



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**OPCIÓN I.- TESIS**

**TRABAJO PROFESIONAL**

“OBTENCIÓN DE UN INÓCULO ANAEROBIO  
ESPECIALIZADO EN EL CONSUMO DE SUSTRATOS  
COMPLEJOS Y PRODUCCIÓN DE BIOGÁS”.

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

**PRESENTA:**

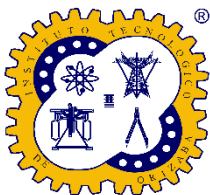
*I.Q. LAURA ISABEL HERNÁNDEZ PALAGOT*

**DIRECTOR DE TESIS:**

*DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA*

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

*DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN*



Orizaba, Veracruz, **21/noviembre/2023**  
Dependencia: División de Estudios de  
Posgrado e Investigación  
Asunto: Autorización de Impresión  
OPCION: I

C. LAURA ISABEL HERNÁNDEZ PALAGOT  
Candidato(a) a Grado de Maestro(a) en:  
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA  
P R E S E N T E.-

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

“Obtención de un inóculo anaerobio especializado en el consumo de sustratos complejos y 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®

*Cuahtémoc Sánchez R.*

Dr. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06





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

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

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

**LAURA ISABEL HERNÁNDEZ PALAGOT**

La cual lleva el título de:

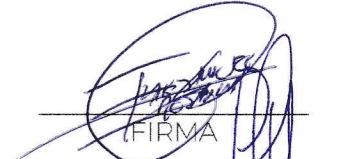
**“Obtención de un inóculo anaerobio especializado en el consumo de sustratos complejos y producción de biogás”**

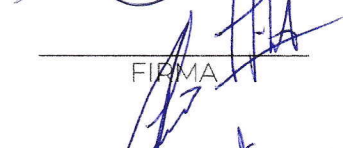
Y concluyen que se acepta.


ATENTAMENTE


Excelencia en Educación Tecnológica®  
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

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

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

TA-09-18



## Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 22 del mes de noviembre del año 2023.

El(la) que suscribe

C. LAURA ISABEL HERNANDEZ PALAGOT

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 140 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

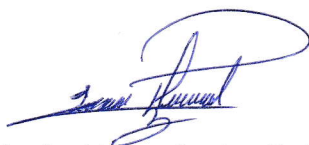
“OBTENCIÓN DE UN INÓCULO ANAEROBIO ESPECIALIZADO EN EL CONSUMO DE SUSTRATOS COMPLEJOS Y PRODUCCIÓN DE BIOGÁS”

del programa: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA bajo la asesoría y dirección del (la) DR. ERIK SAMUEL ROSAS MENDOZA Y DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

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

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

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



Laura Isabel Hernández Palagot

## DEDICATORIAS

A mi amada *mamá*, por todo su apoyo, comprensión y amor incondicional. No tengo otra forma de expresarte mi amor y agradecimiento, más que dedicándote mi tesis, pues aquí no solo se encuentra plasmado mi esfuerzo y dedicación, sino también los tuyos. Gracias por ser mi más grande pilar.

A mi inolvidable *papá*, por ser mi guía, por ser mi luz. Gracias por siempre protegerme y acompañarme, te llevo en mi corazón.

A mi querido *hermano*, por ser mi acompañante y amigo. Gracias por escucharme, estar conmigo, darme ideas y siempre brindarme tu apoyo en cada momento que lo necesité.

A mi *tía Isabel* y *abuela Nena*, por nunca olvidarse de mí en sus oraciones, gracias por todo.

A mi amada *Jennifer*, por brindarme su tiempo y cariño. Gracias por llegar a mi vida al comienzo de esta aventura y caminarla a mi lado hasta el final, con cada uno de los retos y satisfacciones que conlleva. Siempre te agradeceré toda la motivación y apoyo que me brindaste en cada momento.

A mis amigos *Daniel* y *Alejandra*, por su apoyo y por llenar esta etapa de buenos momentos y alegrías. Y, especialmente, a mi querida *Angélica* por ser mi comprensible compañera durante todo este camino, no pude haber tenido a una mejor persona a mi lado para vivir esto, te agradezco cada uno de los momentos.

