máximo rendimiento de metano y por tanto un mayor aporte energético, sin embargo para obtener información viable sobre los microorganismos, es necesario la aplicación de técnicas de biología molecular como la secuenciación genética masiva (NGS) (Lebuhn *et al.*, 2015). En este contexto, la presente investigación exhibe la necesidad de realizar un estudio sobre la dinámica microbiana y la correlación de las variables del proceso en reactores de biopelícula que manejan altas cargas orgánicas, para así reducir la brecha del conocimiento.

El objetivo de esta investigación es realizar el análisis de la dinámica de poblaciones microbianas durante la DA de la fracción líquida de RSO de frutas y vegetales, para el aprovechamiento adecuado de la materia orgánica y la mejora del rendimiento de CH₄.

OBJETIVO

Analizar la dinámica de poblaciones microbianas sometidas a cambios operativos en reactores de biopelícula, para la producción de biogás durante la digestión anaerobia de la fracción líquida de residuos sólidos orgánicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Acondicionar, arrancar y estabilizar un reactor anaerobio para el desarrollo óptimo de la biopelícula.
2. Modificar las condiciones de operación del reactor anaerobio a través del cambio de composición de sustrato y carga orgánica.
3. Realizar la caracterización de la composición de las comunidades microbianas metanogénicas presentes del reactor anaerobio de biopelícula mediante el análisis de ADN genómico.
4. Correlacionar las variables microbianas, fisicoquímicas y operacionales para interpretar el desempeño del reactor anaerobio de biopelícula.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Producción de biogás en México

Las principales fuentes de energía empleadas en México se derivan de recursos no renovables como los hidrocarburos, lo que, junto con el aumento de la población, la urbanización continua, la utilización de combustibles fósiles se vuelve excesiva, y esto ha generado graves problemas ambientales. Por lo que es necesario desarrollar estrategias para aumentar el uso de fuentes de energía renovables, como el biogás (Díaz y Nápoles, 2019).

La producción de biogás ha demostrado ser una forma viable de sustituir parcialmente los combustibles fósiles, ya que el uso de biogás tiene importantes beneficios económicos, ambientales y sociales (Garbs y Geldermann, 2018), se informa que de acuerdo con el Balance Nacional de Energía para el 2018 el biogás contribuyó con 2.84 PJ y fue destinado para la generación de energía eléctrica (SENER, 2018).

1.1.1 Perspectivas de la producción de biogás en México

A pesar de los nuevos avances en el uso de energías limpias, la bioenergía y el biogás se han quedado atrás en cuanto a las perspectivas de energía ecológica (Weber *et al.*, 2012). Últimamente, en México se han suministrado aproximadamente 114 millones de m³/año de biogás con una potencia de 109 GWhe/año, lo que supone una pequeña parte del objetivo de energía limpia para 2024 de unos 112.000 GWhe/año (Gutiérrez, 2018).

De acuerdo con Gutierrez (2018), en el documento titulado “Situación actual y escenarios para el desarrollo del biogás en México hacia 2024 y 2030” la Figura 1.1 muestra una correlación de situaciones de producción de biogás BaU (Business of course, latest things), de infiltración media y de entrada alta para 2024 y 2030 en México.

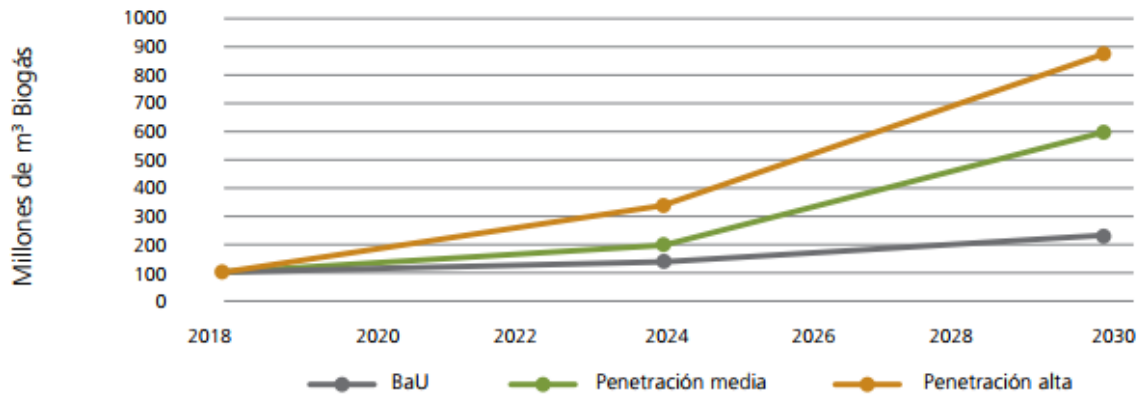


Figura 1.1. Panorama de producción de biogás 2024-2030 en México (Gutierrez, 2018)

Es factible llegar a una producción y uso de biogás de aproximadamente 200 millones de m³ a 350 millones de m³ en 2024 y entre 600 millones de m³ y 900 millones de m³ en 2030. Según estos datos es factible prácticamente cuadruplicar el patrón de producción de biogás con un gasto financiero normal de 460 mdp/año en 2024 y alrededor de 930 mdp/año en 2030 (Gutiérrez, 2018; Weber *et al.*, 2012).

1.2 Poder calorífico y calidad del biogás

El biogás es un producto derivado de la Digestión Anaerobia (DA) de Residuos Sólidos Orgánicos (RSO) y aguas residuales, que se compone principalmente de metano (CH₄) entre 50 % y 75 % y el resto de su composición se observa en Tabla 1.1 (Deng *et al.*, 2020). Cabe destacar que exclusivamente el CH₄ aporta energía al biogás, lo que se refleja en el poder calorífico de 1 m³ de biogás que con un 60 % de CH₄, tiene 21.5 MJ (5.97 kWh de electricidad), así como si se tiene únicamente 1 m³ de CH₄ el poder calorífico es de 35.8 MJ (9.94 kWh de electricidad), estos datos referidos a condiciones de temperatura y presión estándar (Vega y Ramírez, 2014).

Tabla 1.1 Composición típica del biogás (Deng *et al.*, 2020)

Componente	Volumen (%)
Metano	50-75
Dióxido de carbono	25-50
Nitrógeno	0-4
Oxígeno	0-3
Sulfuro de hidrógeno	0.03-0.5
Hidrógeno	2-7

La generación de biogás se realiza en un reactor anaerobio, y después de salir del reactor, presenta saturación por el vapor de agua, lo que en consecuencia disminuye el poder calorífico. Dependiendo de la temperatura de operación del digestor, la cantidad de vapor de agua puede llegar a ser hasta del 6 %, por lo que el valor calorífico del biogás in situ es hasta un 15 % menor no se determina en el centro de investigación (Weber *et al.*, 2012).

1.3 Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos como sustrato para la producción de biogás

La producción de biogás es el resultado de una serie de procesos que se realizan en condiciones anaerobias por consorcios de microorganismos (Vega y Ramírez, 2014), por lo que es muy importante considerar la composición del material a utilizar como insumo, ya que éste da los complementos a la digestión de los microorganismos en cuestión y tiene una influencia directa en la producción de biogás (Wid y Horan, 2018).

Los sustratos actualmente utilizados en este proceso comprenden los campos de cultivos energéticos: residuos agrícolas, residuos orgánicos secundarios derivados de procesos industriales, desechos sólidos y aguas residuales. Los residuos de origen agrícola por su naturaleza se generan en el campo, lo que favorece en muchas ocasiones su procesamiento en digestores a pequeña escala (Weber *et al.*, 2012).

Sin embargo, en zonas urbanas mediante el comercio de verduras y frutas en los mercados, se generan gran cantidad de residuos agrícolas con un alto contenido en agua y materia orgánica, que se identifican como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU) (Alvarado-Lassman *et al.*, 2016).

En la Ciudad de Orizaba, Veracruz, el Mercado “Zapata” es una de las principales zonas de generación de este tipo de residuos. La composición que presentan los RSU consta de 84.17 % de fracción orgánica de origen agrícola (residuos de frutas, verduras, leguminosas, tubérculos, cítricos, etc.) y el restante 15.83 % lo ocupan los residuos sólidos inorgánicos y residuos sólidos orgánicos de difícil biodegradabilidad (Apanco-Rosas, 2018).

Esta fracción orgánica de los RSU posee una extensa gama de tamaños de partículas, y es ser preciso aplicar un pretratamiento mecánico previo a la digestión anaerobia. Los pretratamientos mecánicos se realizan, con el objetivo de mejorar la degradación de la materia orgánica biodegradable mediante la actividad de los microorganismos, de tal forma que aumente la superficie y reduzca la cristalinidad de la celulosa, lo que produce que se hidrolicen los azúcares monoméricos en menor tiempo (Mlaik *et al.*, 2017; Ariunbaatar *et al.*, 2014).

Por lo tanto, el alto contenido de líquido en la fracción orgánica de los RSU hace que sea conveniente separar mecánicamente estos desechos en fracciones mayoritariamente líquidas y sólidas mediante pretratamiento (Alvarado-Lassman *et al.*, 2016). La separación se lleva a cabo en una serie de pasos que incluyen: 1) La separación manual de los residuos inorgánicos u orgánicos con biodegradabilidad compleja de la fracción orgánica aprovechable es decir los residuos de origen agrícola, 2) Una reducción de tamaño por trituración en molino, 3) La dilución 1:1 de la materia orgánica y 4) Una filtración para separar la parte orgánica sólida y obtener así una fracción líquida (Apanco-Rosas, 2018).

Esta separación y el procesamiento individual de la fracción líquida de los residuos sólidos podría aminorar significativamente la cantidad de residuos que hay que transportar y eliminar, lo que provoca una reducción del capital que el gobierno municipal gastaría en su tratamiento, ya que resta el uso de espacio en los vertederos y es posible aprovechar el biogás producido y en lugar de emitirlo a la atmósfera (Alvarado-Lassman *et al.*, 2016).

1.4 Proceso de producción de biogás: digestión anaerobia

La digestión anaerobia es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno que da lugar a una combinación de gases, conocida como "biogás", compuesta básicamente por metano y dióxido de carbono (Vega y Ramírez, 2014) y una suspensión fluida o lodo que contiene los microorganismos responsables de la degradación de la materia natural (Lorenzo y Obaya, 2005).

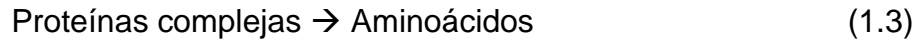
Este bioproceso tiene más de cien años de formación y en la actualidad ofrece la posibilidad de reutilizar los residuos naturales y disminuir las emanaciones de sustancias nocivas para la capa de ozono al captar el carbono de los desechos para producir metano (Horan, 2018). La digestión anaerobia comprende un conjunto de subprocesos sincronizados entre sí, que son una progresión de respuestas metabólicas complejas sin la presencia de oxígeno, lo que la convierte en una pieza importante de los ciclos biogeoquímicos de carbono, nitrógeno y azufre (Corrales *et al.*, 2015).

1.4.1 Etapas de la digestión anaerobia

En el proceso de digestión anaerobia a menudo se utilizan tres etapas para ilustrar la secuencia de eventos microbianos. Estas etapas son la hidrólisis, la acidogénesis y la metanogénesis (Gerardi, 2003; Corrales *et al.*, 2015). A continuación, se describe cada etapa:

Hidrólisis

La hidrólisis se refiere tanto a la solubilización de materia particulada resistente, así como la descomposición biológica de materia orgánica compleja particulada (biopolímeros, proteínas, carbohidratos, lípidos) en moléculas simples (monómeros o dímeros), que pueden atravesar la membrana celular (Wid y Horan, 2018). La ruta que siguen las bacterias para la degradación de los compuestos durante la hidrólisis es se observa en las Ecuaciones 1.1 a 1.3 (Gerardi, 2003):



Acidogénesis

Es la etapa de formación de ácido, los compuestos solubles producidos a través de la hidrólisis o descargados al digestor son degradados por una gran diversidad de anaerobios facultativos y anaerobios a través de muchos procesos fermentativos. Este paso también se conoce como fermentación, ya que la glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los péptidos son fermentados a ácidos grasos volátiles por bacterias anaerobias. Los ácidos grasos más volátiles y otros compuestos orgánicos se transforman en ácido acético (CH_3COOH), hidrógeno (H_2) y dióxido de carbono (CO_2) por las bacterias acetogénicas (Gerardi, 2003; Horan, 2018). La ruta que siguen las bacterias para la producción de ácidos durante la acidogénesis se divide en dos ramos que se pueden observar en las Ecuaciones 1.4 y 1.5 (Gerardi, 2003):

Producción de ácido



Producción de acetato (Acetogénesis)



Metanogénesis

En esta etapa metabólica, el CH₄ se obtiene a partir de acetato o combinaciones de H₂ y CO₂, y también puede formarse a partir de diferentes sustratos como el ácido fórmico y el metanol. El trabajo de las arqueas se caracteriza por el tipo de sustrato disponible (Lorenzo y Obaya, 2005). El curso seguido por los microorganismos para la última etapa, es decir la producción de metano durante la metanogénesis toma tres vías que se muestran en las ecuaciones 1.6 a 1.8 (Gerardi, 2003):

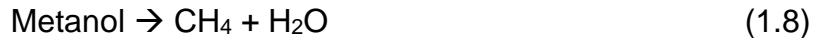
- 1) Metanogénesis acetoclástica



- 2) Metanogénesis hidrogenotrófica



- 3) Metanogénesis metilotrónica



Con lo descrito anteriormente se puede resaltar que las *Archaeas* dependen de las bacterias acidogénicas para proporcionarles acetato, hidrógeno y carbonato, mientras que estas bacterias acidogénicas dependen de las archaeas para eliminar el hidrógeno. Por lo tanto, la metanogénesis se considera la etapa más sensible de la digestión anaerobia. Las *Archaeas* son muy sensibles a las fluctuaciones de pH, temperatura, Cva y son inhibidas por una serie de compuestos como se informó en estudios anteriores (Wid y Horan, 2018).

1.5 Microorganismos presentes en el proceso de digestión anaerobia

De acuerdo con Deng *et al.*, (2020) los microorganismos de digestión anaerobia son un tipo de organismos relacionados con la generación de biogás y sus características básicas de microorganismos comunes como:

- a. Tamaños mínimos y gran superficie específica. Los microorganismos se miden con un micrómetro y los virus con un nanómetro.
- b. Amplia distribución y gran variedad. Los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluso dentro y fuera de animales y plantas, suelos, aire, océanos, glaciares, lagos salados, desiertos, pozos de petróleo y debajo del estrato rocoso. Hasta ahora, las especies registradas tienen cerca de 2 millones, de los cuales el número de especies de microorganismos asciende a 200,000.
- c. Tasa de crecimiento rápido y metabolismo fuerte. La conversión rápida, el metabolismo vigoroso y la reproducción rápida de los microorganismos provienen de sus grandes superficies específicas que contribuyen al intercambio de material, energía e información con el entorno circundante.
- d. Fuerte adaptabilidad al entorno y fácil variación. Los microorganismos existen en varios entornos y pueden adaptarse a cualquier condición grave a diferencia de los animales y las plantas. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos son organismos unicelulares, por lo que entran en contacto directo con varios entornos y su ADN es propenso a cambiar.

Los atributos mencionados de los microorganismos dan una premisa al ser humano para aprovechar y utilizar los activos de los microorganismos (Deng *et al.*, 2020).

Esta amplia variedad de microorganismos dentro del curso de la digestión anaerobia de la materia orgánica puede compactarse en diferentes agrupaciones de microbios anaerobios facultativos y anaerobios severos (Figura 1.2), que utilizan sucesivamente los elementos metabólicos creados por cada agrupación:

Grupo I. Bacterias hidrolíticas y fermentativas.

El uso microbiano de polímeros complejos requiere que los microorganismos asociados a su degradación puedan hidrolizar o separar las partículas de polisacáridos, proteínas y grasas e hidrolizarlas hasta convertirlas en mezclas sencillas como azúcares, aminoácidos y grasas insaturadas. Las bacterias que realizan estos

procesos pertenecen a las anaerobias facultativas y los géneros más comunes que realizan esta ruta metabólica son los individuos de la familia *Enterobacteriaceae*, así como: *Sacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Saeteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Díaz *et al.*, 2002).

Grupo II. Bacterias acidogénicas y acetogénicas.

Los microorganismos acidogénicos convierten los azúcares, los aminoácidos y las grasas insaturadas en grasas saturadas imprevisibles, por ejemplo, propionato y butirato, que deben ser oxidados para derivar en ácido acético, CO₂ y H₂. Esta oxidación es completada por microorganismos Acetógenos Productores de Hidrógeno Obligados (APHO), en un ciclo conocido como "acetogénesis". Dentro de los acetógenos hay organismos microscópicos conocidos como "microorganismos homoacetogénicos" que son anaerobios comprometidos y utilizan el CO₂ como último aceptor de electrones, proporcionando la derivación del ácido acético como único resultado de la degradación anaerobia. Los electrones para la disminución del CO₂ provienen del H₂ y de mezclas como azúcares, ácidos naturales, alcoholes, aminoácidos y ciertas bases nitrogenadas. Aunque esta reunión no es una clasificación científica caracterizada, incorpora un amplio conjunto de microorganismos Gram (+) y Gram (-) con esporas, por ejemplo, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicoaceticum* y *Acetobacterium woodii* (Díaz *et al.*, 2002).

Grupo III. Bacterias metanogénicas.

Los microorganismos metanogénicos forman parte de la agrupación conocida actualmente como *Archaea*, cuyos individuos presentan características únicas en relación con los encontrados en las bacterias. Estas características se identifican principalmente con la disposición sintética de algunas estructuras celulares. Las arqueas son anaerobios estrictos y producen metano como resultado principal de la digestión de energía. Independientemente de los severos prerrequisitos de anaerobiosis obligada y el metabolismo especializado de este grupo, estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Díaz *et al.*, 2002).

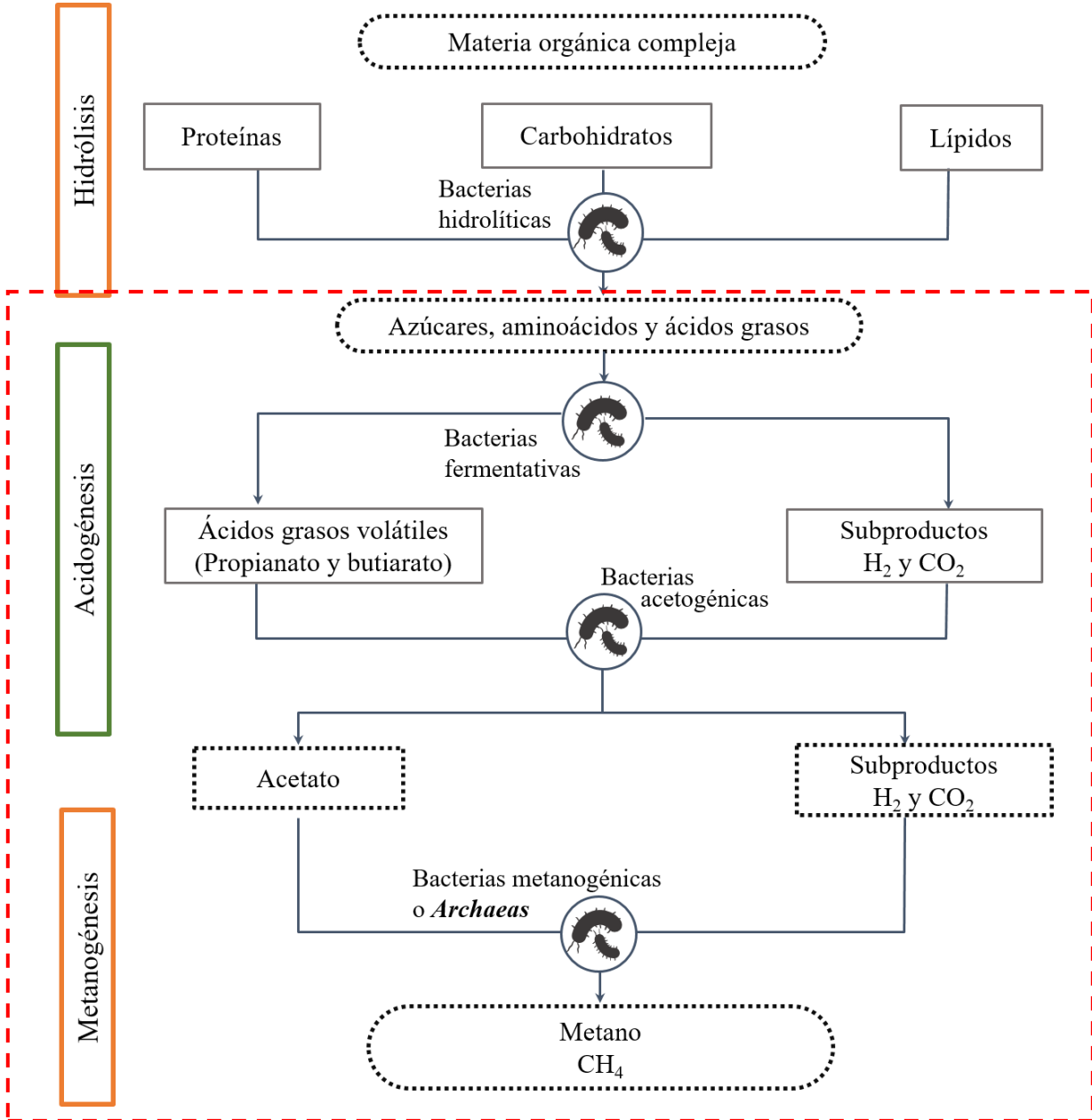


Figura 1.2. Diagrama general de microorganismos, productos y subproductos en la digestión anaerobia, por cada etapa. La presente investigación se centra en la identificación de los microorganismos presentes en las fases acidogénica y metanogénica.

1.5.1 Diferencias entre *Archaeas* y Bacterias

De acuerdo con Atlas y Bartha (2002) las principales causas por las cuales se diferencian las archaeas de las bacterias son:

- 1) Las *Archaeas* no causan enfermedades, es decir no son patógenas tanto para el ser humano como para otros organismos. En cambio, las bacterias pueden tener comportamiento patógeno e infectar a otros seres vivos.
- 2) A través de los años las bacterias han sido capaces de realizar cualquier tipo de metabolismo, como: especies fotoautótrofas (que realizan la fotosíntesis), y quimioautótrofas (obtienen la energía de la degradación de compuestos inorgánicos) y heterótrofas (obtienen la energía de la degradación de la materia orgánica, como los animales y los hongos, por ejemplo). Las *Archaeas* son únicamente quimioautótrofas.
- 3) Los mecanismos para replicar ADN son diferentes, las *Archaeas* utilizan mecanismos celulares de replicación (hacer copias del ADN), de transcripción (pasar de ADN a ARN) y de traducción (sintetizar proteínas a partir de la lectura del ARN) similares a los de las células eucariotas pero distintos a los de las bacterianas.
- 4) Ambas poseen pared celular que se diferencian a nivel estructural, ya que la pared bacteriana tiene peptidoglicano (un tipo de polímero) y la arquea, no.

Debido a estas diferencias sus líneas evolutivas se separaron hace más de 3,500 millones de años, cuando la Tierra apenas tenía 1,000 millones de años de vida, en la Figura 1.3 se puede observar el árbol filogenético de la vida que muestra la descendencia evolutiva de los dominios de Bacteria, *Archaea* y *Eucaria*.

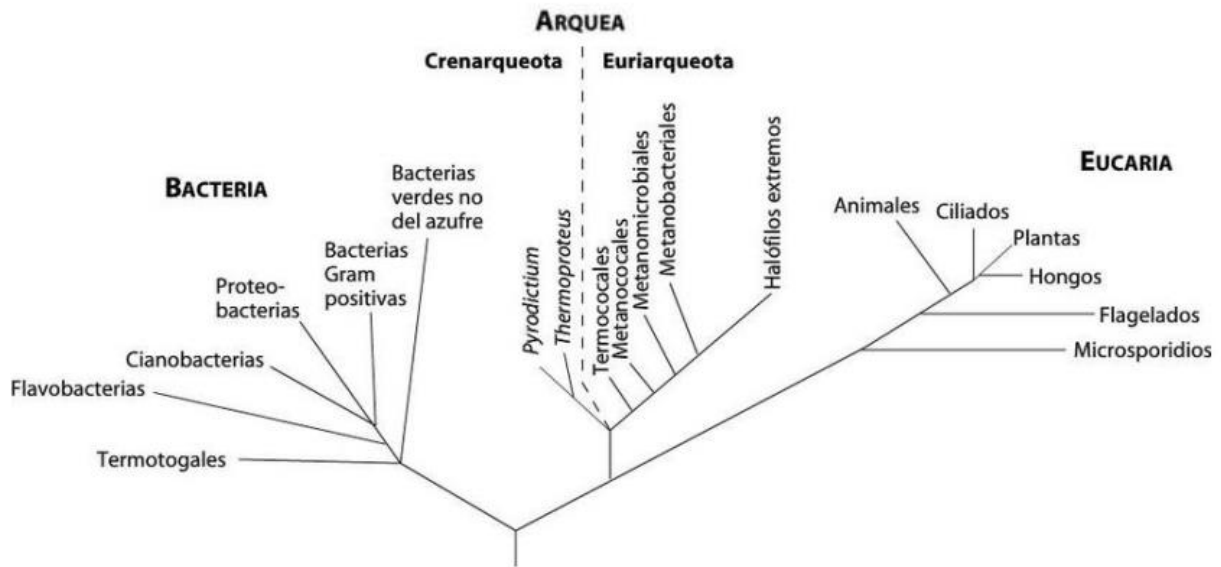


Figura 1.3. Ubicación de las Bacterias, Archaeas y Eucarias en el árbol filogenético de la vida (Atlas y Bartha, 2002).

1.6 Parámetros de control del proceso de DA

En la realización de estos procesos, las poblaciones microbianas se ven condicionadas por algunos parámetros físicos y químicos, que posibilitan su adecuado desarrollo (Corrales *et al.*, 2015). Por lo tanto, el desempeño de los procesos de DA depende principalmente de 1) volumen de biomasa, 2) temperatura, 3) mezcla de sustrato, 4) relación carbono-nitrógeno, 5) tiempo de residencia hidráulica, y 6) Carga volumétrica aplicada (Cva). Estos parámetros también son importantes para mantener el equilibrio de microorganismos en el sistema de digestión (Rajendran *et al.*, 2012).

1) Volumen de biomasa

El volumen total del reactor utilizado para las pruebas está inversamente relacionado con el número de muestras repetidas que podrían analizarse al mismo tiempo utilizando una cantidad fija de inóculo y sustrato (Raposo *et al.*, 2012).

2) Temperatura

Existe una amplia gama de temperaturas en las que puede producirse la digestión anaerobia, que se clasifican en tres grupos: psicrófilos (por debajo de 20 °C), mesófilos

(30-40 °C óptimos) y termófilos (por encima de 50 °C). Los mesófilos y termófilos son más favorecidos que los psicrófilos porque la velocidad de reacción es mayor en ambos rangos de temperatura. Los procesos anaerobios mesofílicos son comunes debido al proceso de reacción estable, alto en actividades microbianas y fácil de iniciar (Minteer, 2011).

3) Mezcla de sustrato

Es importante mantener una concentración constante del sustrato, la temperatura y otros factores ambientales para evitar la formación de espuma y la deposición de sólidos. La mezcla mediante circulación de gas y agitadores mecánicos depende de las concentraciones finales de sólidos totales de los sistemas (Hilkiah *et al.*, 2008).

4) Relación carbono-nitrógeno (C/N)

El desempeño del proceso de digestión anaerobia se basa en las concentraciones de carbono y nitrógeno, donde el carbono es la fuente de energía para los microorganismos y el nitrógeno mejora el crecimiento microbiano. Generalmente, se pierde como gas amoníaco cuando la cantidad de nitrógeno excede el requerimiento microbiano. Para la condición ideal, la proporción de carbono a nitrógeno es de aproximadamente 30:1 en la materia prima (Hilkiah *et al.*, 2008).

5) Tiempo de residencia hidráulica (TRH)

El tiempo de residencia hidráulica se define como el período que la materia prima permanece en el digestor y es un parámetro de diseño clave utilizado que depende de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de la materia prima (Mir *et al.*, 2016).