A mi querida *Kiara*, por estar presente cada día de mi vida desde hace seis años. Gracias por siempre acompañarme cada noche y brindarme tu cariño.

Por último, a *Dios*, por nunca soltarme y confortarme en los momentos en los que dudé. Te doy gracias por la vida de cada una de las personas antes mencionadas y por brindarme la dicha de ponerlas en mi camino.

## RECONOCIMIENTOS

Al *Dr. Erik Samuel Rosas Mendoza*, por su tiempo, dedicación, comprensión y apoyo brindados al dirigir la realización de esta tesis. Es usted un profesor e investigador digno de admirar. Gracias por creer y confiar en mí desde el primer momento, siempre lo tendré en una gran estima.

Al *Dr. Alejandro Alvarado Lassman* y *MIQ. Norma Alejandra Vallejo Cantú*, por las facilidades para llevar a cabo la investigación en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental I, así como compartir su invaluable experiencia y conocimiento. Al *Dr. Juan Manuel Méndez Contreras* y *Dra. Ofelia Landeta Escamilla*, por compartir su invaluable conocimiento, así como motivarme a la culminación de esta tesis.

Al *Dr. Raúl Snell Castro*, por su tiempo, dedicación y paciencia para lograr el cumplimiento de los objetivos de esta tesis, valoro mucho todas sus enseñanzas. Así como a *CUCEI* de la Universidad de Guadalajara por abrir las puertas de sus instalaciones para la estancia de investigación en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la *I.Q. Carolina Andrea López Báez*, por contribuir grandemente a esta tesis con la realización de su residencia profesional. Gracias por tu disposición, tiempo y amistad.

Al *CONAHCYT* por la beca número 1150678, teniendo como productos los trabajos:

- “Acondicionamiento de un reactor anaerobio híbrido para el aprovechamiento de residuos cítricos y obtención de biogás”. XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Junio 2023.
- “Efecto de los residuos cítricos sobre la producción de biogás en un reactor anaerobio de biopelícula”. XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Septiembre 2023.
- “Suministro y aprovechamiento de sustratos de difícil degradación en reactores de biopelícula anaerobia para producir biogás”. Congreso Internacional de Desarrollo Sustentable y Energías Renovables 2023. Noviembre 2023.

## RESUMEN

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

**Elaborada por:** I.Q. Laura Isabel Hernández Palagot

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

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

El proceso de digestión anaerobia (DA) puede verse afectado por agentes inhibidores como el D-limoneno, aceite esencial presente en los residuos sólidos cítricos (RSC). A consecuencia de la inhibición, la actividad de las poblaciones microbianas involucradas en el proceso de DA se ve afectada, disminuyendo el rendimiento de biogás producido. A partir de esto, surge la necesidad de adaptar y conocer la composición de las poblaciones microbianas que se encuentran en el inóculo especializado para el consumo de sustratos complejos con la presencia de inhibidores. De modo que, el objetivo de la presente investigación es llevar a cabo la obtención de un inóculo anaerobio que sea especializado en el consumo de sustratos complejos para la producción de biogás.

Con esta finalidad, se utilizó un reactor anaerobio híbrido (RAH) como dispositivo experimental y se llevaron a cabo cuatro etapas operativas en las que se usaron como sustrato la fracción líquida de RSO y mezclas (% v/v) de RSO:RSC al 70:30, 50:50 y 30:70, respectivamente. Se operó el RAH de manera continua con una Cva de 5 gDQO/Ld en condiciones mesófilas ( $35\pm 1$  °C). Se monitoreó el desempeño del RAH mediante las determinaciones de pH,  $DQO_T$  y  $DQO_s$ , SST y SSV, factor  $\alpha$ , volumen y rendimiento de biogás, y también la MVA al soporte. Al finalizar cada una de las etapas de operación se tomaron muestras de biomasa del LF y del LFI, se extrajo el ADN y se analizó mediante secuenciación metagenómica shotgun de baja profundidad.

El RAH operó en modo continuo durante 145 días. Al finalizar la Etapa 4 de operación, con un sustrato conformado por la mezcla (% v/v) RSO:RSC al 30:70, se alcanzaron

remociones de DQO superiores a 95 %, una producción de biogás de 3,000 mL/d con un rendimiento de 342 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub> y la colonización en el LFI fue de 51 % en la zona superior, 42 % en la zona media y 38 % en la zona inferior. La composición de la biopelícula adherida al LF y LFI al finalizar la Etapa 4 de operación estuvo conformada por las especies dominantes *Mesotoga infera* y *Methanothrix soehngenii*. La clasificación de las especies por grupo trófico y el ACP revelaron que la principal vía metabólica para la metanogénesis fue la vía acetótrofa.

Finalmente, se obtuvo la composición del inóculo anaerobio adaptado al consumo de sustratos complejos conformado por mezclas de la fracción líquida de RSO y RSC para la producción de biogás. Las correlaciones de los parámetros operativos del RAH y las poblaciones microbianas establecen que la inhibición por D-limoneno afectó las dinámicas de las poblaciones microbianas.



## ABSTRACT

### **Obtaining an anaerobic specialized inoculum in the consumption of complex substrates and biogas production**

**By:** I.Q. Laura Isabel Hernández Palagot

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

Dr. Alejandro Alvarado Lassman

Anaerobic digestion (AD) process can be affected by inhibitory agents such as D-limonene, an essential oil present in citrus solid waste (CSW). As a result of inhibition, the activity of the microbial populations involved in the AD process is affected, decreasing the yield of biogas produced. From this, the need arises to adapt and to know the composition of the microbial populations found in the specialized inoculum for the consumption of complex substrates with the presence of inhibitors. Therefore, the objective of this research is to obtain an anaerobic inoculum that is specialized in the consumption of complex substrates to produce biogas.

For this purpose, a anaerobic hybrid reactor (AHR) was used as an experimental device and four operational stages were carried out in which the liquid fraction of OSW and mixtures (% v/v) of OSW:CSW at 70:30, 50:50 and 30:70, respectively were used as substrate. AHR was operated continuously with a OLR of 5 gCOD/Ld under mesophilic conditions ( $35\pm 1$  °C). The performance of AHR was monitored by determining pH, total COD and soluble COD, TSS and SSV,  $\alpha$  factor, biogas volume and yield, and also the AVM to the support. At the end of each of the operation stages, biomass samples were taken from the FB and the IFB, the DNA was extracted and analyzed by low-depth shotgun metagenomic sequencing.

AHR operated in continuous mode for 145 days. At the end of Stage 4, using a substrate made up of the mixture (% v/v) OSW:CSW at 30:70, COD removals greater than 95% were achieved, it were produced 3,000 mL/d of biogas with a yield of 342 mL biogas/gCOD<sub>rem</sub> and colonization in the IFB was 51 % in the upper zone, 42 % in the

middle zone and 38 % in the lower zone. The composition of the biofilm adhered to the FB and IFB at the end of Stage 4 of operation was made up of the dominant species *Mesotoga infera* and *Methanotherix soehngeni*. The classification of the species by trophic group and the PCA revealed that the main metabolic pathway for methanogenesis was the acetotrophic pathway.

Finally, the composition of the anaerobic inoculum adapted to the consumption of complex substrates was obtained, consisting of mixtures of the liquid fraction of OSW and CSW to produce biogas. Correlations of AHR operating parameters and microbial populations establish that inhibition by D-limonene affected the dynamics of microbial populations.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABLAS.....	vii
NOMENCLATURA .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVO.....	3
OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	5
1.1 Generación de residuos sólidos orgánicos y cítricos en México.....	5
1.1.1 Impacto de los residuos sólidos orgánicos y cítricos en México .....	7
1.2 Digestión anaerobia como tratamiento de residuos sólidos orgánicos .....	7
1.2.1 Etapas de la digestión anaerobia .....	8
1.2.2 Factores que influyen en la eficiencia de la digestión anaerobia .....	10
1.3 Producción de biogás .....	13
1.3.1 Uso de biogás como bioenergía en México .....	14
1.4 Sustrato complejo para la digestión anaerobia .....	15
1.4.1 Composición de los residuos sólidos cítricos .....	15
1.5 Inhibición durante la digestión anaerobia.....	16
1.5.1 El D-limoneno como inhibidor de la digestión anaerobia.....	16
1.6 Inóculo en la digestión anaerobia .....	18
1.6.1 Poblaciones microbianas presentes durante la digestión anaerobia.....	18
1.7 Técnicas de biología molecular .....	21
1.7.1 Secuenciación genética masiva .....	21