6) Carga Volumétrica aplicada (Cva)

La carga orgánica aplicada (Cva) describe la relación entre la tasa de tratamiento de la materia orgánica y el tamaño del sistema de tratamiento o reactor. Se expresa como peso de materia orgánica en términos de DQO o SV (o ST) agregados por volumen de

reactor por día. Cuanto mayor sea la Cva que un sistema puede tratar adecuadamente, mayor será la rentabilidad del sistema (Akunna, 2019).

1.7 Tecnología de alta carga en digestión anaerobia

El tratamiento de los efluentes ha pasado a tener una importancia indispensable para mantenerse alejado de la contaminación ambiental, por lo que es necesario fomentar ciclos que consoliden una alta eficacia de tratamiento con bajos costes de desarrollo y mantenimiento (Lettinga *et al.*, 1983). Los principales tipos de reactores de alta carga son:

1.7.1 Reactores UASB

El reactor (Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente y Manto de Lodos) se muestra entonces como una opción adecuada para el tratamiento de efluentes orgánicos (Lorenzo y Obaya, 2005).

El digestor de flujo ascendente se compone esencialmente de un tanque "en forma de trompo", con las cámaras de sedimentación y de absorción anaerobia superpuestas. El reactor posee tres zonas diferenciadas 1) Zona de lecho de lodo, donde se concentran los microorganismos que van a biodegradar la materia natural presente en el agua residual a tratar; 2) Zona donde los microorganismos están dispersos por todo el UASB; y 3) Zona de división fuerte de gas-fluido. La pérdida a tratar se coloca en la parte inferior del reactor. Las aguas residuales ascienden a través de una cubierta de pendiente compuesta por gránulos o partículas enmarcadas de forma natural (Lorenzo y Obaya, 2005).

1.7.2 Reactores de lecho de lodo granular expandido (EGSB)

Los reactores de lecho de lodo granular expandido (abreviado como EGSB) se desarrollan basándose en UASB. En esta tecnología, la alta rapidez de flujo ascendente se consigue por medio del reflujos del efluente y una alta interacción H/D (altura-diámetro), que posibilita la extensión de los biolechos. Principalmente, la tasa de extensión de EGSB es de en torno al 10-20 %. Las partículas fluidizadas acceden

en contacto con el líquido para mejorar la transferencia de masa. Además, este reactor puede adoptar pequeños bioenvases granulares, que tienen la posibilidad de eludir el taponamiento que frecuenta suceder en los reactores de biopelícula fijos. La rapidez de flujo ascendente de EGSB es más instantánea, por lo cual los requisitos para los distribuidores de agua no son tan precisos, a diferencia de los requisitos para los separadores trifásicos. La alta carga hidráulica conduce a la pérdida de lodos, por lo cual el diseño de separadores trifásicos es clave para el desempeño estable y eficaz de los EGSB (Deng *et al.*, 2020).

1.7.3 Reactores de biopelícula

Por otra parte, el tratamiento anaeróbico de los efluentes con un alto contenido de materia biodegradable tiene algunas ventajas, por ejemplo, se puede lograr una alta capacidad de remoción al ocuparse de cargas elevadas, tiene pocos requisitos de suplementos, crea cantidades bajas de lodos y proporciona un biogás inflamable (Houbron *et al.*, 2016). No obstante, uno de los problemas graves en los procesos de tratamiento anaerobio de aguas residuales es la deficiencia de biomasa en los procesos con alta carga orgánica. Por ello, una gran parte de los sistemas anaerobios utilizados incluyen sistemas de biomasa fija. La biopelícula ofrece beneficios fascinantes, por ejemplo, ofrece una mayor superficie de contacto entre el sustrato y la biomasa, así como de la sencilla separación del agua tratada de la biomasa y un diseño compacto (Houbron, 2012).

Los procesos basados en biopelículas se han demostrado como una elección ventajosa para la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) y nutrientes sin varias de las restricciones de los procesos de lodos activados (Zinatizadeh y Ghaytooli, 2015). La tecnología del reactor de biopelícula de lecho móvil (RBLM), que comprende un reactor de biopelícula sumergido y una instalación de división líquido-sólido subsiguiente, se ha usado cada vez más en el procedimiento de aguas residuales (Ferrai *et al.*, 2010). El objetivo de los RBLM es cultivar biopelículas adheridas en pequeños transportadores que son móviles en el tanque de aireación. Como resultado, RBLM representa puntos positivos tanto del incremento suspendido como adherido al

implicar todo el volumen del reactor en el proceso de procedimiento, en lo que ni una biomasa regresa del tanque de clarificación a la unidad biológica (Shokoohi *et al.*, 2017).

Rosas-Mendoza *et al.*, (2018) llevaron a cabo el proceso de digestión anaerobia de efluentes de la industria cítrica mediante el uso de un reactor de alta velocidad, evaluando la producción y uso de biogás como fuente de energía alternativa. La contribución de este trabajo fue la introducción de un reactor anaerobio híbrido, el cual consta de una configuración de un reactor de biopelícula formado por un lecho fijo y un lecho fluidizado, la cual permitió manejar cargas orgánicas elevadas. Además de que abre paso a investigaciones futuras sobre el uso de este tipo de reactores.

1.8 Eficiencia del proceso de producción de biogás

El rendimiento y la estabilidad de los procesos de tratamiento anaerobio dependen de la cantidad y calidad de los metanógenos activos presentes en el sistema. Los microorganismos anaerobios activos se utilizan a menudo para inocular sistemas anaerobios durante el período de puesta en marcha con el fin de reducir la fase de retraso en el desarrollo de un consorcio microbiano equilibrado. Las características microbianas de un inóculo dependen del tipo de sustrato y las condiciones operativas de su fuente. El inóculo apropiado se puede obtener de reactores anaerobios activos, preferiblemente aquellos que tratan tipos similares de desechos o lodos de residuales. La baja proporción de inóculo a alimento puede conducir al predominio de las bacterias acidogénicas sobre las archaeas y puede resultar en aumento de pH (Akunna, 2019).

El tratamiento anaerobio es más adecuado para residuos sólidos, lodos y aguas residuales con concentraciones de DQO en el rango de resistencia intermedia a alta, es decir, de 2,000 DQO/L. Las eficiencias de remoción orgánica tienden a aumentar al aumentar la fuerza orgánica del efluente. Sin embargo, se puede lograr una eliminación de DQO de hasta el 80-90 % en un sistema operado de manera eficiente (Akunna, 2019).

Por lo tanto, para evaluar la eficiencia del proceso es indispensable determinar la producción volumétrica de gas y la calidad del gas. Al combinar los datos sobre la Cva (gDQO), los datos de producción y calidad del gas se tiene un panorama de la producción específica de metano o el rendimiento de metano ($m^3 \text{ CH}_4/\text{kg DQO}$ removida), que al compararse con los puntos de referencia para determinados sustratos y la interpretación de la evolución reciente del rendimiento del metano permiten estimar la eficiencia real del proceso al menos de forma aproximada y revelar tendencias ascendentes y descendentes (Lebuhn, *et al.*, 2015).

Sin embargo, otro aspecto importante por mencionar es que el estudio de la dinámica y composición de los microorganismos contribuyen a obtener el máximo rendimiento de metano y por tanto un mayor aporte energético, para obtener información viable sobre los microorganismos, es necesario la aplicación de técnicas de biología molecular como la secuenciación de segunda generación (NGS) y reacción en cadena polimerasa (qPCR) (Lebuhn *et al.*, 2015).

1.9 Técnicas de biología molecular para el análisis de poblaciones microbianas

La investigación de la microbiología de sistemas y su utilidad se ha ampliado en los últimos veinte años, y por lo que se han desarrollado herramientas de biología molecular. Las técnicas de biología molecular se utilizan para investigar los ácidos nucleicos y para reconocer y distinguir los microorganismos, al igual que varios genotipos dentro de especies similares y las cualidades de oposición de los medicamentos. Esta multitud de procedimientos requieren un avance previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído, debe purificarse adecuadamente para evitar la presencia, por ejemplo, de inhibidores o sustancias que degraden y obstaculicen la correcta exposición del procedimiento resultante (Guebitz *et al.*, 2015).

Entre los métodos de la biología molecular, existen numerosas variantes para intensificar, distinguir y agrupar los ácidos nucleicos (ADN o ARN). El método más esencial es la respuesta en cadena de la polimerasa y se crearon diversas

modificaciones para trabajar en el ciclo de análisis y comprensión, como la PCR continua o cuantitativa, la RT-PCR, los microarrays y la secuenciación (Díaz, 2020).

1.9.1 Reacción en cadena Polimerasa (PCR)

La técnica de la PCR se apoya en la amplificación de una zona específica de ADN usando unos primers o cebadores (secuencias de ADN que delimitan el área de amplificación, que poseen una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la zona del ADN que se desea amplificar). Se fundamenta en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que añade los nucleótidos en la síntesis de novedosas cadenas de ADN (amplificación)(Campion y Canul, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una sucesión específica de ADN a lo largo de diversos ciclos repetidos en los cuales la sucesión blanca es copiada fielmente. Para eso, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la función de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la actitud, si utilizamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si utilizamos ADN complementario (ADNc) perteneciente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés) (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Funcionamiento de PCR

Cada ciclo de la PCR se realiza en 3 fases primordiales: desnaturalización, hibridación y expansión como se muestra en la Figura 1.4.

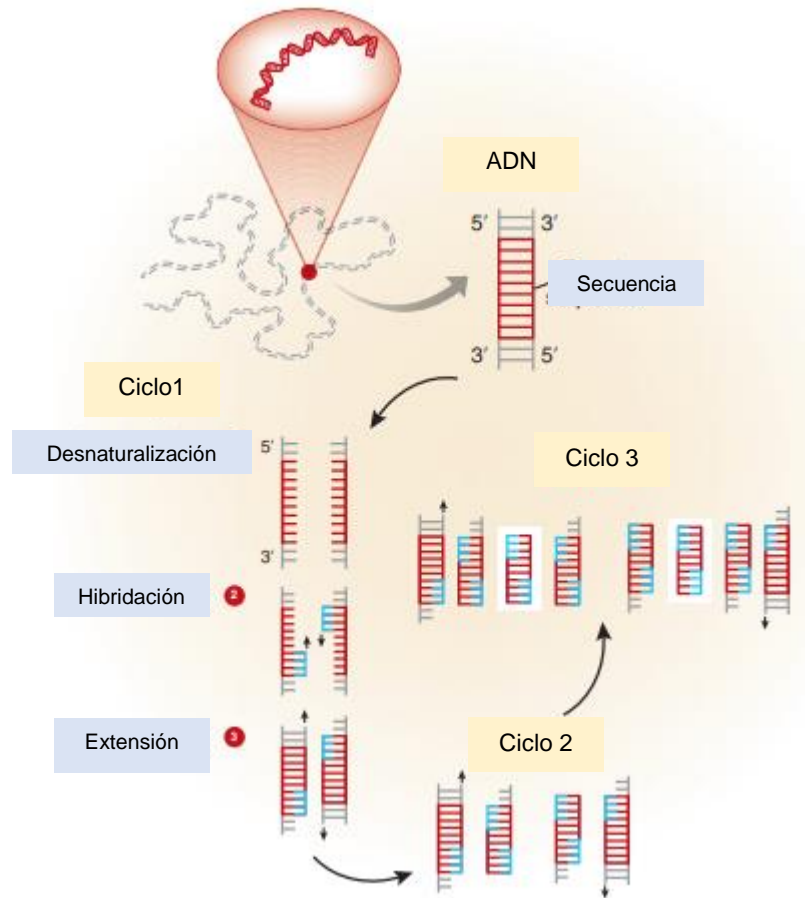


Figura 1.4. Presentación esquemática del principio de la reacción en cadena de la polimerasa (Garibyan y Avashia, 2013).

Desnaturalización: Ciclo en el que las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C a lo largo de 20-30 segundos; la etapa es dependiente de la sucesión del templado, o sea, si la proporción de G-C es alta, va a ser primordial más tiempo para romper sus uniones ya que el apareamiento de estas bases se conforma por 3 enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, es dependiente de la rapidez en la que el termociclador se incrementa la temperatura, esto cambia de consenso al modelo del equipo. Finalmente de esta fase tendremos las cadenas separadas que van a servir como templado para el siguiente paso (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Garibyan y Avashia, 2013).

Hibridación: Para que se forme el complejo templado-primers, es fundamental que la temperatura de hibridación o temperatura de fusión (T_m) sea la óptima; ésta principalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el adecuado y la temperatura es la correcta, la igualdad y especificidad del complejo va a ser eficiente (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Garibyan y Avashia, 2013).

Extensión: En este ciclo, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y comienza su funcionalidad catalítica a una rapidez bastante inmediata; añade complementarios de dNTP para generar las cadenas enteras de ADN. La temperatura óptima para la actitud es de 72 °C, debido a que a dicha temperatura la enzima es servible (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Garibyan y Avashia, 2013).

1.9.2 Secuenciación de próxima generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing NGS) es un conjunto de tecnologías diseñadas para secuenciar una gran cantidad de segmentos de ADN de manera masiva y en paralelo, en menor proporción de tiempo y a un menor precio por base. Su uso se otorgó al inicio para identificar versiones de nucleótido exclusivo y cada vez se ha desarrollado para otro tipo de versiones, como inserciones, deleciones y varios rearrreglos (Rubio *et al.*, 2020).

Técnicas actuales de secuenciación de nueva generación

Cada una de las técnicas NGS comparten la función de secuenciar una gigantesca proporción de fragmentos de ADN de manera paralela en un corto tiempo. Para poder hacer este objetivo, siguen un abordaje metodológico similar que se puede resumir en 5 pasos: 1) segmentación del ADN en diversos fragmentos, 2) marcaje del ADN mediante primers o adaptadores que indican el punto de inicio para la replicación, 3) amplificación de los fragmentos de ADN marcados con adaptadores por procedimientos basados en actitud en cadena de la polimerasa, 4) secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN y 5) recomposición de la sucesión completa mediante secuencias de alusión y exportación a ficheros de almacenamiento de datos (Rubio *et al.*, 2020).

1.10 Antecedentes y avances

Recientemente, se han desarrollado investigaciones aplicando técnicas de biología molecular para analizar la dinámica microbiana en el proceso de DA, con altas cargas orgánicas en diferentes tipos de reactores. A continuación, se presenta una revisión detallada del estado del arte:

Doloman *et al.* (2017), evaluaron los cambios de composición de las comunidades bacterianas, que coordina la cogestión anaerobia de biomasa de microalga cultivada en aguas residuales municipales. Para llevar a cabo dicha investigación se utilizaron dos reactores tipo manto de lodos de flujo ascendentes UASB. El tiempo de operación de los reactores fue de 87 días, cada uno con un volumen de 32.4 L. La carga orgánica osciló entre 0.9 y 5.4 gDQO/Ld. La caracterización de las comunidades microbianas se llevó a cabo por la extracción del ADN, utilizando PCR con cebadores bacterianos universales y específicos de los metanógenos. En la fase de metanogénesis tuvo mayor abundancia de la especie *Methanosarcina mazei*. Los resultados de los cambios observados en la composición de las comunidades microbianas durante la DA demostraron que pueden utilizarse como hoja de ruta para estimular a las especies bacterianas clave en cada fase para aumentar el rendimiento del biogás y la tasa de descomposición del sustrato. Así como también que el estudio de un metagenoma bacteriano durante la digestión anaerobia de biomasa microalgalina y acetato de sodio proporciona un valioso conocimiento de las complejas interacciones microbiliares y puede utilizarse para nuevos estudios que conduzcan al cultivo de microorganismos clave de interés.

Arreola *et al.* (2018) estimaron el rendimiento de un reactor de lecho (PBR por sus siglas en inglés) con capacidad 445 L, en el proceso de digestión anaerobia de vinazas de tequila a diferentes cargas orgánicas durante 231 días. De donde se tomaron muestras y la abundancia y diversidad de arqueas y bacteria se estimaron mediante q-PCR y PCR-CE-SSCP, respectivamente, utilizando cebadores convencionales. La dinámica microbiana se correlacionó con los cambios de carga orgánica y el tiempo de residencia hidráulica que al ser reducido de 5 a 2 días se obtuvo un favorecimiento en

el desarrollo de microorganismos que consumieron el sustrato a cargas orgánicas altas. Por lo tanto, los análisis microbianos contribuyen a una mejor comprensión del proceso ya que se observó que las alteraciones de carga orgánica promovieron la reducción de *Methanobacterium* mientras que aumentaron las asociaciones entre Bacteria sintrófica y Metanosaeta. Se concluyó que el rendimiento del PBR no se vio afectado, lo que permitió el tratamiento de Cva más altos que las tecnologías actuales a gran escala. Los resultados también demostraron la excelente robustez de la configuración del PBR, que permitió obtener una perforación buena y estable durante varias perturbaciones Cva y composiciones de vinazas de tequila.

Schmidt *et al.* (2018), analizaron la influencia de la adición de oligoelementos en el desempeño de DA de las aguas residuales del procesamiento de carnes rojas durante el aumento de la carga orgánica (Cva), para determinar la cantidad, la calidad y la estabilidad del proceso de biogás utilizando digestores CSTR en condiciones mesofílicas. Este estudio tuvo una duración de 176 días con Cva de 0.4 a 2.76 gDQO/Ld. La adición de estos oligoelementos son una parte esencial de las enzimas y cofactores involucrados en la metanogénesis y, por lo tanto, pueden afectar directamente la actividad microbiana y, en consecuencia, la eficiencia de degradación resultante y la estabilidad del proceso en un sistema de DA, el resultado obtenido fue una mayor eficiencia de degradación con 5031 mg/L DQOrem, una mayor producción de biogás con 331 mL/gDQOrem y 72 % CH₄ y una mejor estabilidad del proceso. Logrando una mayor Cva y un menor TRH en comparación con los digestores de control, lo que demuestra que la adición de estos oligoelementos son una parte esencial de las enzimas y cofactores involucrados en la metanogénesis y, por lo tanto, pueden afectar directamente la actividad microbiana y, en consecuencia, la eficiencia de degradación resultante y la estabilidad del proceso en un sistema de digestión anaerobia.

Toledo *et al.* (2018), estudiaron también el rendimiento y la dinámica microbiana, pero en un proceso de digestión anaerobia a dos etapas, en reactores PBR interconectados de 5 y 7 L de capacidad, en condiciones de temperatura mesofílica. El análisis de las

poblaciones microbianas se realizó mediante la extracción del ADN genómico y PCR con el gen ARNs 16S. Estos estudios se aplicaron durante 4 fases que duró el proceso de digestión anaerobia, como resultados se obtuvo que el género dominante en la etapa metanogénica fue acetotrófico *Methanosaeta*, sin embargo, el aumento de la carga orgánica en las primeras etapas favoreció el desarrollo de las poblaciones acidogénicas afectando a las poblaciones metanogénica. Como ventaja en este estudio se obtuvo mayor remoción de la DQO. Los autores mencionan que es la primera contribución con respecto al uso de PBR para la digestión anaerobia en dos etapas. Los resultados logrados en términos de producción de biogás y rendimiento de metano confirmaron el potencial de la configuración del reactor de lecho empacado para altas remociones de DQO y recuperación de energía de alta aguas residuales fuertes como las vinazas de tequila.

Botello *et al.* (2018), evaluaron los efectos de la Cva sobre el rendimiento y la composición microbiana de la DA en un sistema UASB de 20 y 10 L a dos etapas que trata las vinazas de café. El incremento de Cva durante el proceso fue de 6.1 a 18.2 gDQO/Ld, controlando la alcalinidad del afluente por recirculación del efluente. En un periodo de operación de 306 d a condiciones mesofílicas, el rendimiento total de sistema se estimó considerando las características del efluente, la proporción de nutrientes y el desarrollo de lodos, obteniendo 200 mL CH₄/gDQOrem con una remoción del 73-84 % de DQO. La composición microbiana se analizó en el lodo del primer reactor mediante NGS y qPCR en respuesta a condiciones de Cva bajas y altas. Las poblaciones microbianas identificadas fueron las bacterias *Syntrophus* y *Candidatus Cloacimonas* y los metanogénos dominantes fueron *Methanosaeta*, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanomassiliicoccus*. Este estudio expuso la eficacia de dos reactores UASB en serie para tratar las aguas residuales del procesamiento del café a tasas de Cva crecientes, manteniendo una alta producción de metano con una adecuada eliminación de materia orgánica y fenoles. Las condiciones de la primera etapa se favorecieron por el funcionamiento del reactor de

segunda etapa, la recirculación de efluentes, la proporción de nutrientes (particularmente aumento de Fe) y el desarrollo de lodos.

Ali *et al.*, (2019) examinaron la producción de biogás (hidrógeno y metano) y la dinámica de la comunidad microbiana en el tratamiento anaerobio de efluentes industriales salinos que contienen monoetilenglicol (MEG) como contaminante principal. El estudio se llevó a cabo durante 208 días en un reactor anaerobio desconcertado de lodo inmovilizado (ISABR) con 22.5 L de capacidad, inoculado con cultivo mixto adaptado a la sal como un experimento a escala de laboratorio, y los efectos de las condiciones operativas, Cva y temperatura, en el rendimiento del sistema fueron analizados. Las Cva estudiadas en principio fueron 0.64-2.34 gDQO/Ld, aumentando las concentraciones iniciales de MEG a un tiempo fijo de residencia hidráulica (TRH) de 4.5 d, desde el día 1 al 100 con una salinidad más baja de 10 gNaCl/L y a 25 ± 6 °C. Como resultados se obtuvo un rendimiento de metano de 165 mL CH₄/gDQOrem y el rendimiento de hidrógeno de 102 mL H₂/gDQOrem. Los análisis de poblaciones microbianas se realizaron mediante NGS cebadores 341F/805R y PCR. El aporte de este estudio fue demostrar la eficacia de un ISABR para el tratamiento y la producción de bioenergía a partir de aguas residuales industriales salinas contaminadas con MEG. Resaltando el papel clave que juega la adecuada adaptación de los consorcios tolerantes a la sal durante el proceso anaerobio. La estructura con compartimentos del ISABR confirma el potencial de separación de fases para maximizar la producción de hidrógeno y metano de compartimentos anteriores y posteriores, respectivamente.

En resumen, con la información proporcionada por las investigaciones anteriores, es posible resaltar la importancia de la investigación actual, debido a que se pretende tratar altas cargas orgánicas y tener un tiempo de residencia hidráulica menor a los descritos anteriormente, para el aprovechamiento y tratamiento de la fracción líquida generada por los RSO. La Tabla 1.2, compara las condiciones de operación, los análisis utilizados, los resultados obtenidos de las investigaciones anteriormente mencionadas y los parámetros propuestos para la investigación actual.

Tabla 1.2. Evolución del estado del arte empleando diferentes parámetros

	<i>Doloman et al.</i> 2017	<i>Arreola et al.</i> 2018	<i>Smidch et al.</i> 2018	<i>Toledo et al.</i> 2018	<i>Botello et al.</i> 2018	<i>Ali et al.</i> 2019	Presente investigación 2020
Reactor	UASB	PBR	CSTRs	PBR	UASB dos etapas	ISABR	RAH
Volumen (L)	32.4	445	2	5 y 7	20 y 10	22.5	3.81
T (°C)	35 ± 2	35 ± 2	35 ± 2	35 ± 2	23.34 ± 2	25 ± 6 35 ± 2	35 ± 2
pH	6-7	7	NE	7	7 ± 0.2	NE	6.8-7.2
Sustrato	Mezcla de biomasa microalcalina y acetato de sodio	Vinazas de tequila	Vinazas del procesamiento de carnes rojas	Vinazas de tequila	Vinazas de café	Aguas residuales petroquímicas salinas sintéticas	Fracción líquida de residuos sólidos orgánicos
Inóculo	Sedimento lodo anaerobio	Lodo granular	NE	Lodo granular	Lodos	Lodo espesado	Extendosphere colonizado
Cva (gDQO/Ld)	0.9-5.4	4-12.5	0.41-2.76	R1=7.7-29 R2= 2.7-12	R1=6-18.2 R2=1.6-9.5	0.64-2.34 Fijo 0.64	8, 16 y 20
TRH (días)	7 y 5	5-2	11.1-2	2.6,1.5,16, 3.7, 2.4, 2.2	60, 30 y 15	4.5	1
Periodo de operación (días)	87	231	176	335	306	208	>100
DQO removida (%)	79	86-89	5031 ± 1048 615 (mg/L)	95.2	84-73	87.2	>90

Tabla 1.2. Evolución del estado del arte empleando diferentes parámetros

	<i>Doloman et al.</i> 2017	<i>Arreola et al.</i> 2018	<i>Smidch et al.</i> 2018	<i>Toledo et al.</i> 2018	<i>Botello et al.</i> 2018	<i>Ali et al.</i> 2019	Presente investigación 2020
YCH₄ (L CH₄ / gDQO rem)	NE	0.4-0.28	0.238	0.290	0.200	0.165	0.33
Tipo de estudio de biología molecular	PCR y NGS	q-PCR, PCR y NGS	NE	q-PCR, PCR y NGS	NGS y qPCR	NGS cebadores PCR	Secuenciación Genética Masiva (NGS)
Población bacteriana dominante	Clostridiales Thermotogales Desulfovibionales	Predominio	NE	Predominio	Syntrophus y Candidatus Cloacimonas	Desulfovibrio, Oscillibacter, Clostridium ss1, Clostridium ss12 y Romboutsia	Clase <i>Anaerolineae</i>
Población Metanogénica dominante	Methanosarcinales Methanomicrobiales	NE	NE	NE	Methanosaeta, Methanoculleus, Methanobacterium y Methanomassiliicoccus.	Euryarchaeota	<i>Metanosaeta</i> y <i>Metanosarcina</i>

CAPÍTULO 2.
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología general

La metodología que se llevó a cabo en la presente investigación se puede observar en la Figura 2.1.

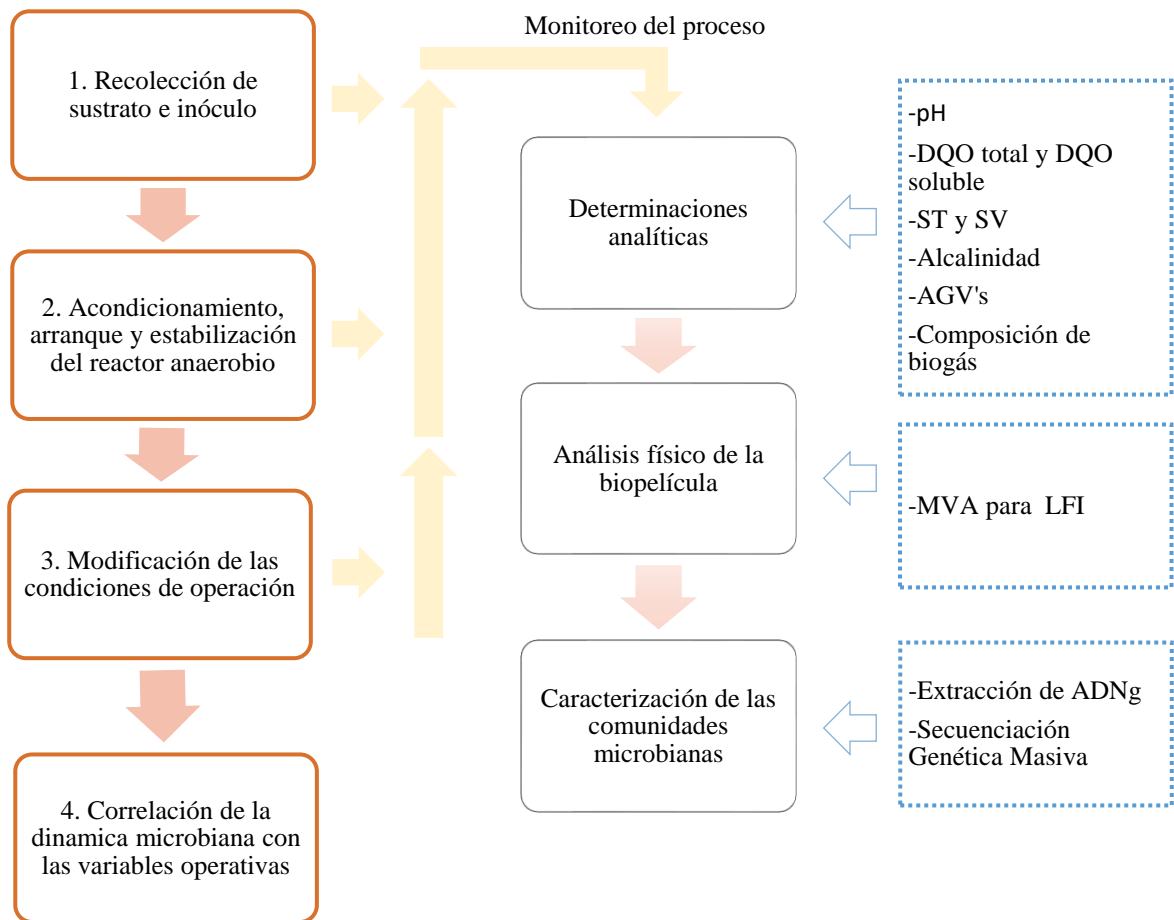


Figura 2.1 Metodología de la presente investigación.