1.7.2	Secuenciación metagenómica shotgun	23
1.8	Reactores de alta carga	24
1.8.1	Reactores de flujo ascendente y manto de lodos (UASB)	24
1.8.2	Reactores de lecho fluidizado inverso (IFB)	25
1.8.3	Reactores anaerobios híbridos (RAH)	25
1.9	Antecedentes y avances	26
1.9.1	Antecedentes	26
1.9.2	Avances	30
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS		34
2.1	Montaje del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)	35
2.2	Obtención y acondicionamiento del sustrato	37
2.2.1	Acondicionamiento del sustrato	38
2.3	Obtención del inóculo	39
2.4	Caracterización del sustrato e inóculo	39
2.5	Operación del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)	40
2.5.1	Parámetros de control del RAH	40
2.5.2	Etapas de operación del RAH	41
2.6	Monitoreo del proceso de digestión anaerobia	43
2.6.1	Determinaciones analíticas	43
2.6.2	Análisis de la biopelícula	46
2.7	Análisis de la composición del inóculo anaerobio	46
2.7.1	Muestreo	47
2.7.2	Conservación de las muestras de biomasa	47
2.7.3	Extracción del ADN	50

2.7.4 Eliminación de impurezas del ADN .....	51
2.7.5 Visualización de la integridad del ADN.....	52
2.7.6 Medición de pureza y concentración del ADN.....	53
2.7.7 Secuenciación metagenómica shotgun del ADN .....	53
2.7.8 Correlaciones del desempeño del RAH y la dinámica microbiana .....	54
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
3.1 Montaje del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) .....	56
3.2 Caracterización del sustrato .....	57
3.3 Caracterización del inóculo .....	60
3.4 Monitoreo del desempeño del RAH en modo continuo.....	61
3.4.1 pH en el RAH .....	61
3.4.2 Factor $\alpha$ de alcalinidad en el RAH.....	63
3.4.3 Remoción de DQO en el RAH.....	65
3.4.4 Remoción de SST y SSV en el RAH .....	67
3.4.5 Producción y rendimiento de biogás en el RAH .....	68
3.5 Monitoreo del desarrollo de la biopelícula del RAH .....	70
3.5.1 Cuantificación de la MVA en el RAH .....	70
3.5.2 Relación sustrato/biomasa en el RAH.....	73
3.6 Extracción y cuantificación del ADN .....	73
3.6.1 Visualización de la integridad del ADN.....	73
3.6.2 Cuantificación y pureza del ADN.....	74
3.7 Análisis de la composición del inóculo anaerobio del RAH.....	76
3.7.1 Composición y dinámica poblacional del dominio Bacteria .....	76
3.7.2 Composición y dinámica poblacional del dominio Arquea.....	80