2.2 Recolección de sustrato

La obtención del sustrato se llevó a cabo por medio de la recolección de los residuos sólidos orgánicos (RSO) que se generan en el Mercado Zapata de Orizaba, Ver. Dichos residuos orgánicos son de procedencia agrícola y se conforman de frutas y vegetales, por consiguiente, van variando su composición conforme cambia la temporada.

Los RSO se recolectaron, después se separaron y se llevaron a trituración de tal forma que se alcanzó un semisólido pastoso, siguiendo el procedimiento de Alvarado-Lassman *et al.* (2016). De este sólido se separó la cantidad líquida y se filtró para obtener una parte líquida, la cual se llevó como sustrato del reactor de hidrólisis (RH) a escala piloto, localizado en la Planta Piloto de Procedimiento y Aprovechamiento de Residuos Sólidos del Instituto Tecnológico de Orizaba. Finalmente, de este proceso se obtuvo un efluente que se usó como sustrato hidrolizado de frutas y vegetales, durante los primeros días del arranque del Reactor, posteriormente se utilizó la Fracción Líquida de los RSO bruta, es decir sin pasar por el RH, como sustrato.

2.3 Obtención de inóculo

Como inóculo se utilizó el soporte extensosphere colonizado, el cual fue extraído en cantidad de 1,500 mL, del Reactor de Lecho Fluidizado Inverso (RLFI) alimentado con la Fracción Líquida de los RSO y ubicado en la Planta Piloto de Procedimiento y Aprovechamiento de Residuos Sólidos del Instituto Tecnológico de Orizaba.

2.4 Operación del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

Se usó un reactor de biopelícula, conocido como Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) como se observa en la Figura 2.2, esta reactor consta de dos secciones: 1) un Lecho Fijo (LF) en la parte preeminente, formado por un tubo de acrílico que tiene como medio de soporte anillos poliméricos con longitud promedio de 2.76 centímetros recubiertos por esmalte acrílico para mejorar la unión de la biopelícula, ya que Hadjiev *et al.*, (2007) mencionan que los materiales recubiertos permiten una colonización más rápida, con densidades celulares más altas; y 2) un Lecho Fluidizado inverso (LFI) en

la parte inferior, construido por un tubo de acrílico de 80 centímetros de longitud y diámetro nominal de 8.89 centímetros, donde se usa como medio de soporte una arena sílica llamada extensphere con un diámetro de 170 μm , un área de área específica de 20,000 m^2/m^3 y densidad de 0.69 kg/m^3 (Cruz, 2019).

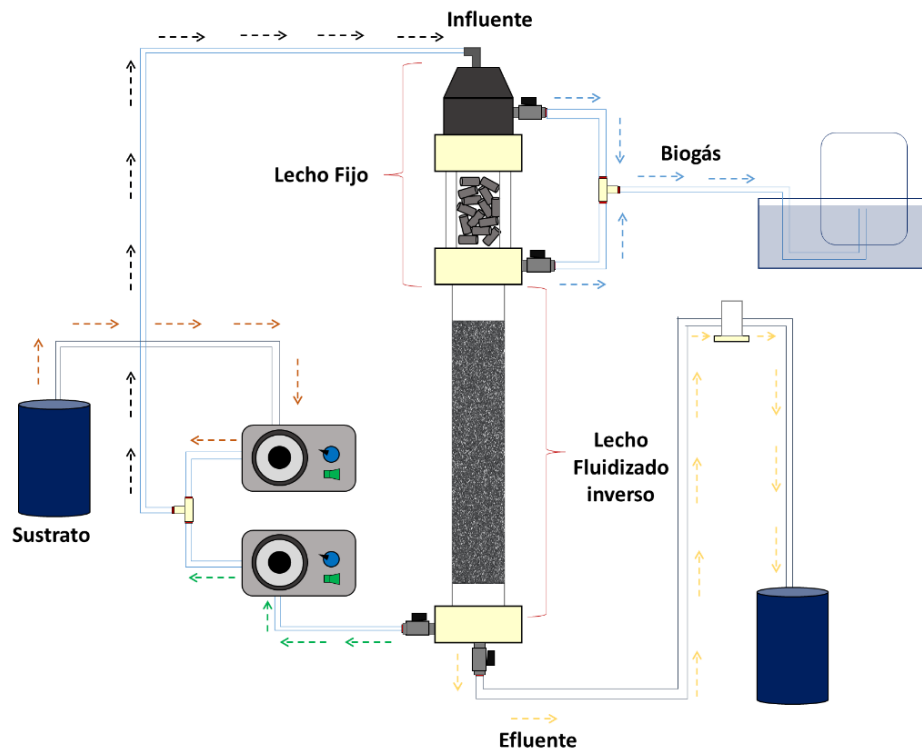


Figura 2.2. Diagrama del RAH

Esta configuración permite tratar sustratos con alto contenido de carga orgánica, cuyos beneficios son lograr una mejor distribución del flujo a través del reactor mediante el LF, retener una mayor cantidad de sólidos en el LF, así como generar una biopelícula resistente en el LF y LFI (Rosas-Mendoza *et al.*, 2018).

Los parámetros de operación del RAH son: el caudal de alimentación (Q), el Tiempo de Residencia Hidráulica (TRH) y la relación Sustrato/Biomasa. Y se calculan con las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3, respectivamente.

$$Q = \frac{Cva \cdot V_u}{DQO_E} \quad (2.1)$$

Donde:

Q.- Caudal de alimentación (L/d)

V_u . - Volumen útil del RAH (L)

DQO_E . - DQO de alimentación (g DQO/L)

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

Donde:

TRH: Tiempo de residencia hidráulica (h)

Q.- Caudal de alimentación (L/d)

24.- Factor de conversión

$$\frac{S_0}{X_0} = \frac{DQO_E \cdot Q}{MVA \cdot V_s} \quad (2.3)$$

Donde:

S_0/X_0 .- Relación Sustrato/Biomasa

DQO_E . - DQO de alimentación (g DQO/L)

Q.- Caudal de alimentación (L/d)

MVA. - Materia Volátil Adherida (g SV/L)

V_s .- Volumen de soporte colonizado (L)

2.4.1. Etapas de la operación continua del RAH

El proceso de digestión anaerobia en el RAH operó en 4 etapas, donde la Etapa 1 de arranque tuvo una Cva variable de 5-8 gDQO/L•d, y la Etapa 2 de estabilización se inició con una Cva aproximadamente 8 gDQO/L•d. Para la Etapa 3 se modificó la Cva a 16 gDQO/L•d, y para la Etapa 4 se alcanzó una Cva alrededor de 20 gDQO/L•d para estudiar el efecto de estos cambios sobre la dinámica de las poblaciones bacterianas y *Archaeas*, gracias a que la configuración del RAH que permite trabajar a alta carga orgánica. En la Tabla 2.1 se observa las características de cada una de estas etapas.

Tabla 2.1. Duración de las etapas de operación del RAH

No. de Etapa	Etapa	Cva (gDQO/L•d)	Número de día que operó		Tiempo de operación (días)
			Inicio	Final	
1	Arranque	5-8	0	26	26
2	Estabilización	7-8	27	83	57
3	Incremento 1	15-16	84	109	25
4	Incremento 2	20-21	110	119	10

Durante todo el proceso se realizó el monitoreo del sustrato a la entrada y salida del RAH. Cabe resaltar que el sustrato que se utilizó durante el arranque fue la Fracción Líquida Hidrolizada proveniente del RH, que se alimentó al RAH con pH superior a 7.5 lo que de acuerdo con Jáuregui-Jáuregui *et al.*, (2014) funciona como estrategia para favorecer la formación de la biopelícula. Sin embargo, para proceder a la Etapa 2 de la estabilización del RAH y las etapas posteriores, se realizó el cambio del sustrato por la Fracción Líquida Bruta (sin tratar en el RH) esta con un pH entre 6.8 y 7.2, regulado con NaOH 3M.

2.5 Monitoreo del proceso

2.5.1 Determinaciones analíticas

Se evaluó el desempeño del RAH por medio de las determinaciones analíticas que se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Determinaciones analíticas del proceso de digestión anaerobia.

Parámetro	Unidad	Método
Potencial de hidrógeno (pH)	-	Potenciométrico 4500-H+ B Standard Methods
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	g/L	Método gravimétrico Standard Methods
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	g/L	
DQO Total (DQO _T)	g/L	Método colorimétrico Standard Methods
DQO Soluble (DQO _S)	g/L	
Alcalinidad (α)	-	Bernad <i>et al.</i> , (2000)

Potencial de hidrógeno (pH)

El valor de pH del ambiente del digestor es un factor muy importante en la digestión de la biomasa y la producción de gas metano. Las bacterias son muy sensibles a las condiciones ácidas. El valor de pH de cada etapa es diferente debido a los ácidos grasos volátiles, el dióxido de carbono y los carbonatos de cadena pequeña; por lo tanto, se recomienda agregar una solución tampón para estabilizar el pH en un valor neutro (Mir *et al.*, 2016).

Por lo tanto, este parámetro se midió de manera directa en la muestra con un potenciómetro Orión 250^a, el cual se calibró con resoluciones tampón 4.0 y 7.0, la resolución de la lectura es de 0.01 unidades de pH y la exactitud es de ± 0.01 .

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Es la cantidad de oxígeno consumido al oxidar la materia prima en condiciones de calentamiento con oxidantes químicos, generalmente expresada en términos de consumo de oxígeno en mg/L o g/L. El oxidante más utilizado es el dicromato de potasio o el permanganato de potasio. DQO representa la cantidad de sustancias orgánicas que se pueden oxidar químicamente y una pequeña cantidad de sustancias inorgánicas en la materia prima, así como la energía química máxima en la materia prima (Deng *et al.*, 2020).

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se analizó por el procedimiento colorimétrico 5220 D Standard Methods y usa al dicromato de potasio en medio ácido (H_2SO_4) como agente oxidante, en presencia de sulfato de plata y sulfato mercúrico como catalizadores en la ebullición, se llevó a cabo en una placa digestora ODYSSEY DR2500 marca HACH a 150 °C a lo largo de 2 horas. Luego se leyeron las muestras en un espectrofotómetro HACH DR/2500 a 620 nm.

Para realizar la DQO soluble, se tomaron 10 mL de muestra y se colocaron en una centrífuga HERMLEZ 383 a 3500 rpm a lo largo de 5 min, se tomó el sobrenadante para hacer la DQO soluble. Las concentraciones de DQO total y soluble se analizaron en un espectrofotómetro HACH a 620 nm.

Se analizó la DQO total y DQO soluble de la fracción líquida al ingreso y salida del reactor para lograr evaluar los porcentajes de remoción de materia orgánica vinculada con la colonización del soporte y estabilización de este, para eso se empleó la Ecuación 2.4 para remoción de DQO total como DQO soluble:

$$\% \text{ DQO rem} = \frac{\text{DQO}_E - \text{DQO}_S}{\text{DQO}_E} \times 100 \quad (2.4)$$

Sólidos suspendidos totales (SST)

Cantidad de residuos que quedan después de la evaporación y deshidratación de la materia prima a una determinada temperatura. Los SST incluyen sólidos en suspensión (SS) y sólidos disueltos (SD). La desventaja del parámetro de sólidos totales es que no puede reflejar con precisión el contenido de sustancias orgánicas. Sin embargo, para materias primas con propiedades físicas y químicas similares, la proporción de sustancias orgánicas en el ST es similar, y el método de prueba del ST es relativamente simple (Deng *et al.*, 2020).

Este análisis se llevó por medio de la técnica gravimétrica descrita en el procedimiento estándar 2540 de APHA (2017), Se evapora la muestra en un crisol a peso constante en una estufa a 103-105°C por un tiempo de 24 horas. El crecimiento de peso sobre el peso del crisol vacío representa los Sólidos Totales; y el cálculo se hace con la Ecuación 2.5:

$$\text{SST} = \frac{P_3 - P_1}{V} \times 1\,000\,000 \quad (2.5)$$

Donde:

SST=Sólidos suspendidos totales (mg/L).

P₁= Peso del crisol a peso constante (g).

P₃=Peso del crisol a peso constante + peso del residuo seco (g).

V=Volumen de la muestra (5 mL)

Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Son aquellos sólidos restantes después de quemar los SST durante dos horas a 550 ± 50 °C, es decir, es el contenido de cenizas. Los sólidos suspendidos volátiles incluyen principalmente materia en suspensión, coloides y materias orgánicas disueltas en la materia prima. Los SSV generalmente se expresa en porcentaje (Deng *et al.*, 2020).

El peso perdido en el crisol tras la incineración del residuo seco representa el contenido en Sólidos Volátiles. Tal como los Sólidos Suspendidos Totales, esta técnica analítica se hizo según el procedimiento estándar 2540 APHA (2017), y contenido de SSV se calcula usando la Ecuación 2.6:

$$SSV = \frac{P_3 - P_4}{V} \times 1\,000\,000 \quad (2.6)$$

Donde:

SSV=Sólidos volátiles (mg/L).

P_3 =Peso del crisol a peso constante + peso del residuo seco (g).

P_4 =Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada (g).

V=Volumen de la muestra (5 mL)

Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)

La concentración de AGV's se cuantificó por Cromatografía líquida de alta eficacia, mediante un HPLC Waters 600 utilizando un detector de matriz de fotodiodos Waters 996. Se analizó la presencia de los principales AGV's en la DA, los cuales fueron ácidos láctico, fórmico, acético, propiónico, butírico y valérico.

Contenido de metano

El contenido de metano se determinó en un cromatógrafo de gases Buck 310 compuesto por una columna capilar de All Tech CRT I, de 6 in de longitud y ¼ in de diámetro. La dosis de inyección directa es manual utiliz gas de acarreo, la temperatura

de la columna a 36 °C y la temperatura del detector a 121 de 2 mL y las condiciones de operación son: la utilización de helio a 70 psi.

2.5.2 Análisis físico de la biopelícula

Se calculó la Materia Volátil Adherida (MVA) al soporte (LF y LFI), por el procedimiento gravimétrico de sólidos volátiles, que se apoya en tomar muestras de los lechos en tres partes superior, media e inferior. Tomando 3 mL y colocándolos en muestreadores metálicos a peso constante. Se secaron a 105 °C por 24 h y se calcinaron a 550 °C a lo largo de 2 horas; con la diferencia de pesos se obtuvo la MVA, que es equivalente a la biomasa en g/L. La biopelícula se fotografió al inicio del arranque (Etapa 1) y al final de cada una de las Etapas 2, 3 y 4 para observar su desarrollo.

2.5.3 Caracterización de las comunidades microbianas

Se procedió a realizar la caracterización de las poblaciones presentes de *Archaea* y *Bacteria*, analizando el ADN genómico (ADNg), bajo el siguiente procedimiento:

1) Muestreo

Las muestras de la biopelícula del RAH se colectaron del lecho fijo (LF), raspando con una espátula y colocando en un tubo falcon previamente esterilizados y del Lecho Fluidizado Inverso (LFI) tomando soporte extendosphere colonizado, de la sección superior, media e inferior, que de igual manera se colocaron en tubos falcon esterilizados, con el fin de evitar impurezas en los resultados. La toma de muestras se realizó al inicio de la Etapa 1 y al final de las Etapas: 2 de estabilización ($C_{va}=8$ gDQO/L•d), 3 de primer incremento de carga orgánica ($C_{va}=16$ gDQO/L•d) y 4 de segundo incremento de carga orgánica ($C_{va}=20$ gDQO/L•d) cuando se aplicó el cambio de carga volumétrica aplicada. En la Tabla 2.3 se observa la cantidad de muestra que se tomó para cada uno de los análisis y su correspondiente extracción de ADNg.

Tabla 2.3. Muestreo para análisis de dinámica microbiana

Determinación	Cantidad
Dinámica microbiana en biopelícula adherida al LF	5 mL
Dinámica microbiana en biopelícula adherida al soporte en el LFI	5 mL
Dinámica microbiana en biomasa suspendida	20 mL
Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)	50 mL

Una vez tomadas las muestras de biopelícula y biomasa suspendida, se llevaron a refrigeración a una temperatura de 4°C y las muestras de AGV's se congelaron, para posteriormente trasladarlas al Laboratorio de Biología Molecular del Centro universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara.

2) Conservación de muestras

El proceso de conservación y extracción de ADNg de las muestras de la biopelícula en el LF y la biomasa suspendida se llevó a cabo tomando como base el método de Godon *et al.* (1997). Inicialmente las muestras de biomasa suspendida y biopelícula en el LF se llevaron a centrifugación durante 10 min a 7,000 rpm en la centrífuga Eppendorf 5810R a 8 °C y posteriormente se retiró el sobrenadante. El botón de biomasa en el tubo se retiró con espátula esterilizada y se llevó a un mortero esterilizado y congelado previamente a -20°C. Ahí mismo se le agregaron 4 mL de tiocianato de guanidina 0.1 mol/L de Tris-HCl (pH 7.8), y se maceró la muestra, después se le agregaron 0.6 mL de N-lauroil sarcosina al 10 % a la biomasa, y se tomaron ocho alícuotas de 0.5 mL que se llevaron a ocho microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug previamente etiquetados con la clave correspondiente.

Por otro lado, las muestras de la biomasa adherida al soporte fluidizado se procesaron para su conservación partiendo del protocolo publicado por Cresson *et al.* (2009). Se inició lavando las muestras agregando 30 mL de PBS 1X en dos tubos para centrifuga de 50 mL esterilizados, ahí mismo se agregó la cantidad aproximada de 6 mL de la muestra de la biomasa adherida al soporte fluidizado, se cerraron los tubos y se agitaron ligeramente. Inmediatamente se realizó la remoción del PBS 1X en ambos tubos sin coleccionar el líquido donde están los soportes colonizados usando una micropipeta. Posteriormente, se realizaron dos lavados más agregando 30 mL de PBS 1X. Una vez terminados los lavados correspondientes, el líquido que contiene a los soportes colonizados en ambos tubos de 50 mL se agregó a un mortero esterilizado y congelado. En seguida, se añadieron 4 mL de Tiocianato de guanidina al mortero con la muestra, se procedió a macerar la muestra con el pistilo esterilizado para lograr desprender la biomasa de los soportes colonizados hasta observar la presencia de restos de biomasa en la suspensión. Después, se añadieron 0.6 mL de N-lauroil sarcosina al 10 %. Finalmente, se mezcló suavemente para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla y se repartió en ocho alícuotas de 0.5 mL en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug previamente etiquetados con la clave correspondiente.

Las muestras conservadas fueron clasificadas tal como se indica en la Tabla 2.4. Las muestras en los microtubos de 2 mL se metieron al congelador para ser conservadas a -20 °C dentro de las cajas criogénicas previamente etiquetadas.

Tabla 2.4. Clasificación de las muestras conservadas de biomasa

Etapa	Descripción de la muestra	Clave
1	Inóculo: biopelícula adherida al soporte fluidizado (perlas de Extendsphere)	C1
2	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	C2
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	C3
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	C4
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	C5
3	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	C6
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	C7
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	C8
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	C9
4	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	C10
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	C11
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	C12
	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	C13

3) Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se realizó el mismo procedimiento para todas las muestras de Biopelícula tanto del LF y el LFI. Se comenzó agregándole 0.5 mL de Lauril-Sarcosina al 5 % a la muestra conservada y llevándola a baño seco a 70 °C durante una hora. Mientras tanto se preparó el hielo triturado, ya que la extracción se realiza en frío para evitar la degradación del ADN. Finalizada la hora del baño seco, la muestra se llevó al hielo y ahí mismo se le añadió 0.5 mL de perlas de zirconio esterilizadas para iniciar el lisado de las células en el triturador vibratorio Bead Bug modelo D1030, en condiciones de 300 rpm, 400 de velocidad y 60 de tiempo.

Al finalizar el tiempo en el triturador vibratorio, se llevó la muestra al hielo y se le agregó 15 mg de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) para fijar los ácidos húmicos que actúan

como inhibidores de la ADN polimerasa. El tubo se cerró y se llevó a centrifugación durante 3 minutos a 12,000 rpm en la centrífuga MiniSpin plus (Eppendorf). Posteriormente, se colocó el tubo nuevamente en el hielo y se le agregaron 0.5 mL de TENP, y se centrifugó durante 3 minutos a 12,000 rpm, la solución TENP recupera el ADN en el sedimento y lo suspende en el sobrenadante, por lo que una vez terminada la centrifugación el sobrenadante se recuperó en una cantidad 0.4 mL en otro microtubo de 2 mL. Este procedimiento se repitió dos veces más hasta obtener un microtubo con 1.2 mL de sobrenadante.

El sobrenadante recuperado se repartió en dos microtubos de 2 mL (0.6 mL en cada uno) y se les añadió la cantidad de 0.6 mL de isopropanol, y se agitaron suavemente durante 3 minutos. El isopropanol precipita el ADN durante la agitación, donde se puede observar el cambio de densidad del líquido. Se deja reposar y después se lleva a centrifugación durante 15 min a 14,500 rpm en la centrífuga Eppendorf modelo MiniSpin plus. Finalizando la centrifugación se desechó el sobrenadante y se agregó a uno del microtubo 0.2 mL de agua para PCR, lavando el botón y traspasándolo al siguiente microtubo, para tener la suspensión de ADN completa. En seguida se añadieron 0.01 mL de RNAsa a 2.5 mg/mL, y se incubó en baño seco 37°C durante 30 min, para proceder a la eliminación de impurezas del ADN.

4) Purificación de ADN

La eliminación de impurezas en el ADN extraído se realizó utilizando el Kit QIAamp® DNA, y mediante centrifugaciones a 14,000 rpm durante 3 minutos. Primero se agregaron 0.2 mL del Buffer AL y se llevó a incubación en baño seco a 70°C durante 10 min. Después, se agregaron 0.2 mL de etanol puro y se realizó la primera centrifugación a las condiciones dadas anteriormente. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de los Buffer AW1 y AW2 entre cada uno de ellos también se realizó una centrifugación. Finalmente, se agregaron 0.05 mL del Buffer AE y se centrifugó durante 3 minutos a 8,000 rpm. Se recuperaron aproximadamente 0.04 mL de ADN que se llevaron a congelación -20 °C.

5) Visualización del ADN

La visualización de la talla y distribución de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, y se leyó en un equipo fotodocumentador Bio-RAD modelo Gel Doc™ EZ Imager.

6) Medición de la pureza y concentración del ADN

La cantidad y la pureza del ADN extraído se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Nanodrop 2000.

7) Secuenciación genética masiva por el método Illumina

La composición de la comunidad procariota de la biopelícula en el LF y en el soporte colonizado se determinó mediante secuenciación genética masiva o secuenciación de próxima generación (NGS) en la plataforma Illumina MiSeq. Las muestras de ADN extraído se enviaron al Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Genómica Microbiana del Centro de Investigación en la Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) para su procesamiento, en donde se analizaron 7 de las 13 muestras mediante la región 16S-V4, la cual se amplificó por PCR utilizando los primers V4-515f y V4-806r¹ con adaptadores Illumina. Las muestras se cuantificaron en Qubit y se mezclaron en un pool equimolar para ser secuenciadas en el equipo Miniseq de Illumina en condiciones estándar (300 ciclos, 2X150).

Para la clasificación en taxones se realizó un análisis bioinformático, procesando las 7 muestras con un total de 492,035 secuencias en formato fastq, en promedio 70,290 secuencias por muestra. Se realizaron tres procesos bioinformáticos básicos: 1) limpieza de secuencias con pair-end_cleaner v1.1.0 2) eliminación de secuencias quiméricas con chimera_detector v1.5.1 y 3) clasificación de las secuencias en taxones con mg_classifier v1.8.5

La composición de las comunidades microbianas se expuso en porcentaje de abundancia relativa para las poblaciones procariotas dominantes. A partir de los resultados de la secuenciación genética masiva (metagenómica), se analizó la

abundancia relativa y dinámicas poblacionales para interpretar el desempeño del RAH en la producción de Biogás.

2.6 Correlación de la dinámica microbiana con las variables operativas

Finalmente, se procedió a realizar un Análisis de Componentes Principales (ACP o PCA por sus siglas en inglés Principal Components Analysis) tomando en cuenta todas las variables del proceso, es decir los datos biológicos, fisicoquímicos y operativos. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el software Statgraphics centurion XV (Statpoint Technologies Inc.), ya que es un programa pensado en facilitar el estudio detallado del análisis multivariable, lo que es común en el área de investigación de procesos biológicos como la digestión anaerobia y los múltiples factores que afectan en el proceso.

El análisis se realizó considerando únicamente los componentes principales con valores del parámetro eigenvalores >1 con el objetivo de explicar la variación total de los bioprocesos analizados.

CAPÍTULO 3.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización del sustrato

Los sustratos utilizados que fueron la fracción líquida de los residuos sólidos orgánicos (FLRSO) hidrolizada y bruta se caracterizaron mediante los parámetros mencionados en el capítulo 2 y los resultados de dicha caracterización vs otros autores se observan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Caracterización de la FLRSO vs otros autores

Parámetro	Unidad	Presente investigación		Cruz-Ramos (2019)	Rosas-Mendoza (2018)
		FLRSO hidrolizada	FLRSO bruta		
SST	g/L	5.24 ± 0.18	10.6 ± 0.73	6.3	6.39 ± 0.88
SSV	g/L	1.08 ± 0.39	9.48 ± 0.69	2.7-4.7	4.10 ± 0.84
DQO _T	g DQO/L	8.63 ± 0.07	39.57 ± 0.98	9.5-11	14.79 ± 2.03
DQO _s	g DQO/L	7.99 ± 0.28	35.48 ± 0.49	7.5	12.50 ± 1.79
pH	-	7.9 ± 0.60	5 ± 0.2	6.7 ± 0.3	6.78 ± 0.21

Los resultados mostraron que el sustrato hidrolizado tuvo aproximadamente 20 % de materia orgánica (SSV) del total de SST y la DQO_s representa alrededor de 92 % de la DQO_T, en cambio para el sustrato bruto, la materia orgánica como SSV representa alrededor del 90 %, y la DQO_s también representa alrededor del 90 % de la DQO_T lo que es lógico ya que el sustrato bruto no había sido tratado, por lo cual el contenido de materia orgánica es mayor. En cuanto al pH se encontró arriba de 7.5 para el sustrato hidrolizado, lo que fue de gran ayuda para el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, el pH de la FLRSO bruta fue de 5 ± 0.2 por lo que se necesitó NaOH para regular el pH en el rango de 7±0.2 ya que Hussain *et al.*, (2021) en su estudio enfocado a los efectos del pH en DA reportaron que el valor de 7.0

favorece la producción de biogás ya que se encuentra dentro del nivel adecuado de 6.4-7.6. En comparación con Cruz-Ramos (2019) y Rosas-Mendoza (2018) la diferencia en los resultados de los parámetros medidos depende fuertemente de la temporada en que los residuos sólidos orgánicos son recolectados.

3.2 Caracterización del inóculo

En cuanto a la caracterización inicial del soporte previa al arranque del RAH, los resultados se muestran en la Tabla 3.2, que tomando como referencia el valor máximo de colonización de 0.21 gBiomasa/gSoporte (Buffierre *et al.*, 2000), el soporte colonizado al inicio presentó 36.19, 35.43, y 36.18 % de colonización para la sección superior, media e inferior del LFI, respectivamente. Tomando en cuenta el 1.5 L de soporte obtenido para el RAH y la relación gBiomasa/gSoporte, la cantidad de biomasa al inicio fue aproximadamente de 36.35 ± 2.01 g.