3.7.3 Correlaciones del desempeño del RAH y dinámica microbiana .....	84
CONCLUSIONES.....	94
RECOMENDACIONES .....	97
ANEXO A .....	98
ANEXO B .....	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1.1	Consumo en fresco de cítricos y generación de RSC en México	6
1.2	Aportación de residuos sólidos cítricos a los residuos sólidos orgánicos en México	7
1.3	Diagrama del proceso de la digestión anaerobia	9
1.4	Tasa de biodegradabilidad	13
1.5	Incremento de la generación de energía por concepto de biogás en México	15
1.6	Tejidos de una naranja	17
1.7	Estructura química del D-limoneno	17
1.8	Árbol filogenético de la vida, dominios Bacteria, Arquea y Eucaria	20
1.9	Pasos a seguir en la SGM	23
2.1	Metodología para la presente investigación	34
2.2	Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) y sus componentes	36
2.3	Residuos sólidos recolectados en el mercado municipal Emiliano Zapata: a) RSO, b) RSC	37
2.4	a) RSO y RSC reducidos de tamaño, b) fracciones líquidas de RSO y RSC	38
2.5	Determinaciones analíticas para la caracterización: a) pH, b) DQO <sub>T</sub> y DQO <sub>s</sub> , c) SST, d) SSV	40
2.6	Alícuotas de las muestras listas para su conservación	49
2.7	Precipitación del ADN	50
2.8	Muestra de ADN extraído	52
2.9	Electroforesis de las muestras de ADN extraído	52
2.10	Medición de concentración y pureza del ADN extraído	53
3.1	Secciones del RAH: a) LF, b) LFI	57

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
3.2	Mezclas de las fracciones líquidas RSO:RSC: a) 100:0, b) 70:30, c) 50:50, d) 70:30, e) 0:100	58
3.3	Valores de pH del afluente, efluente y al interior del RAH	62
3.4	Factor $\alpha$ de alcalinidad en el RAH	64
3.5	Porcentaje de remoción de DQO <sub>T</sub> y DQO <sub>S</sub> en el RAH	66
3.6	Porcentaje de remoción de SST y SSV en el RAH	68
3.7	Producción y rendimiento de biogás del RAH	69
3.8	Micrografías de la biopelícula adherida al LFI	72
3.9	Visualización del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH, por medio de electroforesis en gel agarosa al 0.7 %	74
3.10	Composición de la biopelícula en el LF, dominio Bacteria	77
3.11	Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LF, dominio Bacteria	78
3.12	Composición de la biopelícula en el LFI, dominio Bacteria	79
3.13	Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LFI, dominio Bacteria	80
3.14	Composición de la biopelícula en el LF, dominio Arquea	81
3.15	Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LF, dominio Arquea	82
3.16	Composición de la biopelícula en el LFI, dominio Arquea	83
3.17	Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LFI, dominio Arquea	84
3.18	Información generada por el software, LF: a) Variabilidad de los componentes, b) Gráfica de sedimentación	86
3.19	Gráfica de pesos de los componentes y agrupación, LF	87
3.20	Información generada por el software, LFI: a) Variabilidad de los componentes, b) Gráfica de sedimentación	90
3.21	Gráfica de pesos de los componentes y agrupación, LFI	91



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1.1	Etapas de la digestión anaerobia y las especies microbianas participantes	19
1.2	Diferencias entre los dominios Bacteria y Arquea	20
1.3	Antecedentes de la DA con sustrato complejo y análisis de dinámica microbiana	27
2.1	Parámetros evaluados al sustrato	39
2.2	Volumen de muestra para análisis de dinámica microbiana	47
2.3	Clasificación y etiquetado de las muestras de biomasa conservadas	48
3.1	Dimensiones de la sección 1: LF del RAH	56
3.2	Dimensiones de la sección 2: LFI del RAH	57
3.3	Caracterización de los sustratos y comparación con previas investigaciones (media aritmética $\pm$ desviación estándar)	59
3.4	Caracterización del inóculo pre colonizado	61
3.5	Etapas de operación del RAH	61
3.6	Monitoreo de la biopelícula del soporte en el LFI del RAH	71
3.7	Relación sustrato/biomasa durante la operación del RAH	73
3.8	Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH	75
3.9	Valores para el ACP del LF	85
3.10	Pesos de los componentes y agrupación, LF	87
3.11	Valores para el ACP del LFI	89
3.12	Pesos de los componentes y agrupación, LFI	91

## NOMENCLATURA

Abreviatura	Descripción
%	Por ciento
% v/v	Por ciento volumen/volumen
°C	Centígrados
a	Año
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AGVs	Ácidos grasos volátiles
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
bp	Bases de pares
C:N	Relación Carbono:Nitrógeno
CSTR	Reactor de tanque agitado continuo
Cva	Carga volumétrica aplicada
d	Día
DA	Digestión anaerobia
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO <sub>E</sub>	DQO de alimentación
DQO <sub>rem</sub>	DQO removida
DQO <sub>s</sub>	DQO soluble
DQO <sub>T</sub>	DQO total
FISH	Hibridación fluorescente in situ