Tabla 3.2. Materia Volátil Adherida al soporte.

Sección LFI	Soporte (g)	Biomasa (g)	Biomasa:Soporte (g/g)	Biomasa:Soporte (g/mL)	Colonización (%)
S	0.8724	0.0663	0.0760	0.0248	36.19
M	0.7794	0.0580	0.0744	0.0227	35.43
I	0.8068	0.0613	0.0760	0.0252	36.18

Secciones de lecho fluidizado inverso: S, superior; M, Media; I, inferior

En la Figura 3.1 es posible apreciar ligeramente la biopelícula formada en el soporte extensosphere colonizado.

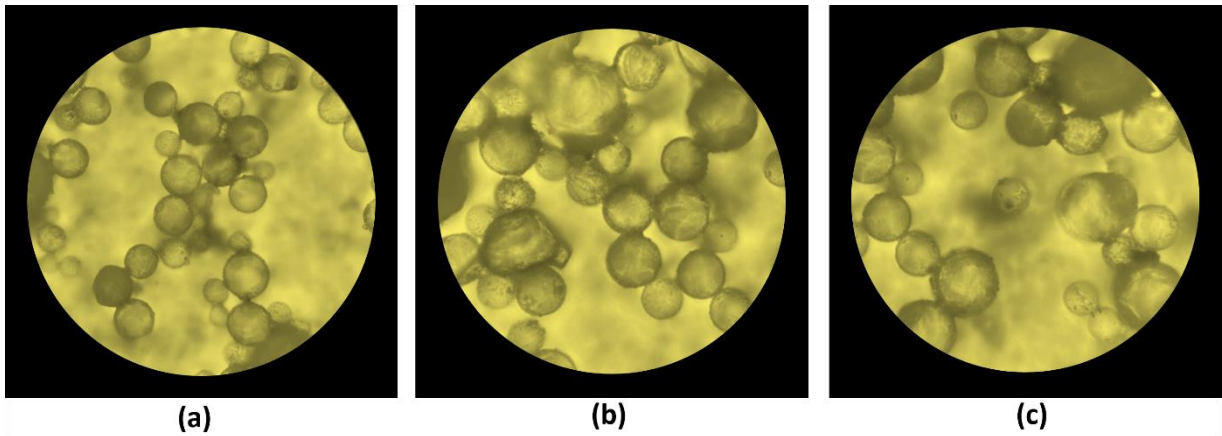


Figura 3.1. Biopelícula formada en soporte extendosphere, en la etapa inicial del proceso (a) Superior (b) Media (c) inferior.

Reyes-Rosas (2019) determinó este parámetro al soporte colonizado después de 141 días de operación y obtuvo un 80 % de grado de colonización, lo que indica que una vez operado el reactor la cantidad de biomasa aumentará, además de que el soporte al estar precolonizado, se alcanzó ese grado de colonización, en un periodo menor de tiempo.

3.3 Montaje y mantenimiento del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

Se realizó el montaje del RAH diseñado anteriormente por Rosas-Mendoza (2018), las dimensiones del reactor de la parte del LF y el LFI se muestran en las Tablas 3.3 y 3.4 respectivamente.

Tabla 3.3. Dimensiones para el lecho fijo del RAH.

Dimensión	Valor	Unidad
Longitud	23	cm
Diámetro	7.62	cm
Volumen total	1.05	L
Volumen útil	0.26	L
Volumen ocupado	0.79	L

Tabla 3.4. Dimensiones para el lecho fluidizado inverso del RAH

Dimensión	Valor	Unidad
Longitud	80	cm
Diámetro	8.89	cm
Volumen total	4.96	L
Longitud del lecho	24	cm
Volumen de líquido	2.5	L
Volumen de lecho	1.5	L
Soporte colonizado	1.5	L

Se observa en la Tabla 3.3 que el 75 % del volumen del LF que se encuentra ocupado por 331 anillos de material polimérico que colaboran como medio de soporte fijo para los microorganismos presentes en el proceso este se puede observar en la Figura 3.2, además de realizar las funciones de distribución de flujo.

De acuerdo con las dimensiones de la Tabla 3.4 el LFI tiene 80 cm de longitud lo que restando la longitud que corresponde al lecho y al sustrato, la cámara de biogás representa el 20 % de la longitud de biogás y se encuentra en la parte superior del LFI, esto se puede observar en la Figura 3.3



Figura 3.2. Lecho Fijo del RAH.



Figura 3.3. Lecho Fluidizado del RAH.

3.4 Operación continua del Reactor Anaerobio Híbrido

La operación del RAH se llevó a cabo durante 4 etapas, variando la carga volumétrica aplicada (Cva). A continuación, se muestran los resultados del parámetro de operación Sustrato/Biomasa y los parámetros obtenidos del monitoreo del proceso con las determinaciones de pH, DQOT, DQOS, SST, SSV, AGV's, y alcalinidad, así como también la producción de biogás y rendimiento de metano, durante cada día de operación.

3.4.1 Relación Sustrato-Biomasa.

En la Etapa 1 la Cva presento una variación de la carga orgánica que oscilo entre los 5-8 gDQO/L•d. Las condiciones de operación fueron pH>7.5, una temperatura de 35 °C. Lo que cambio para la Etapa 2, 3 y 4, ya que el pH de entrada al RAH se mantuvo entre 6.8 y 7.2.

Se estimó con la ecuación 2.3, la relación de sustrato-biomasa (So/Xo) al inicio de cada etapa. Los resultados se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Relación Sustrato/Biomasa

Etapa	$\frac{\text{g Biomasa}}{\text{m}^3 \text{ L de soporte}}$	Xo (g Biomasa)	DQOE (g/L)	Q (L)	So (g/L)	So/Xo
0	0.0242	36.35	7.55	1.70	12.84	0.3531
1	0.0265	39.75	9.05	1.80	16.29	0.4099
2	0.0293	44.00	8.26	2.50	20.64	0.4691
3	0.0294	44.15	16.26	2.50	40.66	0.9210
4	0.0411	61.61	20.33	2.50	50.83	0.8251

Para la Etapa 0 y 1, se tuvo So/Xo=0.35 y 0.40 lo que indica que para el inicio del proceso de DA y una vez estabilizado, predomina la biomasa ante la concentración del sustrato. Sin embargo, para las etapas finales el valor de la relación aumento con valores cercanos a 1, lo que se considera un valor ideal ya que hay suficiente alimentación para la cantidad de microorganismos presentes en el proceso.

3.4.2 Comportamiento del potencial de hidrógeno

Durante el arranque y operación del RAH se trató la FLRSO hidrolizada, la cual de los días 1 al 27 tuvo un pH alto esto se le atribuye a que la materia orgánica al parecer ya se encontraba degradada, ya que Lohani *et al.*, (2018), mencionan que los valores de pH superiores a 8 inhiben las funciones biológicas para los microorganismos anaerobios, y como se observa en la Figura 3.4, durante ese periodo no hubo una producción de biogás detectable. De acuerdo con Ostrem *et al.*, (2004) esto se puede solucionar añadiendo una mayor cantidad de FLRSO fresca.

Por lo que a partir de ese día se trabajó con la FLRSO bruta con una composición ácida su pH oscilo entre 4.9-5.2 por lo que se neutralizo el pH entre 6.8 y 7.2, utilizando una solución de NaOH 3M con el objetivo de que el medio no se acidificará durante el tiempo de operación, ya que el nivel adecuado para favorecer la producción de biogás debe estar en un rango de 6.4 a 7.6 (Hussain *et al.*, 2021). Lo anterior facilito la estabilización del RAH y la producción de biogás.

De acuerdo con la Figura 3.4 el pH de entrada, salida e interior del reactor durante la Etapa 2 de estabilización se mantuvo en el rango adecuado. Sin embargo, una vez realizado el cambio de carga orgánica para pasar a la Etapa 3 ($C_{va}=16$ gDQO/L•d), el comportamiento del pH a la salida del RAH fue en aumento, hasta el final de la misma etapa que logró estabilizarse, entrando nuevamente en el rango adecuado. Por otro lado, para la Etapa 4 cuando la C_{va} se incrementó hasta 20 gDQO/L•d, el pH interior y pH de salida aumento considerablemente a comparación de las Etapas anteriores. A pesar de que este aumento de pH puede inhibir las funciones biológicas de microorganismos anaerobios, también es indicador de una metanogénesis prolífica (Lohani y Havukainen, 2018), por lo tanto, es posible asumir que la población microbiana metanogénica sobre la población acidogénica fue abundante en las etapas finales.

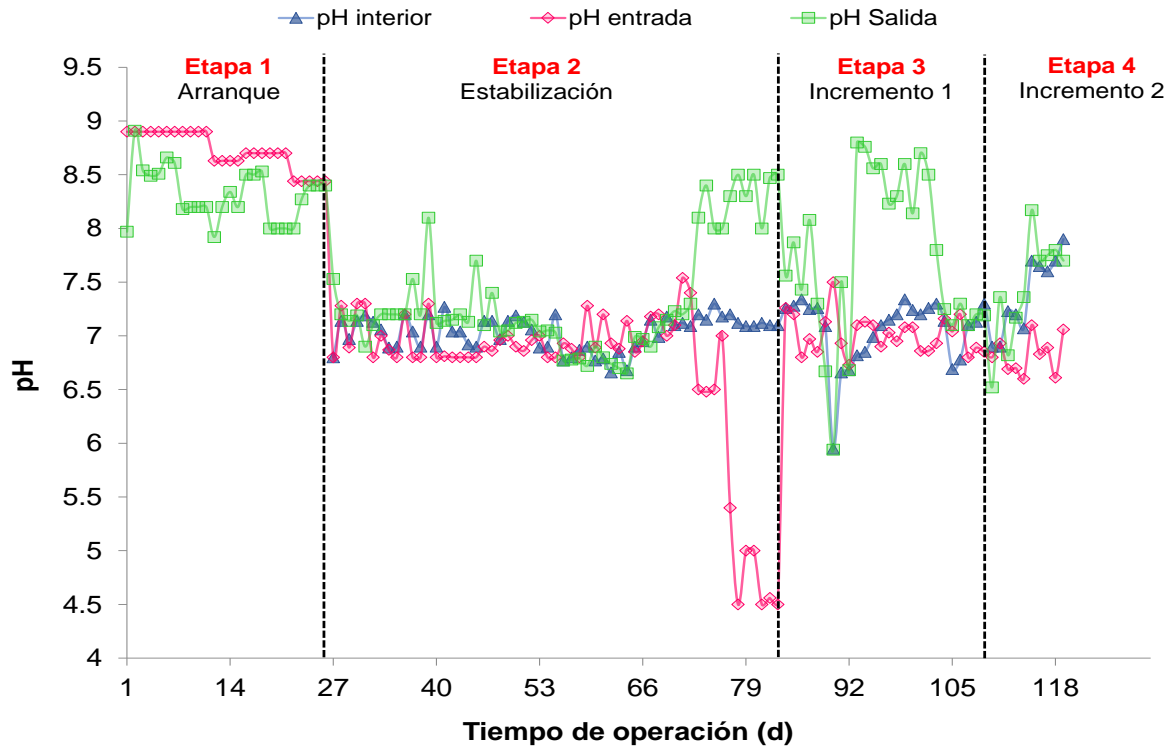


Figura 3.4. Monitoreo del pH en la entrada, salida e interior, durante la operación del RAH.

3.4.3 Remoción de la Demanda Química de Oxígeno

Los valores del % de remoción de DQO_T y DQO_s en los primeros días de operación como se observa en la Figura 3.5 que corresponden a la Etapa 1 de arranque alcanzaron el 18.7 % y 3.33 % respectivamente, sin embargo, posterior a estos días se logró remover alrededor del 90 % de la DQO, lo que se debió a la estabilización del sistema en cada cambio que se realizó.

Como se ha mencionado, el crecimiento de los microorganismos está influenciado por factores como el pH, la composición variable del sustrato de entrada y las variaciones de la Cva (Akunna, 2019). Lo que también se ve evidentemente en la Figura 3.5 en donde se muestran los porcentajes de DQO, durante el arranque en los días 0-25 fueron muy bajo menores al 15 %, debido a que los microorganismos dirigieron el flujo de carbono hacia la formación de la biopelícula, produciendo un volumen de biogás no detectable, ya que el soporte se encontraba colonizado a un 35 %; sin embargo, a

partir del día 25-83 en la estabilización se observó un comportamiento creciente que alcanzó remociones superiores al 95 % tanto en la DQO_T como la DQO_S .

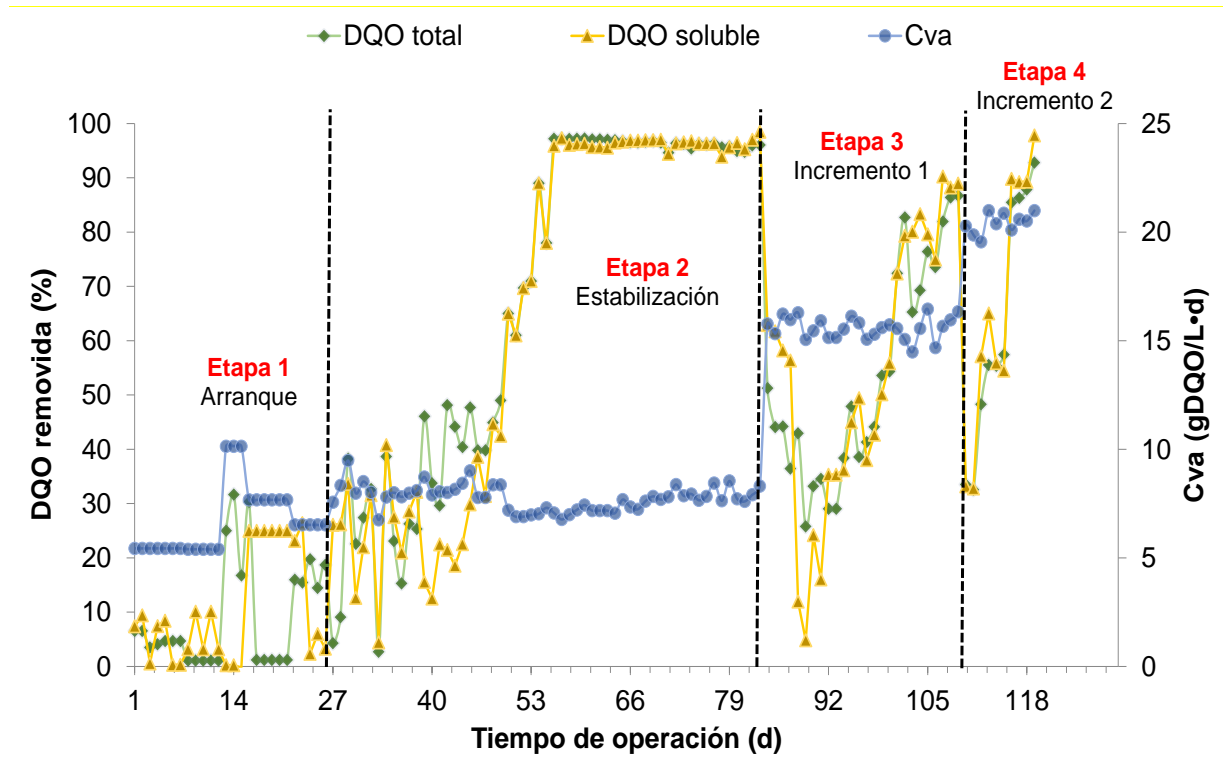


Figura 3.5. Porcentajes de remoción de la DQO_T y DQO_S , durante la operación del RAH.

Por otro lado, en la Etapa 3 cuando se aplicó el cambio de Cva, el RAH tardó menos tiempo en alcanzar remociones superiores al 80 % con un mayor volumen de biogás y un rendimiento mayor (Figuras 3.8 y 3.9), lo que coincide con el porcentaje de colonización en esta etapa que ya superaba el 80 % en el soporte fluidizado. Para la Etapa 4 se observa que logró alcanzar remociones superiores al 85 % en menos tiempo es decir 10 días, lo que se relaciona nuevamente con la colonización alcanzada en estos días de operación.

3.4.3 Remoción de Sólidos Suspendedos Totales y Sólidos Suspendedos Volátiles

En cuanto a los resultados del monitoreo de % de remoción de SST y SSV en la Figura 3.6 coincide con el incremento de las remociones de la DQO, para cada etapa de operación.

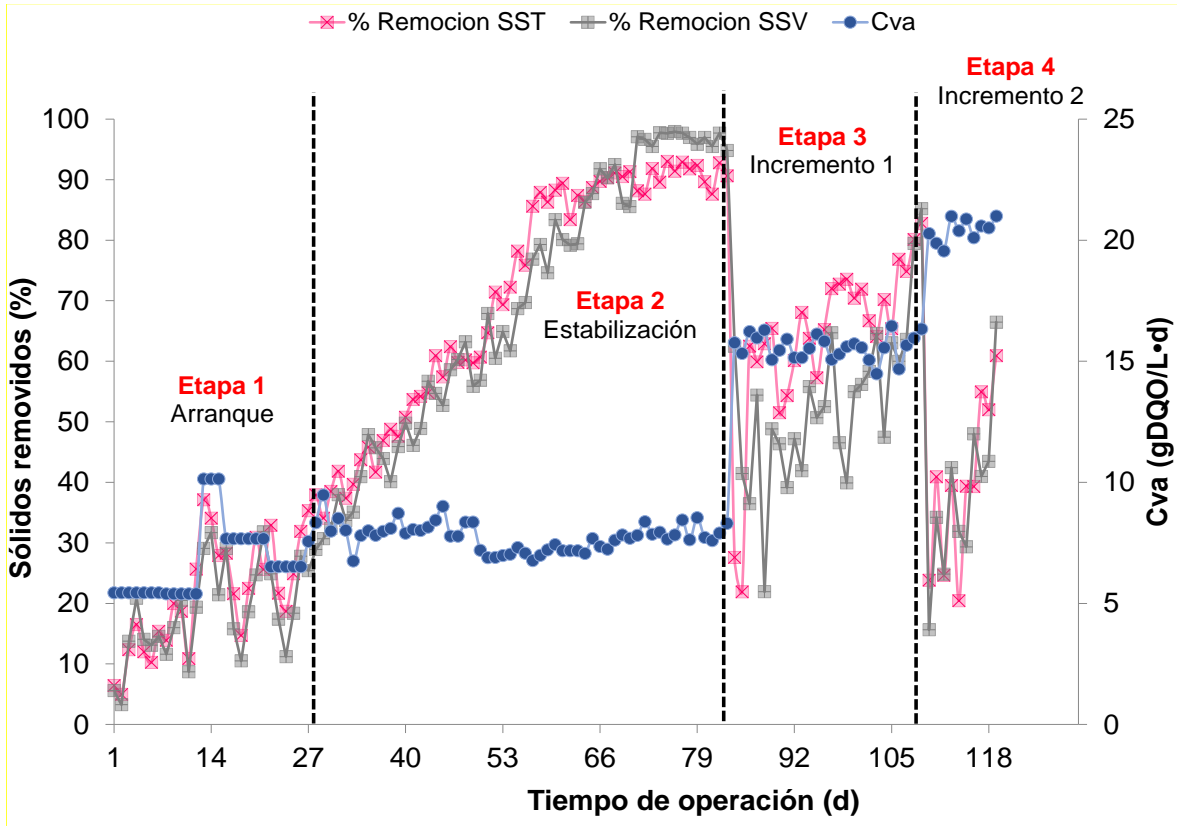


Figura 3.6. Porcentajes de remoción de SST y SSV, durante la operación del RAH.

En la Figura 3.6 A partir del día 27 la remoción de estos parámetros fue creciente superando el 90 % de remoción de la materia orgánica que es consumida por los microorganismos presentes y activos en el proceso. También es posible resaltar la sensibilidad de las comunidades microbianas a los cambios de alimentación, ya que una vez aumentado la carga orgánica, la remoción para SST y SSV tuvo un decremento, a pesar de ello, gracias a la capacidad de adaptación de los microorganismos, la remoción fue aumentando con el paso de los días de operación,

hasta alcanzar valores superiores al 85 % para la Etapa 3 y arriba del 60 % para la Etapa 4. A pesar del porcentaje más bajo de remoción en la última etapa se observa que transcurriendo los días este puede aumentar ya que posee el mismo comportamiento creciente.

3.4.4. Alcalinidad del proceso de DA

El factor de alcalinidad α , es un parámetro más que indica la estabilidad del proceso dado por la relación de alcalinidades intermedia y total, debe ser $\alpha < 0.3$ para garantizar la estabilidad el proceso, ya que gracias a este factor es posible prevenir una acidificación del sistema debido a los AGV's (Bernard *et al.*, 2000). En la Figura 3.7 es posible observar los cambios de alcalinidad con respecto a la variación de la Cva, este parámetro fue monitoreado a partir del día 27 cuando ya había volumen de biogás detectable.

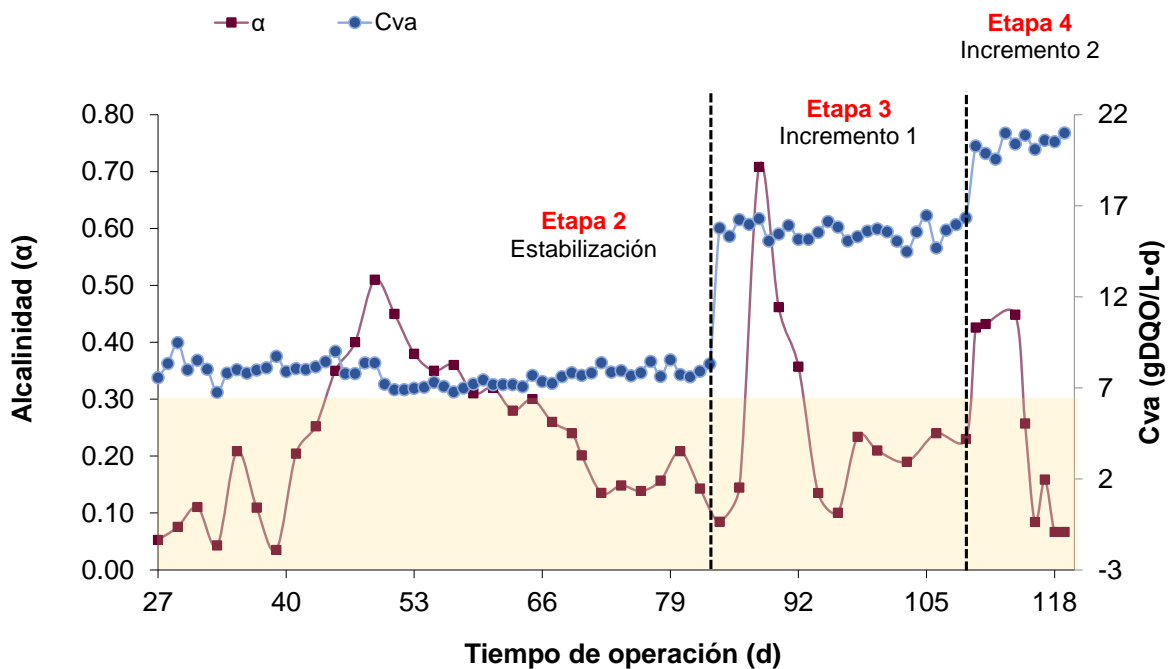


Figura 3.7. Factor de alcalinidad por etapas de operación.

Se puede observar que al principio de cada cambio de Cva, el factor de alcalinidad sufre una perturbación aumentando el valor de este, sin embargo, transcurriendo los días hacia la estabilización de cada etapa, el factor se encuentra dentro del valor correcto menor a 0.3. Este índice al estar fuertemente relacionado con el tipo de sustrato es posible lograr la estabilidad del proceso con valores diferentes del valor de referencia ($\alpha < 0.3$) (Foresti, 1994), siendo recomendable su verificación, tomando en cuenta los otros parámetros como la remoción de DQO y el rendimiento de metano.

3.4.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's) en el proceso

La concentración de ácidos grasos volátiles para el final de las etapas 2, 3 y 4 se muestran en las Figuras 3.8 a 3.10. Se excluye de los análisis los AGV's en el arranque del RAH, ya que no fueron detectados.

Durante la etapa 2 (Cva 8 gDQO/Ld), se observó el consumo de ácido acético en el sustrato y se produjo principalmente acetato y ácido fórmico en concentraciones bajas. En esta etapa no se detectaron ácido propiónico ni butírico.

En la etapa 3 con el primer incremento de Cva a 16 gDQO/Ld, los ácidos fórmico, acético y propiónico en el sustrato fueron consumidos; mientras que, continuó la producción de acetato aumentando significativamente hasta una concentración cercana a 1 g/L, así como también en esta etapa se produjeron ácido propiónico y butírico.

En la etapa 4 con una Cva de 20 gDQO/Ld, se consumieron los ácidos fórmico, acético y propiónico, y se produjeron únicamente acético y propiónico, resaltando que se dejó de producir el ácido butírico. En esta etapa la producción de los ácidos fue en concentraciones más bajas en comparación con la etapa anterior.

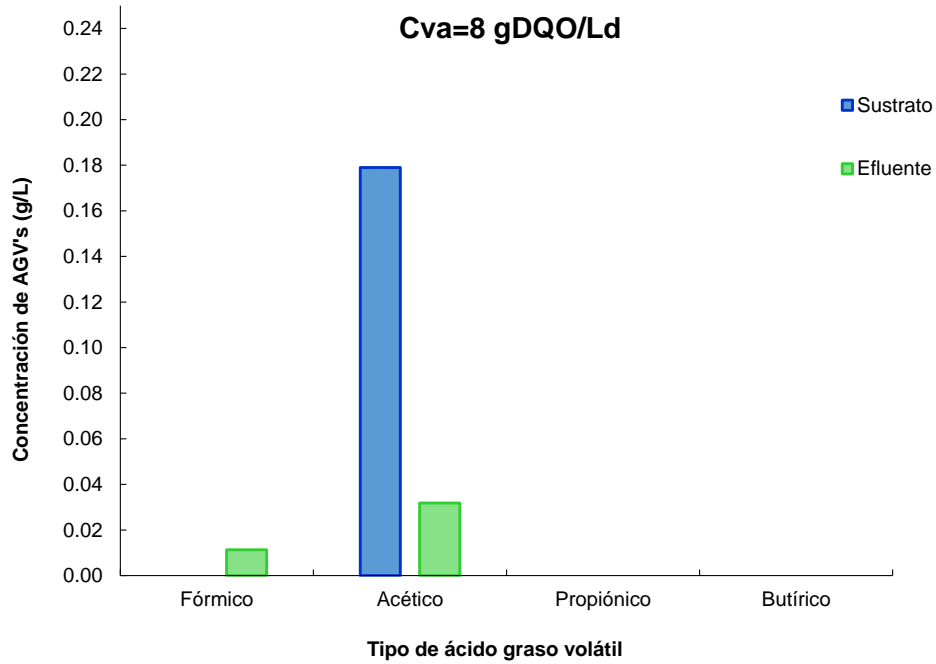


Figura 3.8. AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 2.

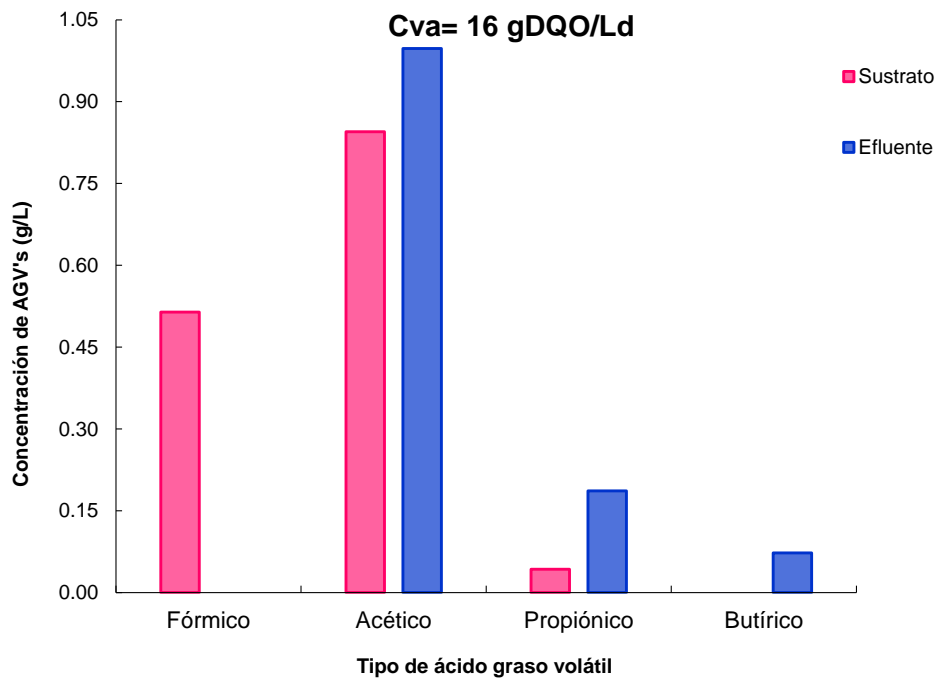


Figura 3.9. AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 3.

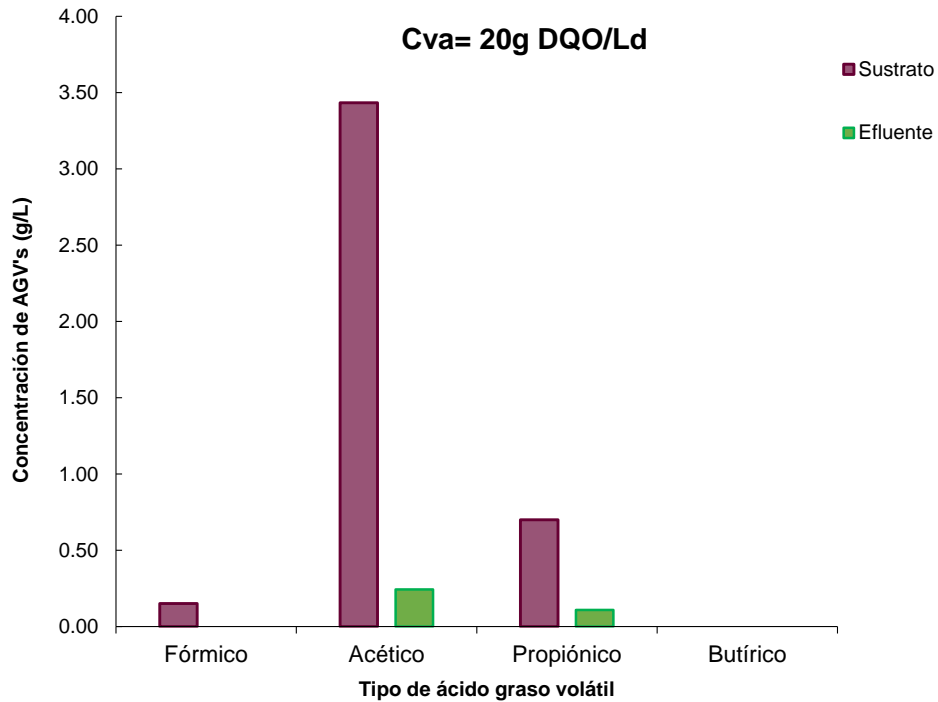


Figura 3.10. AGV's en el sustrato y efluente finalizando la etapa 4.

3.4.6. Producción de Biogás y rendimiento de metano

El consumo de la materia orgánica por parte de las comunidades microbianas se vio reflejado tanto en el aumento del porcentaje de colonización del soporte fluidizado, como en la producción de biogás y un mejor rendimiento de metano. En las Figuras 3.11 y 3.12, se observa como varían la producción de biogás y el rendimiento de metano, en consecuencia, de los cambios de Cva para cada una de las etapas.

Para la Etapa 2 se alcanzó un volumen superior a los 10 L de biogás con un rendimiento de 0.33 a 0.35 L CH₄/gDQO_{rem}, y en comparación para la Etapa 3, se tuvo mayor volumen de producción de biogás alrededor de 20 L con un rendimiento 0.31 a 0.35 L CH₄/gDQO_{rem}. Sin embargo, para la Etapa 4 con alta carga orgánica se mantuvo la producción de biogás superando los 20 L y el rendimiento de metano, oscilo entre 0.29-0.33 L CH₄/gDQO_{rem}

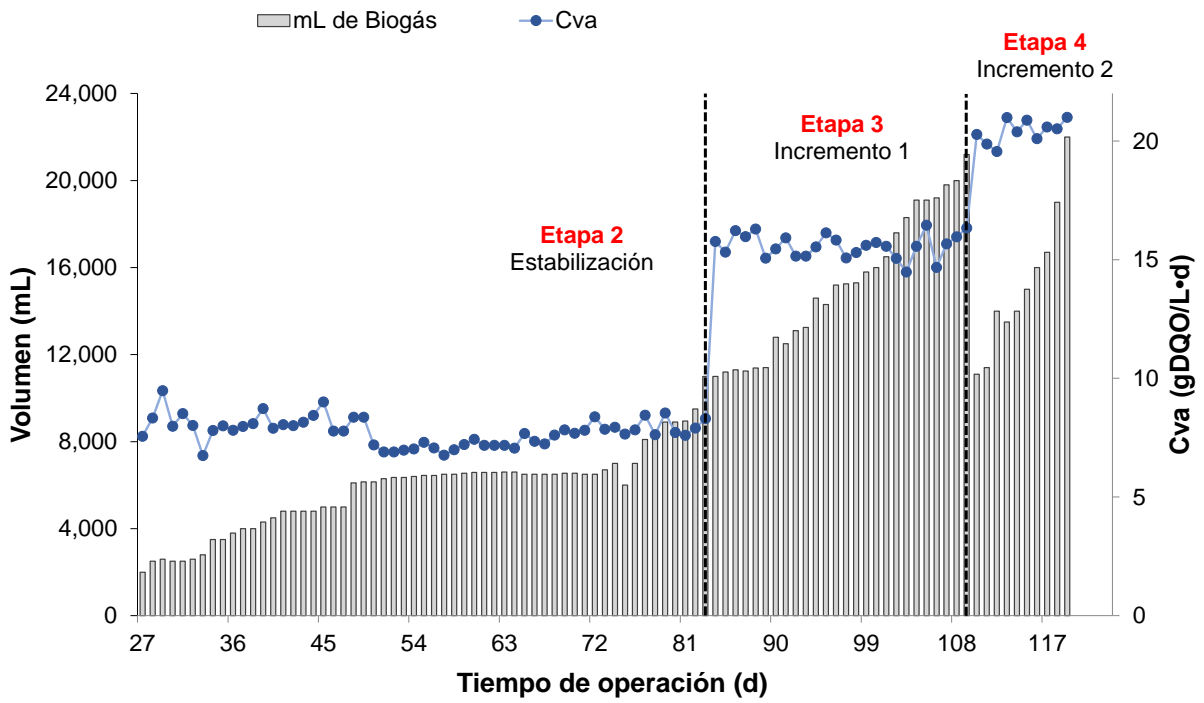


Figura 3.11. Cva alimentada al RAH y su producción de biogás, por etapas de operación.

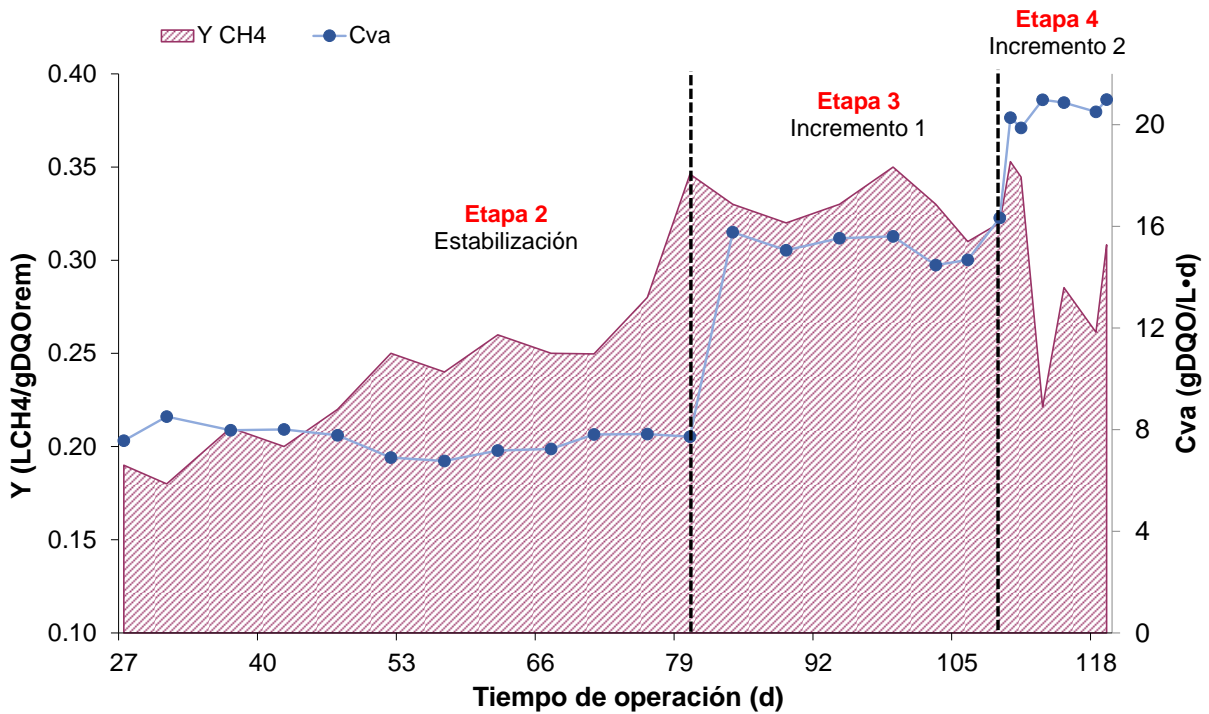


Figura 3.12. Cva alimentada al RAH y el rendimiento de metano, por etapas de operación.

3.5. Desarrollo de la biopelícula en el RAH

Como se mencionó se tomaron muestras de soporte Extendsphere™ en la parte del Lecho Fluidizado Inverso, en las secciones: superior, media e inferior en la Tabla 3.6 se muestran los resultados obtenidos por Materia Volátil Adherida.

Analíticamente se puede observar el crecimiento de la biopelícula por sección del soporte colonizado, donde la sección superior e inferior resultaron ser las que contenían mayor cantidad de biomasa adherida alcanzando hasta 94.63 % y 95.37 % de colonización con 0.0474 y 0.0423 g_{Biomasa}/mL_{Soporte}, respectivamente. Finalmente, la sección media tuvo una colonización superior al 90 % con 0.0464 g_{Biomasa}/mL_{Soporte}.

El hecho que la parte superior e inferior estuvieran más colonizadas se debe a que está en contacto directo con el sustrato, la parte media se encuentra menos colonizada debido las velocidades bajas de fluidización ya que Trinet (1991) menciona que esto beneficia la formación de biopelícula espesa con una mayor cantidad de biomasa activa, en las capas exteriores como las secciones superior e inferior, que consumen grandes cantidades de sustrato.

Tabla 3.6. Desarrollo de la biopelícula en el LFI

Tiempo (d)	Sección LFI	SopORTE (g)	Biomasa (g)	Biomasa/SopORTE (g/g)	Biomasa/SopORTE (g/mL)	Colonización (%)
0	S	0.8724	0.0663	0.0760	0.0248	36.19
25	S	1.1743	0.1233	0.1050	0.0247	50.00
83	S	0.6980	0.0836	0.1198	0.0341	57.03
109	S	0.8759	0.1594	0.1820	0.0399	86.70
119	S	0.6059	0.1204	0.1987	0.0474	94.63
0	M	0.7794	0.0580	0.0744	0.0227	35.44
25	M	0.9477	0.0808	0.0853	0.0269	40.60
83	M	0.7210	0.0623	0.0864	0.0262	41.15
109	M	0.4908	0.082	0.1671	0.0273	76.93
119	M	0.734	0.1393	0.1898	0.0464	90.37
0	I	0.8068	0.0613	0.0760	0.0252	36.18
25	I	0.8276	0.0837	0.1011	0.0279	48.16
83	I	0.6490	0.0740	0.1140	0.0277	54.30
109	I	0.3600	0.0634	0.1761	0.0211	83.80
119	I	0.6341	0.1270	0.2003	0.0423	95.37

Secciones de lecho fluidizado inverso: S, superior; I, inferior; M, Media

La biopelícula al ser una estructura microscópica se puede observar por medio de micrografías, la Figura 3.13 muestra la evolución de la biopelícula adherida al soporte, con el paso del tiempo de operación y por sección del LFI. La estructura de la biopelícula se observa como biomasa microbiana adherida de manera irregular a la superficie de endosferas, esta estructura beneficia la transferencia de masa hacia las poblaciones microbianas de las secciones inferiores y que, además, la vuelve más resistente a que ocurra un lavado de los microorganismos debido a la fluidización del sustrato (Okabe, 1998).

Se puede observar una capa más poblada y espesa en las micrografías de las secciones Superior e Inferior tras 119 días de operación del RAH que coinciden con los resultados de la Tabla 3.7, donde estas secciones son las de mayor colonización, una biopelícula espesa posibilita una combinación de metabolismos anaerobios que puede darle una mayor eficiencia al sistema. Sin embargo, la literatura menciona que una biopelícula delgada como las que se observan de las secciones medias en la Figura 3.10, favorece el tratamiento del sustrato debido a que el intercambio de nutrientes es mejor (Beyenal y Lewandowsky, 2000).

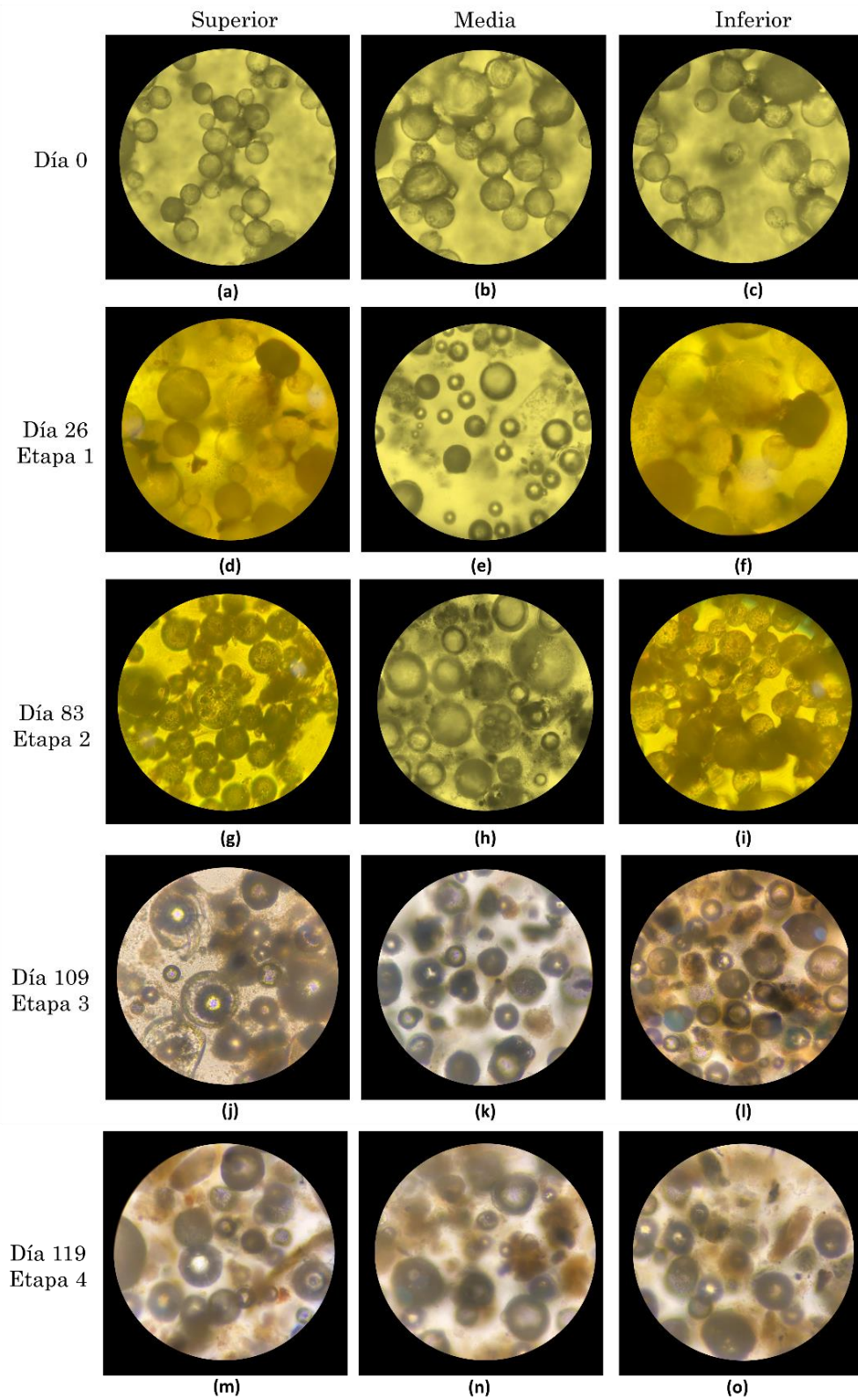


Figura 3.13. Desarrollo de la biopelícula durante la operación del RAH.

3.6. Extracción y cuantificación del ADNg

Los resultados se describen de acuerdo con lo establecido en la Tabla 2.3 de la sección 2.5.3, en metodología.

3.6.1. Integridad del ADN genómico

Los resultados de la electroforesis realizada se muestran en la Figura 3.14 donde se observa que no hubo degradación durante la extracción de ADNg e indicaron que las muestras de biopelícula para cada una de las etapas de operación del RAH tuvieron fragmentos de ADN entre 9 y 20 pb, por lo que fueron consideradas suficientes para continuar con su análisis biológico-molecular.

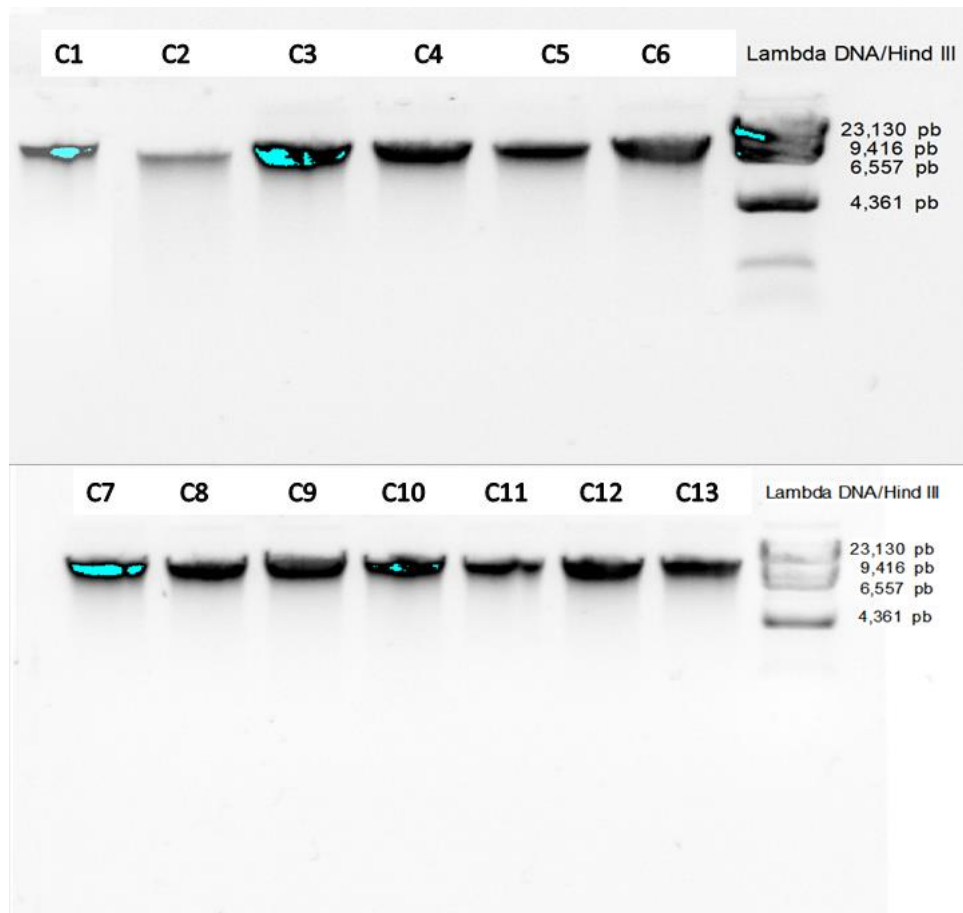


Figura 3.14. Visualización del ADN genómico extraído de las muestras de biomasa del reactor híbrido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %. C1: ADN inóculo; C2 a C5: ADN etapa 1; C6 a C9: ADN etapa 2; y C10 a C13: ADN etapa 3.

En la metodología se tenía considerado analizar muestras de biomasa suspendida, sin embargo, en los resultados de la electroforesis no se observó ADNg por lo que se consideraron como no significativo, y en consecuencia se descartaron estas muestras para el análisis de la dinámica microbiana.

3.6.2. Cantidad y pureza del ADNg extraído

Los resultados mostrados en la Tabla 3.7, indicaron que las concentraciones de ADNg obtenidas fueron entre 25 y 172 ng/ μ L estas concentraciones se consideran suficientes para el posterior análisis de secuenciación genética masiva, que requiere por lo menos 8 ng/ μ L.

La secuenciación genética masiva requiere valores de pureza cercanos a 1.8 con un nivel de aceptación entre 1.7 y 1.9. Se puede observar que las muestras C3 a C12 se encuentran en este nivel.

Por lo tanto, sólo se seleccionaron 7 muestras para continuar con el análisis de secuenciación genética masiva. Las muestras C1 y C2 fueron consideradas para el análisis molecular a pesar de sus condiciones de pureza, por ser únicas y representativas de esas etapas. Las muestras C6 y C10 también se seleccionaron por ser únicas y representar la dinámica poblacional de los incrementos de carga en la sección del lecho fijo. Para las secciones del soporte fluidizado en el final de las etapas se eligieron las muestras C4, C8 y C12, por ser las de la sección media y al fluidizarse interactuar directamente con las secciones superior e inferior del lecho, además de que presentaron condiciones de concentración y pureza de ADNg cercanas a los valores óptimos, lo que garantiza resultados correctos en la secuenciación genética masiva.

Tabla 3.7. Concentración del ADN extraído a 260 nm y pureza obtenida mediante la relación de las absorbancias a 260 y 280 nm

Clave	Descripción de la muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza (260/280)
C1	Inóculo: biopelícula adherida al soporte fluidizado (Extendsphere)	39.9	2.05
C2	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	26	2.19
C3	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	151.7	1.71
C4	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	104.4	1.82
C5	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	71.2	1.83
C6	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	171.4	1.78
C7	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	146.1	1.89
C8	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	125.7	1.83
C9	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	144	1.78
C10	Biopelícula adherida al soporte fijo (tubos de PVC)	134.4	1.78
C11	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección superior	70.5	1.89
C12	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección intermedia	131.8	1.78
C13	Biopelícula adherida al soporte fluidizado, sección inferior	129	1.93

3.7. Caracterización de la comunidad microbiana por secuenciación genética masiva

Con la secuenciación genética masiva y el análisis filogenético se encontraron 53 filos diferentes, 466 familias bacterianas diferentes, 905 géneros bacterianos diferentes y 123 familias principales en todas las muestras.

Del total de OTUs se asignaron 55 pertenecientes al dominio *Archaea* y 2,106 al dominio Bacteria.

Para tener una mejor presentación de los datos biológicos proporcionados por el servicio de secuenciación genética masiva, y el análisis filogenético a nivel de género y especie fueron utilizados para identificar las poblaciones microbianas a considerar como dominantes tomando como criterio poseer una abundancia relativa $\geq 1\%$ durante la operación de las etapas del bioproceso de digestión anaerobia.

3.7.1 Dinámica poblacional de la comunidad *Archaea*

En reactor RAH fue sometido a aumentos de carga orgánica para estudiar a los microorganismos presentes. En esta sección se describen los resultados para las *Archaeas* presentes en el proceso. En la Figura 3.15 se omite la etapa 1 ya que esta figura representa la dinámica poblacional del soporte fijo al inicio de la operación el cual se encontraba limpio y posteriormente se fue colonizando. Se puede observar que las poblaciones dominantes pertenecen al género *metanosaeta*, que de acuerdo con la bibliografía este género junto con *metanobacterium* en menor abundancia, pero presente en todas las etapas y *metanosarcinaceae* que aparece en la última etapa, se encuentran en la parte interna de la biopelícula en un reactor productor de biogás (Van Wolferen *et al.*, 2018).

De acuerdo con la Figura 3.15 los géneros dominantes arqueanos en todas las etapas fueron *metanosaeta*, ya que para cada cambio de carga orgánica se adaptaron fisiológicamente al menos *metanosaeta 1* el cual aumentó conforme pasaban los días de operación. Por otro lado, *metanosaeta 2* no fue resistente al estrés ya que para la etapa 3 disminuyó su abundancia y para la etapa 4 desapareció, lo que dio como

consecuencia que *metanosarcinaceae* presentara redundancia metabólica, tomando el rol de esta.

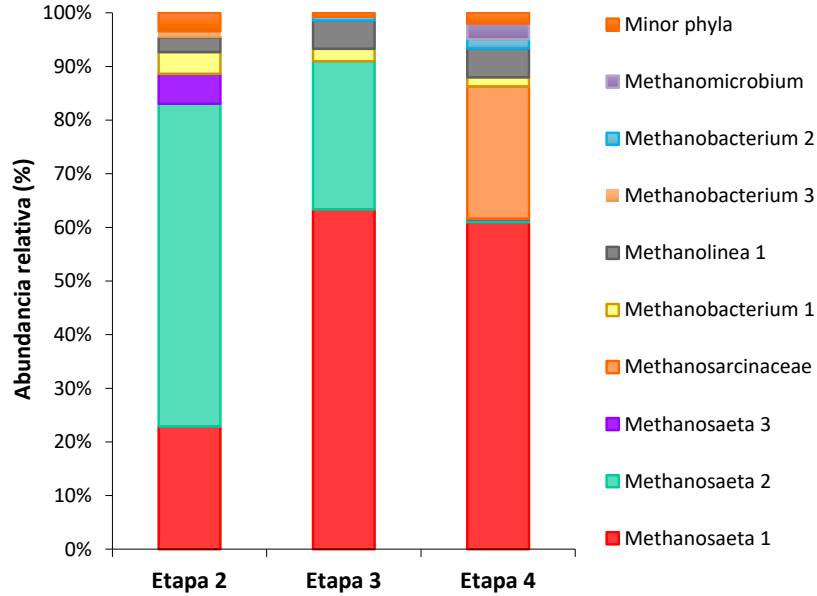


Figura 3.15. Abundancia relativa de la comunidad *Archaea* en el lecho fijo del RAH.

La Figura 3.16 muestra la abundancia relativa de las poblaciones microbianas en el lecho fijo, para las etapas 2, 3 y 4. En donde se confirma que efectivamente, la producción de metano en el RAH es llevada a cabo principalmente la vía acetotrófica, es decir que los microorganismos presentes, consumen el acetato para producir el biogás.