<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>
g	Gramo
GyA	Grasas y aceites
h	Hora
IFB	Reactor de lecho fluidizado inverso
kWh	Kilowatt-hora
L	Litro
LF	Lecho fijo
LFI	Lecho fluidizado inverso
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
mg	Miligramo
mL	Mililitro
Mm <sup>3</sup>	Millones de metros cúbicos
MVA	Materia volátil adherida
NGS	Secuenciación de nueva generación
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PJ	Petajoules
Q	Flujo o caudal de alimentación
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
RAH	Reactor anaerobio híbrido
rARN	ARN ribonucleico
RLFI	Reactor de lecho fluidizado inverso

<b>Abreviatura</b>	<b>Descripción</b>
rpm	Revoluciones por minuto
RSC	Residuos sólidos cítricos
RSO	Residuos sólidos orgánicos
$S_0/X_0$	Relación sustrato/biomasa
SGM	Secuenciación genética masiva
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
STR	Reactor de tanque agitado
T	Temperatura
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente y mando de lodos
V	Volumen
$V_s$	Volumen de soporte colonizado
$V_u$	Volumen útil
$YCH_4$	Rendimiento de metano

## INTRODUCCIÓN

En México, se generan 23 millones de toneladas de residuos sólidos orgánicos (RSO) por año, lo cual representa el 51.6 % de los residuos sólidos urbanos generados en el país (SEMARNAT, 2019). Dentro de los RSO se incluyen los residuos sólidos cítricos (RSC). En México, los cítricos son considerados uno de los principales productos agrícolas de exportación y frutos de elevado consumo en fresco. Entre los años de 2016 y 2021, en promedio, fueron consumidas 2.4 millones de toneladas de naranja, 1.5 millones de toneladas de limón y 0.4 millones de toneladas de toronja en México (USDA, por sus siglas en inglés) (2022). Se estima que alrededor del 50 % en peso de los cítricos consumidos es desechado, por lo que fueron desechadas 1.2 millones de toneladas de naranja, 0.8 millones de toneladas de limón y 0.2 millones de toneladas de toronja. De este modo, los RSC representan aproximadamente el 9.4 % de RSO generados en México. De acuerdo con reportes del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2021), el estado de Veracruz es el principal productor de naranja y limón, con un 51 % y 27 % del total de producción en el país, respectivamente.

Los RSO, incluidos los RSC que se generan a partir del consumo en fresco de los cítricos, son dispuestos en rellenos sanitarios o tiraderos al aire libre, donde se convierten en una fuente importante de contaminación a causa de su alto contenido de materia orgánica, generando riesgos ambientales como la generación de malos olores, generación de compuestos volátiles orgánicos, contaminación por lixiviados, la atracción de animales vectores y emisiones de gases de efecto invernadero. (Rosas-Mendoza *et al.*, 2018). Por ello, resulta importante el estudio de alternativas para el aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos y cítricos provenientes del consumo en fresco de frutas y verduras.

La digestión anaerobia (DA) es una tecnología de aprovechamiento de los RSO capaz de reducir la carga orgánica y dar valor agregado por medio de la producción de biogás, el cual tiene una composición que se puede estimar en proporciones de 50-70

% de metano, 30-50 % de dióxido de carbono y otros gases como vapor de agua, sulfuro de hidrógeno y amoníaco. El metano contenido en el biogás es capaz de producir energía cuando es quemado (Parra-Ortiz *et al.*, 2019), pudiendo ser sustituto de combustibles fósiles y así disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera.