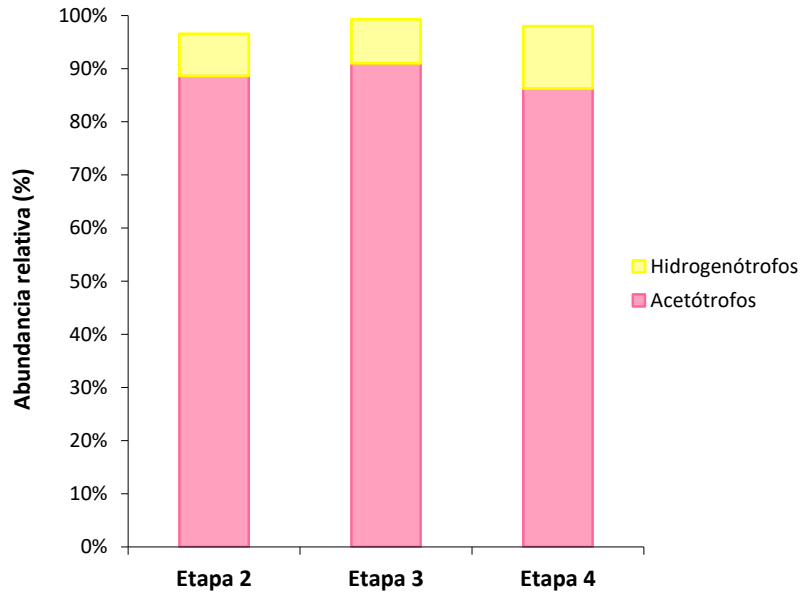


Figura 3.16. Abundancia Relativa por grupos tróficos de Archaea en el lecho fijo del RAH.

De acuerdo con la Figura 3.17 *Metanosaeta* continuó siendo la población microbiana dominante, incluso en el soporte fluidizado del RAH. Sin embargo, a diferencia del lecho fijo no se observó presencia de *metanosarcinaceae*, pero sí de *metanolínea* una especie comúnmente encontrada en este tipo de reactores.

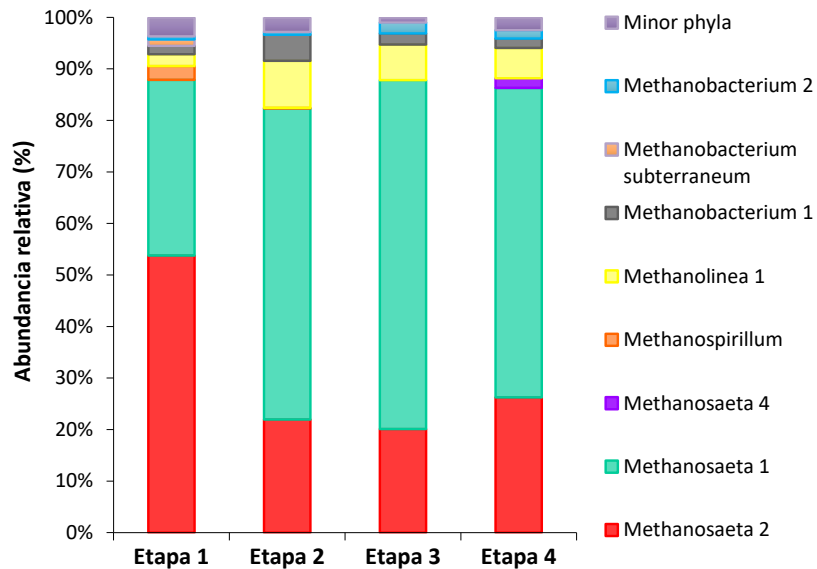


Figura 3.17. Abundancia relativa de la comunidad Archaea en el soporte fluidizado.

Cabe resalta que *metanosaeta 1* tiene propiedades de buena resistencia y adaptación fisiológica, ya que con el cambio de carga orgánica logró superar y continuar con sus funciones metabólicas.

Confirmando lo antes mencionado, que el proceso de producción de biogás se realiza por la vía del acetato, se observa en la Figura 3.18 que los géneros pertenecientes a los acetótrofos se encuentran en abundancia relativa cercada al 90 %.

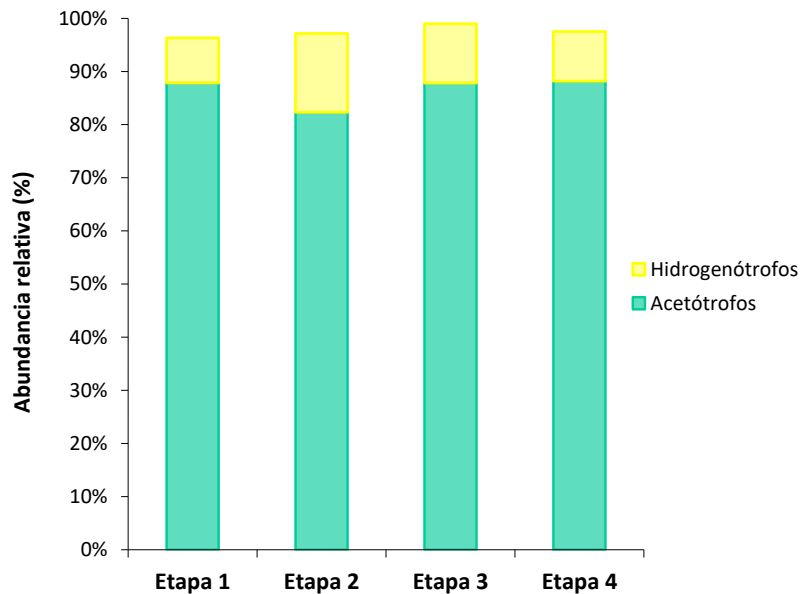


Figura 3.18. Abundancia Relativa por grupos tróficos de *Archaea* en el soporte fluidizado del RAH.

3.7.2 Dinámica poblacional de la comunidad Bacteria

El análisis de la estructura de la comunidad bacteriana mostró una alta diversidad de poblaciones dominantes, que se muestra en la Figura 3.19. y 3.20 que corresponden al lecho fijo del RAH.

Es importante mencionar que los OTUs *Minor Phyla* fueron muy numerosos representando alrededor del 25 % de abundancia en todas las etapas del bioproceso.

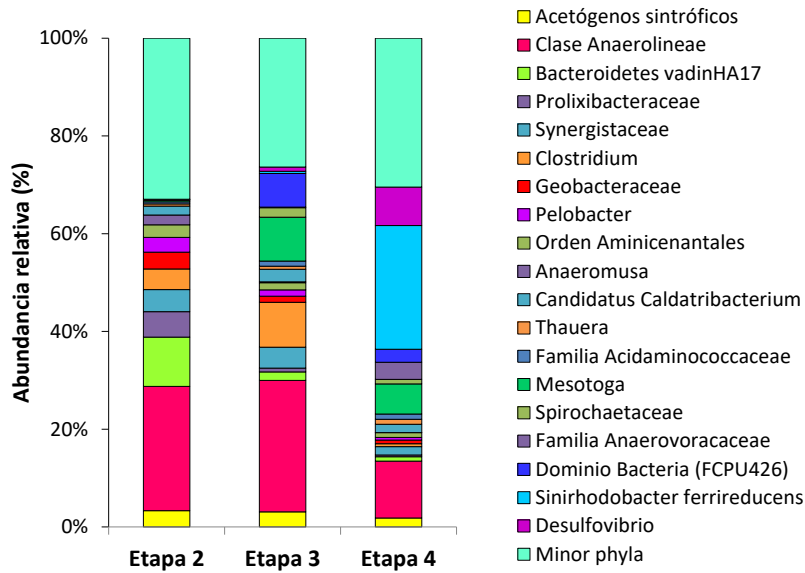


Figura 3.19. Abundancia relativa de la comunidad Bacteria en el lecho fijo del RAH.

Los resultados sobre la dinámica de poblaciones en el lecho fijo por grupo trófico indicaron que el grupo de las poblaciones fermentadoras incrementaron su abundancia relativa de 38 % a 48 % aumentando su participación en la remoción de la materia orgánica. En tendencia opuesta, las poblaciones sintróficas obligadas decrecieron con el aumento de Cva de 3.34 % a 1.82 %, lo que representa una interacción negativa en detrimento de la producción de metano por la vía sintrófica obligada.

En relación con las bacterias acetógenas, éstas presentaron fluctuaciones poco significativas en sus abundancias relativas durante las etapas 2 y 3, manteniéndose estable su tamaño poblacional con valores de 25 % y 26 %, respectivamente; sin embargo, en el aumento de mayor carga hubo un decremento hasta el 11 %.

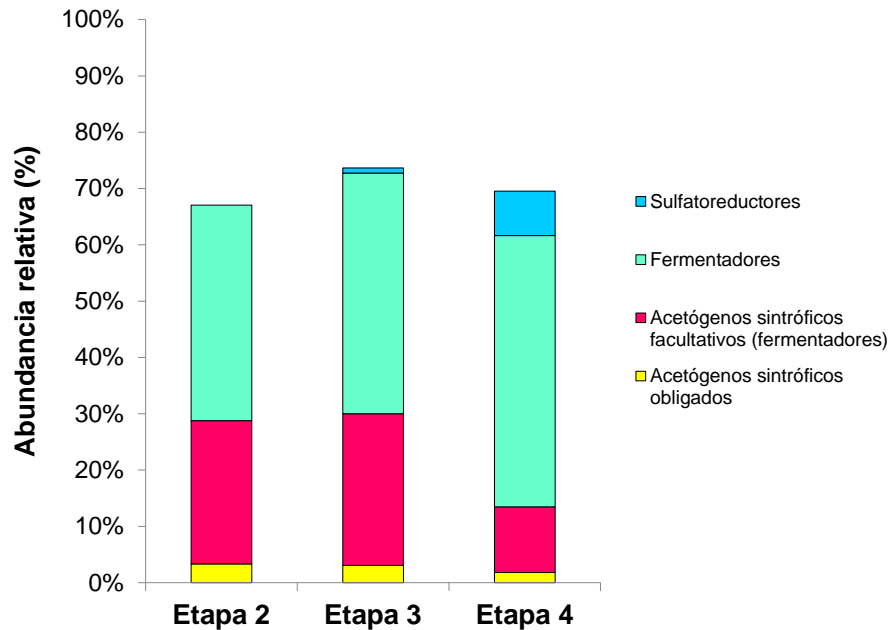


Figura 3.20. Abundancia Relativa por grupos tróficos de Bacteria en el lecho fijo del RAH.

De acuerdo con las Figuras 3.21 y 3.22 que corresponden a la dinámica poblacional en el soporte fluidizado, de acuerdo con el grupo trófico de las bacterias fermentadoras dominantes, un grupo importante son las bacterias que fermentan azúcares para producir acetato como su principal producto metabólico, siendo clave en el crecimiento de otras poblaciones como las arqueas metanógenas acetótroficas o algunas bacterias sulfato-reductoras. Durante las etapas todas las etapas se identificaron varios OTUs afiliados a dichas poblaciones fermentadoras de la clase *anaerolinea*.

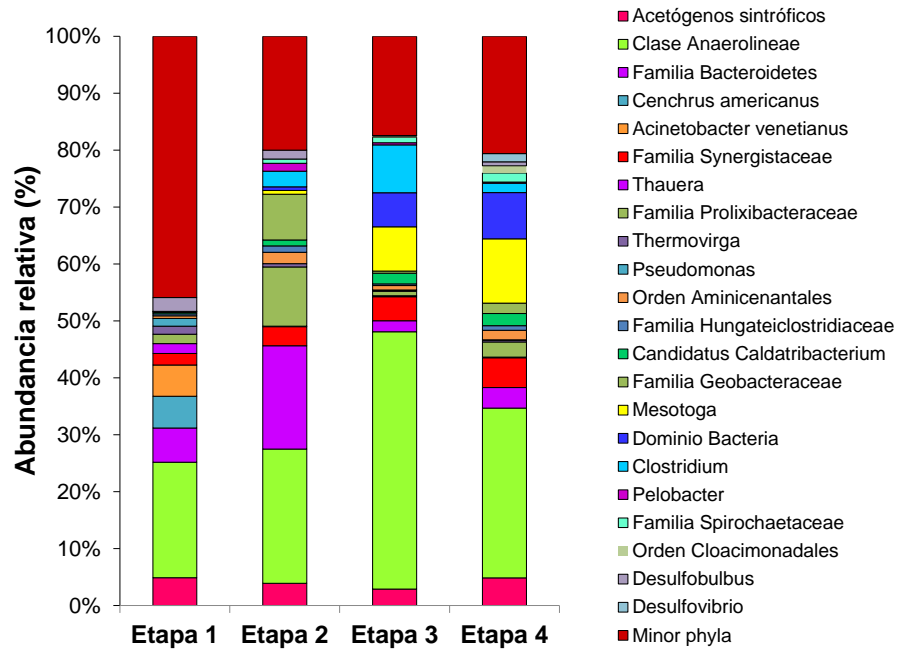


Figura 3.21. Abundancia relativa de la comunidad Bacteria en el soporte fluidizado del RAH.

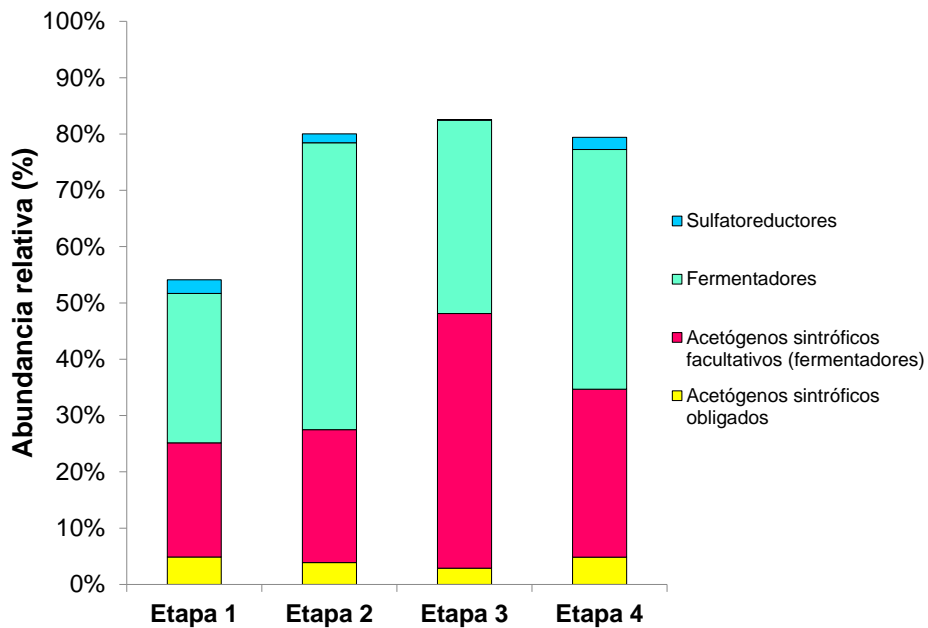


Figura 3.22. Abundancia Relativa por grupos tróficos de Bacteria en el soporte fluidizado del RAH.

3.8 Correlación de las variables operativas, fisicoquímicas y biológicas del proceso de DA en el Reactor Anaerobio Híbrido

La correlación de las variables para la interpretación del desempeño del RAH, se llevó a cabo mediante una estrategia de representación multivariada denominada Análisis de Componentes Principales (ACP). Esta estrategia puede ser considerada como un método exploratorio para disminuir los elementos de una base de información, consolidando variables nominales y ordinales de forma similar a los matemáticos. Asimismo, investiga los factores con su grado de estimación. Cuando existe una conexión no directa entre los factores, también se pueden determinar diferentes grados de análisis, con el objetivo de que estas conexiones puedan ser controladas con mayor éxito.

Por lo tanto, se tomaron los resultados obtenidos de la operación del RAH, los cuales se colocan en la Tabla 3.8, donde se puede observar todas las variables operativas, fisicoquímica y biológicas medidas durante el tiempo de operación del RAH, con el objetivo de correlacionarlas e interpretar el desempeño completo del reactor.

El ACP se realizó utilizando Statgraphics Centurion versión XVI, para el final de las principales etapas que fueron la etapa 2, 3 y 4.

Tabla 3.8. Diseño de individuos y variables para el ACP

Clave ACP	Parámetro	Final de etapa 2	Final de etapa 3	Final de etapa 4
AceBflu	Acetótrofos B-Flu	82.32	87.81	88.17
HidroBflu	Hidrogenótrofos B-Flu	14.85	11.18	9.34
ASOBflu	Acetógenos sintróficos obligados B-Flu	3.89	2.88	4.85
ASFBflu	Acetógenos sintróficos facultativos (fermentadores) B-Flu	23.59	45.23	29.82
FerBflu	Fermentadores B-Flu	50.97	34.35	42.58
SRBflu	Sulfato reductores B-Flu	1.57	0.11	2.15
CVA	CVA (g-DQO/L d)	7.22	16.26	20.91
DQOrem	DQO removida (g/L)	6.94	14.10	19.40
DQOrem%	DQO removida (%)	96.10	86.70	92.80
pH	pH	7.33	7.74	7.44
α	Alcalinidad (factor α)	0.143	0.230	0.067
Biogás	Producción de biogás (L/día)	6.6	15.3	20.7
CH4%	Contenido de metano en el biogás (%)	87.0	67.3	72.1
VPVM	Velocidad de producción volumétrica de metano (L CH ₄ /L reactor día)	2.62	6.07	8.20
YCH₄	Rendimiento en la producción de metano (L CH ₄ /gDQOrem)	0.333	0.331	0.308
Ace	Acético	1.6490	0.9974	0.2432
Pro	Propiónico	0.0000	0.1866	0.1083

Se obtuvo un número reducido de combinaciones lineales de las 17 variables que explican la mayor variabilidad en los datos. De las combinaciones lineales dos componentes tuvieron eigenvalores mayores o iguales que 1.0 como se observa en la Figura 3.23.

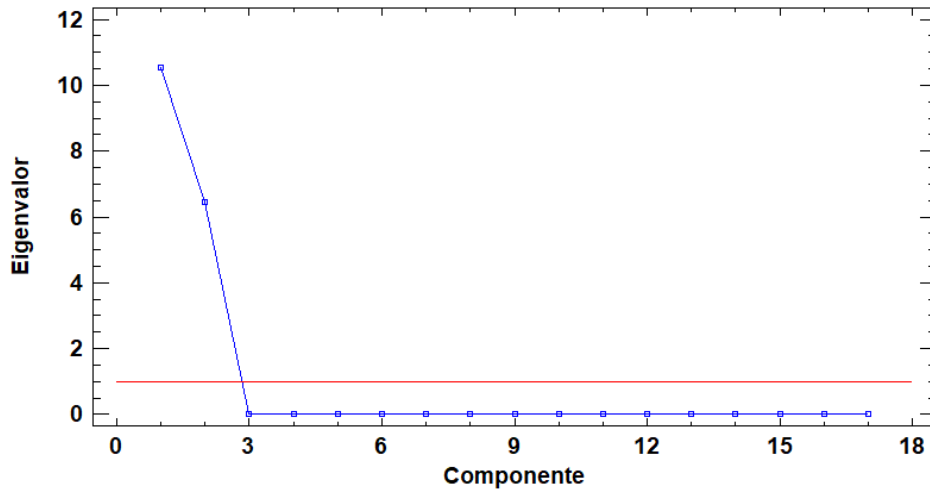


Figura 3.23. Gráfico de sedimentación de componentes principales basado en eigenvalores.

En conjunto estas componentes explican 100 % de la variabilidad en los datos originales ya que son consideradas debido a que tienen la información necesaria que describe los acontecimientos en el proceso. El resumen de la confiabilidad de los datos se muestra a continuación en la Tabla 3.9:

Tabla 3.9. Varianza de las componentes en el ACP

<i>Componente</i>		<i>Porcentaje de</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Número</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Varianza</i>	<i>Acumulado</i>
1	10.5418	62.011	62.011
2	6.45818	37.989	100.000
3	1.22214E-15	0.000	100.000
4	7.81736E-16	0.000	100.000
5	6.37925E-16	0.000	100.000
6	3.12222E-16	0.000	100.000
7	2.90552E-16	0.000	100.000
8	9.76174E-17	0.000	100.000
9	2.63993E-17	0.000	100.000
10	0.0	0.000	100.000
11	0.0	0.000	100.000
12	0.0	0.000	100.000
13	0.0	0.000	100.000
14	0.0	0.000	100.000
15	0.0	0.000	100.000
16	0.0	0.000	100.000
17	0.0	0.000	100.000

El número de casos completos se refiere al estudio de la relación de todas las variables en las etapas del RAH. Al extraer la componente 1 y 2 se tiene 100 % de información de la tabla original, es decir, que es posible correlacionar todos los parámetros estudiados en la digestión anaerobia a consecuencia de las perturbaciones en la Cva, es importante resaltar que no hubo pérdida de la información recabada.

En la Tabla 3.10, observamos los pesos de los componentes 1 y 2 graficados en la Figura 3.24. Los distintos colores resaltan los grupos formados de las variables que se correlacionaron, debido a que tienen un comportamiento similar.

Tabla 3.10. Peso de las componentes 1 y 2 para cada variable

	Componente	
	1	2
AceBflu	0.3068	0.0346
HidroBflu	-0.2875	-0.1413
ASOBflu	-0.0147	0.3931
ASFBflu	0.2294	-0.2626
FerBflu	-0.2725	0.1835
SRBflu	-0.0843	0.3785
CVA	0.2868	0.1436
DQOremgL	0.2745	0.1784
DQOrem%	-0.2431	0.2415
pH	0.2249	-0.2688
Alfa	0.0221	-0.3925
Biogás	0.2809	0.1613
CH4%	-0.3017	0.0793
VPVM	0.2811	0.1608
YCH4	-0.1643	-0.3328
Ace	-0.2544	-0.2218
Pro	0.2839	-0.1525

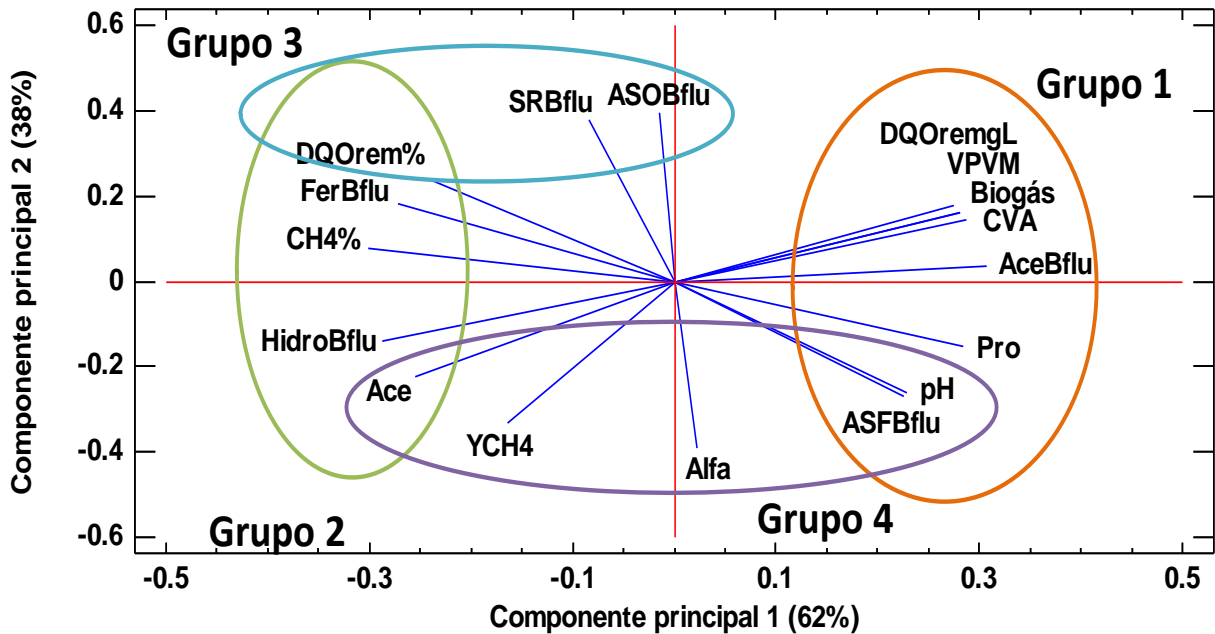


Figura 3.24. Correlación de las variables operativas, fisicoquímicas y biológicas del proceso de digestión anaerobia.

A continuación, se describe el comportamiento del RAH, con base en sus variables operativas, fisicoquímicas y la dinámica poblacional, para cada grupo en la Figura 3.24.

Grupo 1. Acetótrofos y los Acetógenos sintróficos facultativos se correlacionaron en este primer grupo, debido a que poseen dinámicas poblacionales similares, ambos al relacionarse con la Cva, indican que conforme esta aumenta, la dinámica entre estos dos grupos de bacterias posee el mismo comportamiento. La DQO removida se ve involucrada en este grupo como el consumo de la Cva que automáticamente se ve reflejado en la velocidad de producción de biogás incluida en este grupo también. Otro aspecto importante es que el propionato se ve involucrado en este grupo, debido a que algunas de las especies de Acetógenos sintróficos facultativos, producen propionato, específicamente los de la familia *Anaerolineaceae*, como la especie *Flexilinea flocculi* la cual es una especie que consume

carbohidratos en un reactor anaerobio a condiciones mesofílicas (Sun *et al.*, 2016; McIlroy *et al.*, 2017).

Grupo 2. Los Hidrogenótrofos y los Fermentadores, se presentaron en este grupo debido a la relación sintrófica entre ambos, lo cual explica que los fermentadores producen el hidrógeno, que es consumido por las poblaciones archaeas hidrogenótrofas, teniendo presente la producción de metano vía hidrógeno a pesar de que la principal vía como se explicó anteriormente es por ácido acético, lo que aporta gran ventaja para las poblaciones sensibles al hidrógeno como los fermentadores, ya que al ser consumido, la presión parcial no aumenta y no hay afectaciones en la degradación de azúcares por medio de la glucólisis (Worm *et al.*, 2010). La producción de metano por hidrógeno se vio influenciada por el porcentaje de remoción de DQO, que en un principio fue mayor, decreció un poco y aumentó al final de la última etapa, lo que se relaciona también con el contenido de metano en el biogás, ya que los microorganismos hidrogenótrofos, producen metano a comparación de los acetótrofos que además de metano, producen dióxido de carbono, por lo tanto, esta ruta hidrogenótrofa fue relevante en la composición del biogás (Zabranska y Pokorna, 2017).

En este grupo también aparecieron en correlación el rendimiento de metano y el acetato, lo que explica el metabolismo de las bacterias fermentadoras, es posible confirmar la producción de hidrógeno como resultado del consumo de los azúcares, como fuentes de carbono y energía ya que la principal familia involucrada *Anaerolineaceae* es productora de H₂ (McIlroy *et al.*, 2017).

Cabe resaltar que al no encontrarse la velocidad de producción de metano y la Cva en el mismo grupo que el rendimiento de metano, permite observar una irregularidad en el sistema, es decir, que la Cva alimentada al reactor al final, no se consumió totalmente, por lo que el rendimiento tuvo un

decaimiento. Lo anterior, permitió observar el alcance del tratamiento de Cva del RAH.

Grupo 3. Los acetógenos sintróficos obligados se correlacionaron con los sulfato reductores, debido a que ambos grupos compiten por los sustratos disponibles en el sistema. Sin embargo, los sulfato reductores tuvieron una abundancia relativa muy baja, siendo abundantes únicamente en dos eventos, cabe resaltar que donde tuvieron más dominancia fue cuando la Cva aumentó a 20 gDQO/Ld, lo que indicó una sobrecarga en el sistema. Cuando se presenta esta situación, poblaciones sulfato reductoras que no son competitivas a bajas cargas volumétricas, se vuelven competentes a altas cargas debido a la abundancia de sustratos. El aumento de la Cva puede presentar inconvenientes, ya que es posible que poblaciones indeseables como las sulfato reductoras puedan desarrollarse y, en consecuencia, al ser consumidoras de sulfato para transformarlo en sulfuro de hidrógeno, inhiban a las poblaciones metanogénicas y fermentadoras sensibles a este ácido (Liu *et al.*, 2018). Así mismo en este grupo también se correlaciona con la DQO removida en porcentaje, debido a que tuvo una tendencia similar a las poblaciones microbianas mencionadas anteriormente.

Grupo 4. Los grupos de Acetógenos sintróficos facultativos se correlacionaron con la producción de acetato, lo que, de acuerdo con McIlroy *et al.*, (2017), toda la familia de *Anaerolineaceae* son productoras de acetato. También se puede observar que el rendimiento de metano, el pH controlado y el factor de alcalinidad, se vieron involucrados fuertemente en este grupo, lo que resulta lógico, ya que garantizan la estabilidad del sistema.

CONCLUSIONES

Se montó un Reactor Anaerobio Híbrido en condiciones de temperatura mesofílica, utilizando Extendsphere™ como soporte para la adhesión de la biopelícula en el LFI. Este soporte se encontraba precolonizado con 36.35 gBiomasa (aproximadamente 35 % de colonización) y como sustratos la fracción líquida hidrolizada y sin tratar. La fracción líquida de RSO hidrolizada y sin tratar (bruta) presentó una considerable cantidad de materia orgánica, identificada por la caracterización de los sustratos. Para la fracción hidrolizada, el 20 % de los SST corresponde a SSV, la DQO_T y DQO_s fue de 8.63 g/L y 7.99 g/L, respectivamente. Para la fracción bruta, se encontró una DQO_T de 39.57 g/L y una DQO_s del 89 % que representa la materia orgánica disuelta e indica que este sustrato es de fácil degradación, por lo tanto, el proceso de DA no requirió micro, ni macronutrientes. Las fracciones líquidas hidrolizada y bruta tuvieron valores de pH de 7.9 y 5, respectivamente.

Durante la operación del RAH, hubo variaciones importantes en cuanto se realizaron los incrementos en la Cva. Al inicio de cada etapa las remociones de DQO y sólidos suspendidos presentaron un decremento, sin embargo, esto se recuperó en cuanto los microorganismos se adaptaron a las nuevas condiciones. Para la Etapa 2 se alcanzaron remociones de DQO superiores al 90 %, para la Etapa 3 arriba del 85 % y para la Etapa 4 superiores al 90 %. En cuanto al rendimiento de metano y producción de biogás, se observó que, a mayores cargas orgánicas, incrementó la producción de biogás siendo superior a 20 L con rendimientos de metano alrededor de 0.33 $LCH_4/gDQO_{rem}$. En términos de desarrollo de biopelícula, la MVA inicial-final tuvo porcentajes de colonización de 36.19-94.63 % (sección superior LFI), 35.44-90.37 % (sección media LFI) y 36.18-95.37 % (sección inferior LFI). Cabe resaltar que en cuanto el soporte fue colonizándose, la estabilización de las etapas posteriores fue más corta, de manera que la Etapa 3 duró 25 días y la Etapa 4 duró 10 días.

Se realizó un análisis de integridad del ADN_g extraído de la biomasa suspendida y de la biopelícula (LF y LFI), y se encontró que la biomasa suspendida no es un factor influyente en la operación del RAH y se confirmó que el uso del soporte

Extendsphere™ permite una fuerte adhesión de la biomasa mejorando el proceso de DA. La caracterización de la comunidad microbiana presente en la biopelícula, a través de la secuenciación genética masiva de la región V4, presentó 2,106 OTUs diferentes tanto de Bacteria como de *Archaea*, siendo Bacteria el dominio con mayor diversidad. La principal ruta metabólica para la producción de biogás se llevó a cabo por microorganismos acetótrofos (alrededor del 90 %), es decir, que el metano se produjo a partir de ácido acético. Para el dominio *Archaea*, en el lecho fijo y en el lecho fluidizado *metanosaeta* fue el género dominante, sin embargo, en la última etapa se hizo presente el género *metanosarcinaceae*. Mientras que para el dominio Bacteria, cada etapa fue guiada por la clase *anaerolinea* siendo un grupo importante de fermentadores productores de la mayoría de AGV's incluyendo Hidrógeno.

De los resultados generales del ACP, a pesar de que la ruta metabólica principal de producción de metano fue por la vía del consumo de ácido acético, hubo presencia importante de microorganismos hidrogenótrofos los cuales aportaron valor en la composición del biogás, al ser únicamente productores de metano a partir de hidrógeno. El aumento de Cva en el RAH favoreció la producción de metano, sin embargo, también hubo presencia de grupos sulfato reductores causantes de inhibición de funciones metabólicas de grupos fermentadores y metanogénicos, afectando directamente el rendimiento de metano. A pesar de ello el rendimiento de metano continuó alrededor de $0.3 \text{ LCH}_4/\text{gDQO}_{\text{rem}}$, como se ha mencionado en comparación con otros trabajos se mantuvo alto y cercano al valor teórico, lo que confirma que la configuración de los reactores de biopelícula es eficiente al momento de tratar sustratos con alta carga orgánica.

RECOMENDACIONES

Con relación en la configuración del RAH, se recomienda que la recirculación sea controlada con el fin de que no se combinen las comunidades microbianas del lecho fijo y el lecho fluidizado inverso.

De acuerdo con los resultados generales del estudio, se recomienda trabajar con mayores cargas orgánicas y caracterizar la comunidad microbiana presente, para corroborar que el rendimiento del RAH no decae y aportar información valiosa sobre su configuración.

Se recomienda realizar una modificación en el muestreo de la biopelícula adherida al soporte fluidizado, donde se homogenice el soporte y se tome una sola muestra representativa de todo, como la sección media, con el objetivo de optimizar los tiempos de la extracción de ADN_g, así como también analizar dos regiones del gen 16s para obtener más información.

Conocer la población microbiana presente nos otorga un panorama completo del desempeño del RAH cuando es sometido a cambios operacionales, por lo tanto, se recomienda someter al RAH a otras perturbaciones que incluyan un sustrato complejo.

Finalmente, en relación con las perspectivas de este estudio, se recomienda estudiar no sólo las poblaciones presentes, sino las activas por cada etapa de operación del RAH por medio de la extracción de ARN procesadas para obtener el ADN complementario y ser enviadas al servicio de secuenciación masiva.

ANEXO A. Protocolo para la colecta y conservación de muestras destinadas a la extracción de ácidos nucleicos

I. Muestra de biomasa microbiana suspendida en líquidos

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

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

2. **Unos días antes de iniciar la colecta de la muestra** se esteriliza por calor húmedo y presión un mortero con pistilo por cada muestra usando una autoclave a 15 lb/pulg² (121 °C) durante 15 minutos.
3. Al finalizar la esterilización se deja secar el mortero y el pistilo esterilizados, después se colocan ambos en un congelador a -20 °C durante 12 horas como mínimo antes de la colecta de la muestra.
4. Ahora verifique que se tiene suficiente tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M, N-Lauroyl sarcosina al 10 %, espátulas y otros materiales esterilizados para colectar la muestra. Si no tiene los reactivos y materiales necesarios entonces prepárelos antes de la colecta tal como se indica al final de este protocolo. *Recuerde también etiquetar 8 microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug tanto en el tapón como en la pared del tubo con la clave asignada a cada muestra colectada. Se sugiere tener esos tubos etiquetados en la criocaja a -20 °C listos para ser utilizados al final del procedimiento.*

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

5. **Inicialmente, se colectan 20 mL de la muestra líquida homogénea** usando un frasco de boca ancha esterilizado y se colocan 10 mL en dos tubos para centrifuga de 50 mL esterilizados, es decir, 10 mL en cada tubo. *Si la muestra contiene poca biomasa se puede colectar un volumen mayor de la muestra.*
6. Ambos tubos se balancean en una balanza analítica para ser centrifugados durante 10 min a 10,000 rpm en la centrifuga Eppendorf 5810R a temperatura de 6 °C.

7. Durante la centrifugación se sacan mortero y pistilo esterilizados del congelador a -20 °C y se colocan en la mesa de trabajo sin quitarles el papel que los envuelve.
8. Al finalizar la centrifugación, se remueve cuidadosamente el sobrenadante de ambos microtubos evitando resuspender los botones celulares usando una micropipeta de 1 a 10 mL y punta esterilizada. *El sobrenadante obtenido puede ser colectado en otro tubo de 50 mL para cuantificar compuestos importantes como ácidos grasos volátiles u otros ácidos orgánicos, compuestos nitrógenados, fosfatados y sulfatados.*

NOTA: *El sobrenadante se remueve porque suele contener compuestos que contaminan el ADN o ARN a extraer, reduciendo su pureza e interfiriendo con procedimientos biológico-moleculares posteriores.*

9. Ahora, se desenvuelven el mortero y pistilo evitando que el pistilo toque superficies contaminadas; después, se toma con una espátula esterilizada los botones de células de ambos microtubos para colocarlos en el mortero esterilizado y congelado. *Los tubos vacíos se pueden reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.*

NOTA: *Si durante la remoción de los sobrenadantes de los tubos los botones celulares se re-suspenden en un poco del sobrenadante. Entonces, se debe usar la espátula para re-suspender la totalidad de la biomasa en el poco sobrenadante restante. Después, los botones celulares re-suspendidos en un poco del sobrenadante se agregan al mortero esterilizado y congelado para continuar con el procedimiento.*

10. En seguida, se añaden 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 8.0, 0.1 M al mortero usando una micropipeta de 5 mL y punta esterilizada para proceder a macerar la biomasa con el pistilo esterilizado hasta obtener una suspensión homogénea. *Al agregar este reactivo al mortero quizás se congele, entonces debe esperar a que se descongele para iniciar el macerado de la muestra.*

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

11. Cuando la biomasa macerada sea homogénea y tenga fluidez, se añaden 600 μ L de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10 % usando una micropipeta de 100 a 1000 μ L y punta con filtro esterilizada. Esta suspensión se mezcla suavemente moviéndola con el pistilo para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla.
12. Finalmente, se reparte toda la pasta macerada en 8 alícuotas de 500 μ L en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el rompedor de células Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000 μ L y punta con filtro esterilizada, esta

punta se corta un poco con tijeras metálicas esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo. *Se debe evitar llenar microtubos con menos de 500 μ L de muestra, si la cantidad no es suficiente, entonces no llene el último tubo.*

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

II. Muestra de biomasa fija a soportes fluidizados

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

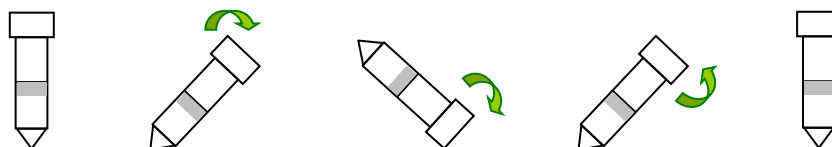
NOTA: *Es importante medir simultáneamente la materia seca, SSV, SST o algún otro parámetro que permita relacionar la cantidad de ADN de la muestra con una medición del crecimiento o cantidad de biomasa de la misma muestra.*

7. **Unos días antes de iniciar la colecta de la muestra** se esteriliza por calor húmedo y presión un mortero con pistilo por cada muestra usando una autoclave a 15 lb/pulg² (121 °C) durante 15 minutos.
8. Al finalizar la esterilización se deja secar el mortero y el pistilo esterilizados, después se colocan ambos en un congelador a -20 °C durante 12 horas como mínimo antes de la colecta de la muestra.
9. Ahora verifique que se tiene suficiente solución PBS 1X, tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M, N-Lauroyl sarcosina al 10 %, espátulas y otros materiales esterilizados para colectar la muestra. Si no tiene los reactivos y materiales necesarios entonces prepárelos antes de la colecta tal como se indica al final de este protocolo. *Recuerde también etiquetar 8 microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug tanto en el tapón como en la pared del tubo con la clave asignada a cada muestra colectada. Se sugiere tener esos tubos etiquetados en la criocaja a -20 °C listos para ser utilizados al final del procedimiento.*

NOTA: *Recuerde que el Tiocianato de guanidina es una sustancia mutagénica usada como desnaturizante de proteínas para desactivar las nucleasas contenidas en la muestra de biomasa. Dado que se trata de una sustancia mutagénica, se deben usar guantes y evitar el*

contacto o derrame de esta sustancia sobre cualquier superficie. Se debe disponer de un bote etiquetado como *Desechos peligrosos y exclusivo para el material contaminado con Tiocianato de guanidina como las puntas para micropipetas, papel y guantes.*

10. Inicialmente, se sacan el mortero y pistilo esterilizados del congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se colocan en la mesa de trabajo sin quitarles el papel que los envuelve.
11. **Inicialmente, se agregan 30 mL de PBS 1X** en dos tubos para centrifuga de 50 mL esterilizados, es decir, 30 mL en cada tubo. En seguida, se añaden a cada tubo **6 mL de muestra líquida con los soportes colonizados por la biomasa** usando una jeringa esterilizada o una micropipeta de 1 a 10 mL y punta esterilizada cortada con tijeras metálicas esterilizadas para evitar taponamientos. *Si la muestra contiene poca biomasa se puede coleccionar un volumen mayor de la muestra, respectando la proporción de PBS 1X.*
12. Después, se realiza un lavado de los soportes colonizados agitando la mezcla suavemente invirtiendo los tubos (bien cerrados) 2 veces tal como se indica en la imagen siguiente.



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

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

16. Ahora bien, **el líquido que contiene a los soportes colonizados** en ambos tubos de 50 mL se vierte en el mortero esterilizado y congelado. *Los tubos vacíos donde estaban las muestras se pueden reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.*
17. En seguida, se añaden 3 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 8.0, 0.1 M al mortero con la muestra (líquido que contiene a los soportes colonizados) usando una micropipeta de 1-5 mL y punta esterilizada. *Al agregar este reactivo al mortero quizás se*

congele, entonces debe esperar a que se descongele para iniciar el macerado de la muestra.

18. Entonces, se procede a macerar la muestra con el pistilo esterilizado para lograr desprender la biomasa de los soportes colonizados hasta observar la presencia de restos de biomasa en la suspensión.

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

19. Cuando se observe que hay suficiente biomasa desprendida de los soportes y macerada en una suspensión que tenga fluidez, es decir, no sea muy espesa; entonces, se añaden 900 μ L de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10 % usando una micropipeta de 100 a 1000 μ L y punta con filtro esterilizada. Esta suspensión se mezcla suavemente moviéndola con el pistilo para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla.
20. Finalmente, se reparte la suspensión con la biomasa macerada en 8 alícuotas de 500 μ L en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el rompedor de células Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000 μ L y punta con filtro esterilizada, esta punta se corta un poco con tijeras metálicas esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo. *Se debe evitar succionar los soportes con la pipeta, esta manipulación es difícil, pero si hay pocos soportes en la muestra conservada será más fácil su manipulación durante la extracción de ADN o ARN.*
21. Las alícuotas de la muestra en los microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug se meten al congelador para ser **conservadas a -20 °C** dentro de las cajas criogénicas para almacenar microtubos previamente etiquetadas. Recuerde también etiquetar los tubos tanto en el tapón como en la pared del microtubo con la clave asignada a cada muestra colectada.
22. Antes de lavar el mortero y el pistilo contaminados con **Tiocianato de guanidina**, se debe realizarse cuidadosamente una limpieza previa usando un papel para remover la mayor cantidad de residuos en ambos materiales. Todo el papel usado y contaminado debe ser contenido en un bote para residuos peligrosos. Después, se deben lavar el mortero y el pistilo con fibras exclusivas para estos materiales aun contaminados. *El propósito de esta limpieza es desechar al drenaje y ambiente la menor cantidad de **Tiocianato de guanidina**.*

III. Soluciones, materiales y equipos necesarios para ejecutar este protocolo

Solución de etanol al 70 % (NO TÓXICA): Se prepara agregando 700 mL de etanol grado industrial más 300 mL de agua destilada en una probeta de un litro. Después, se coloca un pedazo de parafilm que cubra la boca de la probeta para mezclar la solución invirtiendo la probeta a una posición de 90 grados 3 veces. Esta solución se coloca en una botella de plástico con atomizador para la limpieza de las superficies de trabajo.

Etanol grado industrial	700 mL
Agua destilada	300 mL
TOTAL	1000 mL

Buffer de fosfatos PBS 10X para extracción de ADN (NO TÓXICA): Esta solución contiene NaCl 1,370 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM y KH₂PO₄ 18 mM. Entonces, su preparación implica realizar el cálculo de mM a g/L, realice está conversión con todos los compuestos químicos para asegurarse que la fórmula es correcta. **Se deben preparar 100 mL de PBS 10X** usando un frasco de 250 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH de la solución. Inicialmente, se colocan en dicho frasco 80 mL de agua desionizada esterilizada medidos con una probeta. En seguida, se pesan 8.006 g de NaCl, 0.201 g de KCl, 1.419 g de Na₂HPO₄ y 0.245 g de KH₂PO₄. Estos reactivos se colocan en el frasco de 250 mL con los 80 mL de agua desionizada y se agitan con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Después, se afora la solución en un matraz aforado de 100 mL con agua desionizada. Finalmente, la solución aforada se coloca nuevamente dentro del frasco de 250 mL usado para preparar la solución, teniendo como propósito agitarla nuevamente con la misma barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Esta solución suele tener un pH cercano a 6.8 y se usa para obtener la solución PBS 1X, esta última se usa a un pH de 7.4, pero no es necesario ajustar el pH en la solución PBS 10X sino hasta que se prepara la solución PBS 1X.

NaCl	8.006 g
KCl	0.201 g
Na ₂ HPO ₄	1.419 g
KH ₂ PO ₄	0.245 g
Agua desionizada esterilizada-DEPC	Cuanto baste para 100 mL

TOTAL	100.00 mL
--------------	------------------

La solución de PBS 10X-DEPC se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de fosfatos PBS 10X-DEPC para extracción de ARN (NO TÓXICA): Esta solución contiene NaCl 1,370 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM y KH₂PO₄ 18 mM. Entonces, su preparación implica realizar el cálculo de mM a g/L, realice esta conversión con todos los compuestos químicos para asegurarse que la fórmula es correcta. **Se deben preparar 100 mL de PBS 10X-DEPC** usando un frasco de 250 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH de la solución. Inicialmente, se colocan en dicho frasco 80 mL de agua desionizada esterilizada-DEPC medidos con una probeta. En seguida, se pesan 8.006 g de NaCl, 0.201 g de KCl, 1.419 g de Na₂HPO₄ y 0.245 g de KH₂PO₄. Estos reactivos se colocan en el frasco de 250 mL con los 80 mL de agua desionizada-DEPC y se agitan con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Después, se afora la solución en un matraz aforado de 100 mL con agua desionizada-DEPC. Finalmente, la solución aforada se coloca nuevamente dentro del frasco de 250 mL usado para preparar la solución, teniendo como propósito agitarla nuevamente con la misma barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Esta solución suele tener un pH cercano a 6.8 y se usa para obtener la solución PBS 1X-DEPC, esta última se usa a un pH de 7.4, pero no es necesario ajustar el pH en la solución PBS 10X-DEPC sino hasta que se prepara la solución PBS 1X-DEPC.

NaCl	8.006 g
KCl	0.201 g
Na ₂ HPO ₄	1.419 g
KH ₂ PO ₄	0.245 g
Agua desionizada esterilizada-DEPC	Cuanto baste para 100 mL
<hr/>	
TOTAL	100.00 mL

La solución de PBS 10X-DEPC se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de fosfatos PBS 1X a partir del PBS 10X (NO TÓXICA): Se deben preparar 500 mL de PBS 1X usando un frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH de la solución. Inicialmente, se colocan 50 mL de la solución PBS 10X en un matraz aforado de 500 mL, después se agrega agua desionizada esterilizada hasta aforar la solución. En seguida, se coloca la solución aforada en el frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado para ser agitada con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Al concluir la agitación, **se ajusta el pH a 7.4** con NaOH 1 M o HCl 1 M (según sea necesario), la adición de la base o ácido se realiza gota a gota, monitoreando el pH con un potenciómetro. Es importante mencionar, que las soluciones PBS 1X no presentan variaciones de pH dependientes de la temperatura.

PBS 10X esterilizada	50 mL
Agua desionizada esterilizada	450 mL
TOTAL	500 mL

La solución de PBS 1X se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de fosfatos PBS 1X-DEPC a partir del PBS 10X-DEPC (NO TÓXICA): Se deben preparar 500 mL de PBS 1X-DEPC usando un frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH de la solución. Inicialmente, se colocan 50 mL de la solución PBS 10X-DEPC en un matraz aforado de 500 mL, después se agrega agua desionizada esterilizada hasta aforar la solución. En seguida, se coloca la solución aforada en el frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado para ser agitada con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Al concluir la agitación, **se ajusta el pH a 7.4** con NaOH 1 M o HCl 1 M (según sea necesario), la adición de la base o ácido se realiza gota a gota, monitoreando el pH con un potenciómetro. Es importante mencionar, que las soluciones PBS 1X-DEPC no presentan variaciones de pH dependientes de la temperatura.

PBS 10X-DEPC esterilizada	50 mL
---------------------------	-------

Agua desionizada esterilizada	450 mL
TOTAL	500 mL

La solución de PBS 1X-DEPC se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de fosfatos PBS 1X para extracción de ADN (NO TÓXICA): Esta solución contiene NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM. Entonces, su preparación implica realizar el cálculo de mM a g/L, realice está conversión con todos los compuestos químicos para asegurarse que la fórmula es correcta. **Se deben preparar 1000 mL de PBS 1X** usando un frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH final de la solución. Inicialmente, se colocan en dicho frasco 800 mL de agua desionizada esterilizada medidos con una probeta. En seguida, se pesan 8.006 g de NaCl, 0.201 g de KCl, 1.419 g de Na₂HPO₄ y 0.245 g de KH₂PO₄. Estos reactivos se colocan en el frasco de 1000 mL con los 800 mL de agua desionizada esterilizada y se agitan con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Después, se afora la solución en un matraz aforado de 1000 mL con agua desionizada esterilizada. Finalmente, se coloca la solución aforada nuevamente dentro del frasco de 1000 mL usado para preparar la solución, teniendo como propósito agitarla nuevamente con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo.

NaCl	8.006 g
KCl	0.201 g
Na ₂ HPO ₄	1.419 g
KH ₂ PO ₄	0.245 g
Agua desionizada-DEPC esterilizada	Cuanto baste para 1000 mL
TOTAL	1000.00 mL

Al concluir la agitación, **se ajusta el pH a 7.4** con NaOH 1 M o HCl 1 M (según sea necesario), la adición de la base o ácido se realiza gota a gota, monitoreando el pH con un potenciómetro. Es importante mencionar, que las soluciones PBS 1X no presentan variaciones de pH dependientes de la temperatura. Ahora, se debe repartir la solución PBS 1X en 2 frascos de 500 mL etiquetados con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH final de la solución para realizar la esterilización por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, esta solución se conserva a temperatura ambiente.

Buffer de fosfatos PBS 1X-DEPC para extracción de ARN (NO TÓXICA): Esta solución contiene NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1.8 mM. Entonces, su preparación implica realizar el cálculo de mM a g/L, realice esta conversión con todos los compuestos químicos para asegurarse que la fórmula es correcta. **Se deben preparar 1000 mL de PBS 1X-DEPC** usando un frasco de 1000 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH final de la solución. Inicialmente, se colocan en dicho frasco 800 mL de agua desionizada esterilizada-DEPC medidos con una probeta. En seguida, se pesan 8.006 g de NaCl, 0.201 g de KCl, 1.419 g de Na₂HPO₄ y 0.245 g de KH₂PO₄. Estos reactivos se colocan en el frasco de 1000 mL con los 800 mL de agua desionizada esterilizada-DEPC y se agitan con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo. Después, se afora la solución en un matraz aforado de 1000 mL con agua desionizada esterilizada-DEPC. Finalmente, se coloca la solución aforada nuevamente dentro del frasco de 1000 mL usado para preparar la solución, teniendo como propósito agitarla nuevamente con una barra magnética en un agitador a una velocidad y tiempo necesario hasta lograr un mezclado homogéneo.

NaCl	8.006 g
KCl	0.201 g
Na ₂ HPO ₄	1.419 g
KH ₂ PO ₄	0.245 g
Agua desionizada-DEPC esterilizada	Cuanto baste para 1000 mL
TOTAL	1000.00 mL

Al concluir la agitación, **se ajusta el pH a 7.4** con NaOH 1 M o HCl 1 M (según sea necesario), la adición de la base o ácido se realiza gota a gota, monitoreando el pH con un potenciómetro. Es importante mencionar, que las soluciones PBS 1X-DEPC no presentan variaciones de pH

dependientes de la temperatura. Ahora, se debe repartir la solución PBS 1X-DEPC en 2 frascos de 500 mL etiquetados con el nombre de la solución, fecha de elaboración y pH final de la solución para realizar la esterilización por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos, esta solución se conserva a temperatura ambiente.

Solución de Tris-HCl 1 M, pH 8.0 (NO TÓXICA): Se deben preparar 250 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 30.3 g de Trizma HCl y 6.95 g de Trizma Base, después se colocan ambos reactivos dentro del frasco etiquetado, que contenga 150 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 250 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

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

Después de aforar la solución de Tris-HCl 1 M, pH 8.0, esta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Se debe verificar el pH de la solución agregando 20 mL en un vaso de precipitados de 50 mL, si el pH no es 8.0, se debe indicar en la etiqueta del frasco el pH final medido. Esta solución no se esteriliza, aunque puede ser esterilizada por filtración.

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

se puede repetir las veces que se requieran para obtener más volumen de la solución de Guanidina tiocianato 4 M (Tris-HCl pH 7.6).

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

La solución de Guanidina tiocianato 4 M (Tris-HCl pH 8.0) se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

Solución de Fosfato monobásico de sodio 1 M (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 24.0 g de Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄), después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 200 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

NaH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich: S3139)	24.0 g
Agua ultrapura (desionizada) esterilizada	Cuanto baste para aforar 200 mL
TOTAL	200 mL

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

Solución de Fosfato dibásico de sodio 1 M (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se pesan 28.4 g de Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4), después se coloca el reactivo dentro del frasco etiquetado, que contiene 100 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria hasta lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, se usa un frasco aforado de 200 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich: S7907)	28.4 g
Agua ultrapura (desionizada) esterilizada	Cuanto baste para aforar 200 mL
TOTAL	200 mL

Después de aforar la solución de Fosfato dibásico de sodio 1 M, ésta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, se conserva a temperatura ambiente. Esta solución no se esteriliza, aunque puede ser esterilizada por filtración.

Solución de Tampón Fosfatos 0.1 M, pH 8.0 (NO TÓXICA): Se deben preparar 200 mL usando un frasco de 500 mL esterilizado y etiquetado con el nombre de la solución y fecha de elaboración. Inicialmente, se añaden en el frasco 150 mL de agua ultrapura esterilizada y una barra magnética, después se adicionan 1.36 mL de Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) 1 M y 18.64 mL de Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 1 M. En seguida, se coloca el frasco en un agitador magnético y se agita a la velocidad necesaria durante 10 minutos para lograr un mezclado homogéneo. Posteriormente, la solución se coloca dentro de un matraz aforado de 200 mL para aforar la solución con agua ultrapura esterilizada.

NaH_2PO_4	1.36 mL
Na_2HPO_4	18.64 mL
Agua ultrapura (desionizada) esterilizada	Cuanto baste para aforar 200 mL
TOTAL	200 mL

Después de aforar la solución de Tampón Fosfatos 0.1 M, pH 8.0, ésta se regresa al frasco etiquetado para ser agitada durante 5 minutos. Finalmente, se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos. Esta solución se conserva a temperatura ambiente. Se debe

verificar el pH de la solución agregando 20 mL en un vaso de precipitados de 50 mL, si el pH no es 8.0, se debe indicar en la etiqueta del frasco el pH medido.

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

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

La solución de N-Lauril Sarcosina 10 %, se esteriliza por autoclaveado a 15 lb/pulg² durante 15 minutos y se conserva a temperatura ambiente.

IV. Equipos

1. Máquina para hacer hielo frape
2. Centrífuga refrigerante y rotor para tubos de 50 mL.
3. Micropipetas de mano de 1 a 10 mL, 1 a 5 mL, 100 a 1000 μ L y 20 a 200 μ L.
4. Balanza analítica para balancear los tubos de 50 mL.
5. Congelador a -20 °C para almacenar las muestras.

V. Materiales

1. Hielo frape y contenedor para dicho hielo.
2. Frascos para medios de cultivo Pyrex o similar de diferentes capacidades para la elaboración de las soluciones.
3. Botes de boca ancha esterilizables (Polypropylene Wide Mouth Jars) de 250, 500 y 1000 mL marca Nalgene, distribuidos por Thermo Scientific-Nalgene. Estos botes se utilizan esterilizados para coleccionar las muestras, los botes de 1000 mL se usan para esterilizar las puntas de 5 mL.
4. Tubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados denominados BeadBug™ unfilled tubes, with caps and sealing ring. El número de catálogo Sigma-Aldrich

- es Z763837, también lo provee Merck como su filial. Se requiere ese tipo y marca de tubo porque solo ese cabe en el equipo homogenizador o rompedor de células, que se usa durante la extracción de ADN.
5. Crio-Etiquetas de microtubos que se usarán para etiquetar con claves de 3 caracteres como máximo cada alícuota de las muestras conservadas e identificar el origen de las muestras. El número de catálogo Daigger es EF1374H.
 6. Gradillas para tubos de centrífuga de 50 mL y microtubos de 2 mL.
 7. Tubos de 50 mL con tapón de rosca esterilizados: Estos tubos se utilizan para centrifugar las muestras líquidas y algunas sólidas muy húmedas como biopelículas. El número de catálogo Sigma-Aldrich es CLS4558, también lo provee Merck como su filial.
 8. Puntas sin filtro Finnpipette de 10 mL, esterilizadas en rack 5 x 24. El número de catálogo Finnpipette es 9402163, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano utilizadas.
 9. Puntas sin filtro Finnpipette de 10 mL, no esterilizadas, paquete con 100 piezas. El número de catálogo Finnpipette es 9402151, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano utilizadas.
 10. Puntas sin filtro Finnpipette de 5 mL, no esterilizadas, paquete con 500 piezas. El número de catálogo Finnpipette es 9402030, el distribuidor es ThermoFisher Scientific. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano utilizadas.
 11. Puntas con filtro de 200 μ L, esterilizadas en rack 10 x 96. El número de catálogo Axygen es TF-200-R-S. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano utilizadas.
 12. Puntas con filtro de 1000 μ L, esterilizadas en rack 10 x 96. El número de catálogo Axygen es TF-1000-R-S. Se usan esta marca por económica siempre que sea compatible con las micropipetas de mano utilizadas.
 13. Caja criogénica de polipropileno para tubos de 2 mL con capacidad para 100 tubos. El número de catálogo Biologix es 90-9100.
 14. Papel Wipers Wypall L30 2/300 para limpieza de las superficies utilizadas. El número de catálogo Diprovic es 8457.
 15. Espátulas de acero inoxidable de diferente tamaño esterilizados: Estas espátulas se utilizan para coleccionar las muestras sólidas y los sedimentos obtenidos después de centrifugar las muestras líquidas.
 16. Mortero y pistilo esterilizados, estos materiales se usan para macerar y homogenizar la muestra suspendida en tiocianato de Guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M.
 17. Tijeras de acero inoxidable esterilizadas para cortar la punta con filtro.
 18. Plumón permanente con punta ultrafina para etiquetar los microtubos y la criocaja.

VI. Referencias

- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., & Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2802-2813.
- Cresson, R., Dabert, P., & Bernet, N. (2009). Microbiology and performance of a methanogenic biofilm reactor during the start-up period. *Journal of applied microbiology*, 106(3), 863-876.

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

I. Colecta y conservación de la muestra (El uso de guantes de látex es obligatorio)

1. **Varios días antes de iniciar la colecta de la muestra verifique** que hay un mortero con pistilo esterilizados en el congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M, N Lauroyl sarcosina (L.S.) al 10 % y espátulas u otros materiales esterilizados para colectar la muestra. Si no tiene los reactivos y materiales necesarios entonces prepárelos antes de la colecta tal como se indica en este protocolo.

NOTA: Recuerde que el Tiocianato de guanidina es una sustancia mutagénica, por lo cual debe usar guantes y evitar el contacto y derrame de esta sustancia sobre cualquier superficie. Se dispone de un bote etiquetado como Desechos peligrosos y exclusivo para el material contaminado con Tiocianato de guanidina como las puntas para micropipetas, papel y guantes.

2. **Se colectan 20 mL de la muestra líquida** usando un frasco de boca ancha esterilizado y se reparte este volumen en dos tubos de centrifuga de 50 mL esterilizados para ser centrifugados durante 10 min a 7,000 rpm en la centrifuga Eppendorf 5810R a temperatura de $6\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Durante la centrifugación se sacan el mortero y pistilo esterilizados del congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se colocan en la mesa de trabajo.

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

4. Al finalizar la centrifugación, se decanta y desecha el sobrenadante de ambos microtubos y se toma con una espátula esterilizada los botones de células o sedimentos de los microtubos para colocarlos en el mortero esterilizado y congelado. **Los tubos vacíos se pueden lavar y donar a la Planta piloto, ya que no contienen residuos peligrosos.**
5. En seguida, se añaden 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M usando una micropipeta de 5 mL y punta esterilizada para proceder a macerar el lodo granular con el pistilo. Al agregar el reactivo se congelará, entonces debe esperar a que se descongele para iniciar el macerado de la muestra.
6. Si después de decantar los sobrenadantes de los tubos los sedimentos no se pueden colocar en el mortero porque se resuspenden al recogerlos con la espátula esterilizada, entonces se agrega al sedimento o botón de uno de los tubos los 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 8.0, 0.1 M usando una micropipeta de 1-5 mL y punta esterilizada. Esta mezcla se agita vigorosamente durante 1 a 5 s en el vórtex GENIE2.
7. Después, se succiona la suspensión obtenida con una pipeta micropipeta de 100 a 1000 μL y punta esterilizada para colocarlo en el otro tubo. Entonces, el tubo con ambos sedimentos y Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl se agita nuevamente durante 1 a 5 s en el vórtex GENIE2.
8. Después se coloca toda la suspensión del lodo con Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl en un mortero esterilizado y se macera el lodo con un pistilo esterilizado hasta obtener una suspensión homogénea. Si la pasta obtenida está espesa, entonces se adiciona más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl hasta obtener una suspensión líquida fácil de repartir en

tubos con una micropipeta de 100 a 1000 μL y punta con filtro esterilizada. **Los tubos vacíos que tuvieron contacto con Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl se desechan en el bote para desechos peligrosos.**

9. Cuando la biomasa macerada sea homogénea y tenga fluidez, se añaden 600 μL de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10 % usando una micropipeta de 100 a 1000 μL y punta con filtro esterilizada. Esta mezcla se homogeniza con el pistilo suavemente para no generar muchas burbujas.
10. Finalmente, se reparte toda la pasta macerada en alícuotas de 500 μL en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000 μL y punta con filtro esterilizada, esta punta se corta un poco con tijeras esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo. Se debe evitar llenar microtubos con menos de 500 μL al final, si la cantidad no es suficiente, entonces no llene el último tubo.

NOTA: Si la pasta macerada obtenida está muy espesa y no se puede pipetear en los microtubos de 2 mL, entonces se añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M hasta obtener una suspensión líquida fácil de repartir en tubos con una micropipeta de 1 mL y punta con filtro esterilizada. Si añade más Tiocianato de guanidina también debe añadir la cantidad correspondiente de N-Lauroyl sarcosina al 10 % para completar la mezcla.

11. Las alícuotas de la muestra en los microtubos de 2 mL Bead Bug se meten al congelador para ser conservadas a **-20 °C** dentro de las cajas criogénicas para almacenar microtubos previamente etiquetadas. Recuerde también etiquetar los tubos tanto en el tapón como en la pared del tubo con la clave asignada a cada muestra colectada.

II. Lisado de las células en el triturador vibratorio

12. Preparar el *Baño seco* a 70 °C y asegúrese que tiene disponibles todos los reactivos y materiales a utilizar durante la extracción de ADN, realice un check-list.
13. Moler en el triturador de hielo todos los hielos de dos recipientes y colocar el hielo molido en el contenedor de hielo de unicel, taparlo hasta antes de su uso.

Nota: Para las etapas siguientes y a menos que se indique lo contrario, mantener en todo momento la muestra hundida en hielo molido.

14. Cuando el baño seco llegue a 70 °C, se debe sacar la muestra del refrigerador a -20 °C y colocarla en una gradilla para añadirle inmediatamente a la muestra congelada 500 μL de la solución de Lauril-sarcosina al 5 % (disuelto en buffer de fosfatos con pH 8.0, 0.1 M).
15. En seguida, se coloca la muestra dentro del baño seco y se incuba durante 1 hora a 70 °C para su descongelación. **Se debe sacar la muestra justo después de un minuto de la incubación para agitarla en el vórtex orbital IKA por 3-10 s a la máxima velocidad con el propósito de mezclar la muestra y el Lauril-sarcosina al 5 % añadido con anterioridad. Finalmente, se regresa la muestra al baño seco.**
16. Después de una hora, se saca el microtubo de la muestra del baño seco y se coloca dentro del hielo. Se deja enfriar la muestra durante 2 a 5 minutos, mientras tanto se prepara el baño seco a 37 °C.

17. **Ponerse los lentes de seguridad** y agregar a la muestra 500 μL de las perlas de zirconio (0.1 mm de diámetro) esterilizadas e inmediatamente colocar el microtubo en el *Rompedor de células* y programarlo a un valor de 400 para la velocidad (velocidad máxima) y 60 de tiempo **Los lentes de seguridad se utilizan para proteger los ojos de las perlas de zirconio, que podrían caer en los ojos fácilmente.**
18. Mientras se enfría la muestra, se le añaden 15 mg de PVPP (Polivinilpirrolidona) y se agita en el vórtex Genie 2 durante 5 s a una velocidad máxima suficiente (2000 a 3000) para que las perlas y la solución se mezclen adecuadamente. Si es necesario golpee el tubo boca abajo sobre la superficie metálica del vórtex antes de poner el microtubo en agitación. **El PVPP fija los ácidos húmicos que son inhibidores de la ADN polimerasa.**
19. Posteriormente, se centrifuga la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #1 o con otra muestra que se procese simultáneamente.** Al terminar la centrifugación, se recuperan 400 μL del sobrenadante que contiene el ADN, usando una micropipeta de 200 μL y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en un microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado, mantenido previamente en el hielo para enfriarlo. **Recuerde que el ADN está en el sobrenadante.**
20. En seguida, se añaden 500 μL de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 5-15 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra, el propósito es agitar homogéneamente para recuperar más ADN de la muestra con el TENP. **El TENP recupera el ADN que se encuentra en el sedimento y lo suspende en el sobrenadante.**
21. Posteriormente, se centrifuga otra vez la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.** Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400 μL del sobrenadante con una micropipeta de 200 μL y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado.
22. Ahora se añaden 500 μL de TENP al sedimento del microtubo de la muestra una vez más y se agita durante 5-15 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra.
23. Se centrifuga otra vez la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.** Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400 μL del sobrenadante con una micropipeta de 200 μL y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo donde se ha estado acumulando el sobrenadante, quedando cada tubo con $\approx 600 \mu\text{L}$.
24. Después, se centrifuga el microtubo con la totalidad del sobrenadante obtenido ($\approx 1200 \mu\text{L}$) durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf) **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.** El propósito es eliminar las partículas suspendidas (impurezas), que serán depositadas en el fondo del microtubo después de la centrifugación.
25. Al finalizar la centrifugación, regresar la muestra al hielo y repartir el sobrenadante en 2 microtubos de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizados usando una micropipeta de 200 μL .

y punta con filtro esterilizada. En este momento se debe descongelar la RNasa (1 mg/mL), colocándola sobre la superficie del hielo. **Verificar que el baño seco alcanzó los 37 °C.**

III. Precipitación del ADN

26. Inicialmente, se añade 1 volumen de isopropanol (2-propanol) equivalente al volumen del líquido contenido en el microtubo de la muestra o 700 μ L y se agita suavemente cada microtubo durante 3 minutos sujetando los microtubos con los dedos para voltearlos con movimientos lentos tal como indica en la figura, hasta ver fibras cafés o cambio de densidad del líquido como si fuesen dos fases líquidas:



27. Después de dicha agitación manual, se dejan reposar los dos microtubos durante 10 min a la temperatura ambiente sobre una gradilla.
28. Al finalizar los 10 minutos, se centrifugan ambos microtubos de la muestra durante 15 min a 14,500 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con ambos microtubos y colocando una marca en la parte del microtubo donde se acumulará el sedimento o botón durante la centrifugación para saber dónde está el ADN después de la centrifugación. Esto se hace porque es muy difícil observar el botón formado por el ADN, aunque en ocasiones se puede observar ese botón café porque tiene el ADN impurezas como proteínas.**
29. Cuando finalice la centrifugación, saque los microtubos de la centrifuga y decante suavemente el sobrenadante de ambos microtubos centrifugados, esos sobrenadantes son desechos y se tiran al bote de residuos no peligrosos. **El ADN está en el botón formado en ambos microtubos.**
30. Posteriormente, se añade a uno de los microtubos 200 μ L de agua para PCR con una micropipeta de 200 μ L y punta con filtro esterilizada. Después, se resuspende el sedimento o ADN usando la misma punta con filtro de la micropipeta succionando y expulsando el líquido suavemente por las paredes del microtubo para lograr la suspensión del ADN y evitando producir burbujas de aire que compliquen la manipulación de la suspensión de ADN. **Si la punta con filtro se desprende de la micropipeta, asegúrese de que no contiene restos de la suspensión de ADN y deséchela, después coloque una punta con filtro esterilizada nueva.**
31. Luego de realizar esta maniobra, se extrae la suspensión de ADN con la misma micropipeta para mezclar dicha suspensión con el sedimento o ADN del otro microtubo con el propósito de resuspender de la misma manera el segundo sedimento y tener la totalidad de ADN precipitado en el mismo microtubo. **Si es necesario, se puede cambiar la punta con filtro de la pipeta, asegurándose que la punta desechada no contiene restos de la suspensión de ADN.**
32. Cuando se tenga la suspensión de ADN completa, entonces se añaden **8 μ L de RNasa a 2.5 mg/mL (concentración final 1 mg/mL)** y se agita en el vórtex orbital IKA por 1-3 s. Después

se coloca el tubo en el baño seco para ser incubado durante 30 minutos a 37 °C. Al terminar la incubación se coloca el microtubo en el hielo y se prepara el baño seco a 70 °C.

IV. Eliminación de las impurezas del ADN

33. Cuando el baño seco alcance los 70 °C, añade al microtubo de la muestra 200 µL de **Buffer AL** (Kit QIAamp) con una micropipeta de 200 µL y punta con filtro esterilizada. Después, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA por 1-3 segundos a una velocidad de 2000 y se incuba 10 minutos en el baño seco a 70 °C.
34. Al finalizar la incubación, se coloca la muestra en el hielo y se añaden 200 µL de etanol puro (96- 100 %, Sigma-Aldrich) con una micropipeta de 200 µL y punta con filtro esterilizada. Después, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA por 1-3 segundos.
35. Después, se añade toda la suspensión de ADN mezclada con el Buffer AL y el etanol puro (96- 100 %, Sigma-Aldrich) a la micro-columna QIAamp contenida en un microtubo de 2 mL del kit usando una micropipeta de 200 µL y punta con filtro esterilizada. **Atención: evitar mojar los bordes de la columna porque eso dificulta cerrarla adecuadamente.** Posteriormente, se cierra bien la micro-columna y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo AL o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.**
36. Al finalizar la centrifugación, se debe desechar el microtubo con el filtrado y se coloca la micro columna dentro de un microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp y se coloca en el hielo.
37. En seguida, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 500 µL del **Buffer AW1** del Kit QIAamp usando una micropipeta de 1000 µL y punta con filtro esterilizada. **Atención: evitar mojar los bordes.** Después, se cierra bien la micro-columna y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo AW1 o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.**
38. Luego de esta segunda centrifugación, se debe desechar nuevamente el microtubo con el filtrado y se coloca la micro-columna dentro de otro microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp y se coloca en el hielo.
39. En seguida, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 500 µL del **Buffer AW2** del Kit QIAamp usando una micropipeta de 1000 µL y punta con filtro. **Atención: evitar mojar los bordes.** Entonces, se cierra bien la micro-columna y se centrifugara durante 3 minutos a 14,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo AW2 o micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.**
40. Al finalizar esta centrifugación, se elimina otra vez el microtubo con el filtrado y se coloca la micro-columna dentro de un microtubo nuevo de 1.5 mL esterilizado con la tapa cortada previamente usando las tijeras esterilizadas. Ahora, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 50 µL del **Buffer AE** del Kit QIAamp usando una micropipeta de 200 µL y punta con filtro esterilizada. **Se deben también añadir los 50 µL del Buffer AE del Kit QIAamp a la micro columna del microtubo de balanceo AW2 colocada en otro microtubo de 1.5 mL con la tapa cortada para balancear la centrifuga o a una micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.**

41. Después de añadir los 50 μ L del Buffer AE, el microtubo de 1.5 mL esterilizado con la micro columna de la muestra se coloca en una gradilla y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
42. Cuando finalice el tiempo de incubación, el microtubo de 1.5 mL esterilizado con la micro columna de la muestra se centrifuga 3 min a 8,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), **balanceando la centrífuga con el microtubo preparado anteriormente o tubo de 1.5 mL esterilizado con la micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.**
43. **Atención con la hidrólisis ácida del ADN en caso de usar agua para PCR en lugar del buffer AE.**
44. Al terminar la centrifugación, se desecha la micro-columna y se recupera el filtrado (\approx 40 μ L) en un microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado usando una micropipeta de 200 μ L y punta con filtro esterilizada. En seguida, el microtubo con la muestra de ADN extraído se congela a -20 °C. **Recuerde etiquetar el microtubo con la muestra antes de colocarlo en el congelador.**
45. Limpie y apague los equipos utilizados, recoja sus materiales y limpie la mesa de trabajo y cualquier otra superficie utilizada durante la extracción de ADN.
46. Reponga los microtubos con 500 μ L perlas de zirconio esterilizadas y los paquetes de 15 mg de PVPP después de 10 extracciones de ADN realizadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akunna, J. C. 2019. Anaerobic Wastewater Treatment and Biogas Plants. Taylor & Francis Group. First edition.

Alvarado-Lassman, A., Méndez-Contreras, J. M., Martínez-Sibaja, A., Rosas-Mendoza, E. S., y Vallejo-Cantú, N. A. 2016. "Biogas production from the mechanically pretreated, liquid fraction of sorted organic municipal solid wastes". *Environ Technol* 33:30.

Ali, M., Elreedy, A., Ibrahim, M. G., Fujii, M. y Tawfik, A. 2019. "Hydrogen and methane bio-production and microbial community dynamics in a multi-phase anaerobic reactor treating saline industrial wastewater". *Energy Convers Manag* 186:1–14.

Apanco-Rosas, V. 2018. Comparación del desempeño de un reactor anaerobio piloto en configuración en paralelo, con 2 diferentes sustratos. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México

APHA. 2017. Standard Methods 23rd ed. for the examination of water and waste water. 23rd ed. American Public Health Association. Washington DC.

Ariunbaatar, J., Panico, A., Esposito, G., Pirozzi, F., Lens, P. 2014. "Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste". *APPLIED ENERGY* 123: 143–56.

Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., Rojo-Liera, N. M., González-Álvarez, V., y Méndez-Acosta, H. O. 2018. "Effect of the organic loading rate on the performance and microbial populations during the anaerobic treatment of tequila vinasses in a pilot-scale packed bed reactor". *J Chem Technol Biotechnol* 93(2):591–99

Atlas, R., y Barta, R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Prentice Hall

Bernard, O., Polit, M., Hadj-Sadok, Z., Pengov, M., Dochain, D., Estaben, M. y Labat, P. 2000. Advanced monitoring and control of anaerobic wastewater treatment plants: III- Software sensors and controllers for an anaerobic digester. In: 5th International

Symposium in System Analysis and Computing in Water Quality Management, pp. 3.65–3.72. Gent, Belgium.

Botello-Suárez, W. A., Da Silva-Vantini, J., Duda, R- M., Giachetto, P. F., Carrijo-Cintra, L., Tiraboschi Ferro, M. I., y Alves-De Oliveira, R. 2018. “Predominance of syntrophic bacteria, Methanosaeta and Methanoculleus in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating coffee processing wastewater at high organic loading rate”. *Bioresour Technol* 268:158–68.

Campion, R., y Canul, J. 2004. Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología, UNAM, 48.

Corrales, L. C., Antolínez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., y Corredor Vargas, A. M. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55.

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

Cruz-Ramos, A. 2019. Mejoramiento de la fluidización de un reactor anaerobio híbrido semifluidizado. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México

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

Díaz-Trujillo, L. A., y Nápoles-Rivera, F. 2019. Optimization of biogas supply chain in Mexico considering economic and environmental aspects. *Renewable Energy*, 139, 1227–1240.

Díaz-Báez, M. C., Espitia-Vargas, S. E., y Molina-Perez, F. 2002. Digestión Anaerobia: una aproximación a la tecnología. Universidad Nacional de Colombia.

Diaz Mellado, O. M. 2020. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Prensa médica argentina*, 3(30), 88–111.

Doloman, A., Soboh, Y., Walters, A. J., Sims, R. C., y Miller, C. D. 2017. “Qualitative Analysis of Microbial Dynamics during Anaerobic Digestion of Microalgal Biomass in a

UASB Reactor”. *Int J Microbiol* 2017(5291283):12.

Ferrai, M., Guglielmi, G., y Andreottola, G. 2010. Modelling respirometric tests for the assessment of kinetic and stoichiometric parameters on MBBR biofilm for municipal wastewater treatment. *Environmental Modelling and Software*, 25(5), 626–632.

Foresti, E. 1994. Fundamentos de proceso de digestión anaerobia. III Taller y Seminario Latinoamericano sobre Tratamiento anaerobio de aguas residuales, Montevideo, Uruguay, p. 97-110.

Garbs, M., y Geldermann, J. 2018. Analysis of selected economic and environmental impacts of long-distance manure transports to biogas plants. *Biomass and Bioenergy*, 109(December 2017), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.12.009>

Gariyban, L., y Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133(3), 1–4.

Gerardi, M. H. 2003. The Microbiology of Anaerobic Digesters. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

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

Gutierrez, J. P. 2018. Situación actual y escenarios para el desarrollo del biogás en México hacia 2024 y 2030. *Red Tematica De Bioenergia De Conacyt*, 22. <https://rembio.org.mx/wp-content/uploads/2020/11/Situacion-actual-y-escenarios-para-el-desarrollo-del-biogas-en-Mexico.pdf>

Hadjiev, D., Dimitrov, D., Martinov, M., y Sire, O. 2007. Enhancement of the biofilm formation on polymeric supports by surface conditioning. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 840–848.

Hilkiah Igoni, A., Ayotamuno, J. M., Eze, C. L., Ogaji, S. O. T., y Probert, S. D. 2008. “Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste”. *Appl*

Energy 85(6):430–38.

Horan, N. J. 2018. Anaerobic Digestion Processes: Applications and Effluent Treatment. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore.

Houbron, E. 2012. "Methane yield and microscopic observation as monitoring biofilm behaviour parameters, during startup phase of anaerobic inverse fluidized bed reactor". Afr J Biotechnol 11(78):14392–98.

Houbron, E., Sandoval-Rojas, M. E., y Hernández-Muñoz, A. F. 2016. "Tratamiento de vinazas en un reactor de lecho fluidizado inverso anaerobio". Rev Int de Contam Ambient 32(3):255–66.

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

Lebuhn, M., Weiß, S., Munk, B., y Guebitz, G. M. 2015. "Microbiology and Molecular Biology Tools for Biogas Process Analysis, Diagnosis and Control". Biogas Sci Technol 1–200.

Lettinga, G., Roersma, R., y Grin, P. 1983. Anaerobic treatment of raw domestic sewage at ambient temperatures using a granular bed UASB reactor. Biotechnol and Bioeng, 25(7), 1701–1723.

Liu, Ze-hua., Yin, Hua., Lin, Zhang., y Dang, Zhi. 2018. Sulfate-reducing bacteria in anaerobic bioprocesses: basic properties of pure isolates, molecular quantification, and controlling strategies. Environmental Technology Reviews, 7(1), 46–72.

Lohani, S. P., y Havukainen, J. 2018. Anaerobic Digestion: Factors Affecting Anaerobic Digestion Process. Waste Bioremediation, Energy, Environment, and Sustainability.

Lorenzo-Acosta, Y., y Obaya-Abreu, M. C. 2005. "La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I". ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XXXIX (1, 2005) 35-48.

McIlroy, Simon J., Kirkegaard, Rasmus H., Dueholm, Morten S., Fernando, Eustace, Karst, Søren M., Albertsen, Mads., y Nielsen, Per H. 2017. Culture-Independent Analyses Reveal Novel Anaerolineaceae as Abundant Primary Fermenters in Anaerobic Digesters Treating Waste Activated Sludge. *Frontiers in Microbiology*, 8(), 1134–.

Minteer, S. D. 2011. Biochemical production of other bioalcohols: Biomethanol, biopropanol, bioglycerol, and bioethylene glycol. *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies* 258–65.

Mir, M. A., Hussain, A., y Verma, C. 2016. “Design considerations and operational performance of anaerobic digester: A review”. *Cogent Eng* 3(1):1–20.

Mlaik, N., Khcharem, M., Kouas, M., Sayadi, S., y Khoufi, S. 2017. “Improvement of anaerobic biodegradability of organic fraction of municipal solid waste by mechanical and thermochemical pretreatments”. *Inter J Environ Sci Technol*.

Okabe, S., Kuroda, H., y Watanabe, Y. 1998. Significance of biofilm structure on transport of inert particulates into biofilms. *Water Science and Technology*. 38(8,9): 163-170.

Ostrem M.K., Millrath K., y Themelis N.J. 2004. Combining anaerobic digestion and waste to energy. In: 12th North America waste to energy conference. Columbia University, New York.

Rajendran, K., Aslanzadeh, S., y Taherzadeh, M. J. 2012. “Household biogas digesters- A review”. *Energies* 5(8):2911–42.

Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., y Borja, R. 2012. “Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures”. *Renew Sust Energ Rev* 16(1):861–77.

Rosas-Mendoza, E. S., Méndez-Contreras, J. M., Martínez-Sibaja, A., Vallejo-Cantú, N. A., y Alvarado-Lassman, A. 2018. “Anaerobic digestion of citrus industry effluents using an Anaerobic Hybrid Reactor”. *Clean Technol Environ Policy* 20(7):1387–97.

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

SENER. 2018. Balance Nacional de Energía 2018. Secretaría de Energía Primera edición 25, México.

Schmidt, T., McCabe, B. K., Harris, P. W. y Lee, S. 2018. "Effect of trace element addition and increasing organic loading rates on the anaerobic digestion of cattle slaughterhouse wastewater". *Bioresour Technol* 264:51–57.

Shokoohi, R., Asgari, G., Leili, M., Khiadani, M., Foroughi, M., y Sedighi Hemmat, M. 2017. Modelling of moving bed biofilm reactor (MBBR) efficiency on hospital wastewater (HW) treatment: a comprehensive analysis on BOD and COD removal. *Inter J Environ Sci Technol*, 14(4), 841–852.

Snell-Castro, R., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., González-Álvarez, V., Pintado-González, M., González-Morales, M. T., y Godon, J. J. 2019. "Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. azul bagasse". *J of Appl Microbiol* 126(5):1618–30.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Learning in the Disciplines: ICLS 2010 Conference Proceedings - 9th International Conference of the Learning Sciences*, 2, 70–78.

Toledo-Cervantes, A., Guevara-Santos, N., Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R. y Méndez-Acosta, H. O. 2018. "Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses". *Biochem Eng J* 138:12–20.

van Wolferen, M., Orell, A., & Albers, S. V. 2018. Archaeal biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(11), 699-713.

Vega-De Kuyper, J. C., y Ramírez-Morales, S. 2014. Fuentes de energía, renovables y no renovables. Aplicaciones. México: Alfaomega.

Wang, Jianlong., y Yin, Yanan. 2019. Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, (), 1–41.

Weber, B., Rojas Oropeza, M., Torres Bernal, M., y Pampillón González, L. 2012. Producción de biogás en México estado actual y perspectivas. Cuaderno Temático No. 5 Red Mexicana de Bioenergía, 48.

Wid, N., y Horan, N. J. 2018. Anaerobic digestion of screenings for biogas recovery. Springer Singapore.

Zabranska, Jana., y Pokorna, Dana. 2017. Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens. *Biotechnology Advances*, (), S0734975017301556–.

Zinatizadeh, A. A. L., y Ghaytooli, E. 2015. Simultaneous nitrogen and carbon removal from wastewater at different operating conditions in a moving bed biofilm reactor (MBBR): Process modeling and optimization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 53, 98–111.