Sin embargo, el proceso de DA puede ser afectado por agentes inhibidores, uno de ellos es el D-limoneno, aceite esencial presente en los RSC. Como resultado de la inhibición se ve afectada la actividad de las poblaciones microbianas, lo cual disminuye el rendimiento de biogás producido. A partir de esto, surge la necesidad de adaptar y conocer la composición de las poblaciones microbianas que se encuentran en el inóculo especializado para el consumo de sustratos complejos durante el proceso de DA, y que al mismo tiempo se obtenga una fuente de energía verde, generando conocimiento de frontera. Un factor clave para la obtención de un buen rendimiento de metano durante la DA es la población microbiana presente en el inóculo. De la misma manera, se debe considerar el reactor utilizado para el proceso, entre los que destacan los reactores de alta carga de biopelícula como el Reactor anaerobio híbrido (RAH).

De modo que, en la presente investigación se llevó a cabo la obtención de un inóculo anaerobio que sea especializado en el consumo de sustratos complejos conformados por la fracción líquida de mezclas de residuos sólidos orgánicos (RSO) y residuos sólidos cítrico (RSC) para la producción de biogás.

## **OBJETIVO**

Llevar a cabo la obtención de un inóculo anaerobio que sea especializado en el consumo de sustratos complejos para la producción de biogás.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Obtener y caracterizar fisicoquímicamente un sustrato complejo proveniente de la mezcla de residuos sólidos orgánicos y cítricos.
2. Monitorear y caracterizar fisicoquímicamente la biopelícula de un reactor anaerobio de alta carga como inóculo especializado.
3. Realizar ensayos de biodegradabilidad anaerobia empleando tres mezclas de residuos sólidos orgánicos y cítricos.
4. Analizar la composición del inóculo anaerobio especializado a través de biología molecular.

# **CAPÍTULO 1**

## **FUNDAMENTOS TEÓRICOS**



---

## CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Generación de residuos sólidos orgánicos y cítricos en México

En México, se generan 23 millones de toneladas de residuos sólidos orgánicos (RSO) por año, lo cual representa el 51.6 % de los residuos sólidos urbanos generados en el país (SEMARNAT, 2019). Los RSO se componen principalmente de residuos de alimentos, frutas y verduras, provenientes de plantas procesadoras de alimentos, cocinas domésticas o comerciales, cafeterías o restaurantes, y de mercados municipales. Los residuos orgánicos tienen un alto potencial para la generación de energía a través de la digestión anaerobia (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017; Horan *et al.*, 2018).

Los RSO incluyen dentro de su composición a los residuos sólidos cítricos (RSC). En México, los cítricos son considerados uno de los principales productos agrícolas de exportación y frutos de elevado consumo en fresco y procesados. Para el periodo 2016-2030 se tiene estimado que la producción potencial tendrá un crecimiento promedio anual del 3.34 % (SAGARPA, 2016). De acuerdo con reportes del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) (2021) las naranjas son el cítrico más sembrado en México, con 349,421 hectáreas, siendo el estado de Veracruz el principal productor con un 51 % del total de producción en el país, seguido de Tamaulipas con un 16 %, San Luis Potosí con un 8 %, Nuevo León con un 7 % y Puebla con un 6 %. Por otro lado, México tiene destinadas 221,918 hectáreas a la siembra de limón, siendo los principales estados productores Veracruz con un 27 %, Michoacán con un 26 %, Oaxaca y Colima con un 10 % cada uno y Jalisco con un 3 % (USDA, 2021). La actividad agrícola de los cítricos representa un gran beneficio económico para México y los estados productores.

Entre los años de 2016 y 2022, en promedio, fueron consumidas en fresco 2.4 millones de toneladas de naranja; 1.5 millones de toneladas de limón y 0.4 millones de toneladas de toronja en México, siendo un consumo en fresco de cítricos de 4.3

millones de toneladas (USDA, 2022). Se estima que alrededor del 50 % en peso de los cítricos consumidos es desechado, por lo que fueron desechadas 1.2 millones de toneladas de naranja, 0.8 millones de toneladas de limón y 0.2 millones de toneladas de toronja, sumando un total de residuos cítricos generados de 2.1 millones de toneladas, en la Figura 1.1 se muestran estas estadísticas. De este modo, los RSC representan aproximadamente el 9.4 % de RSO generados en México, lo cual es representado en la Figura 1.2.

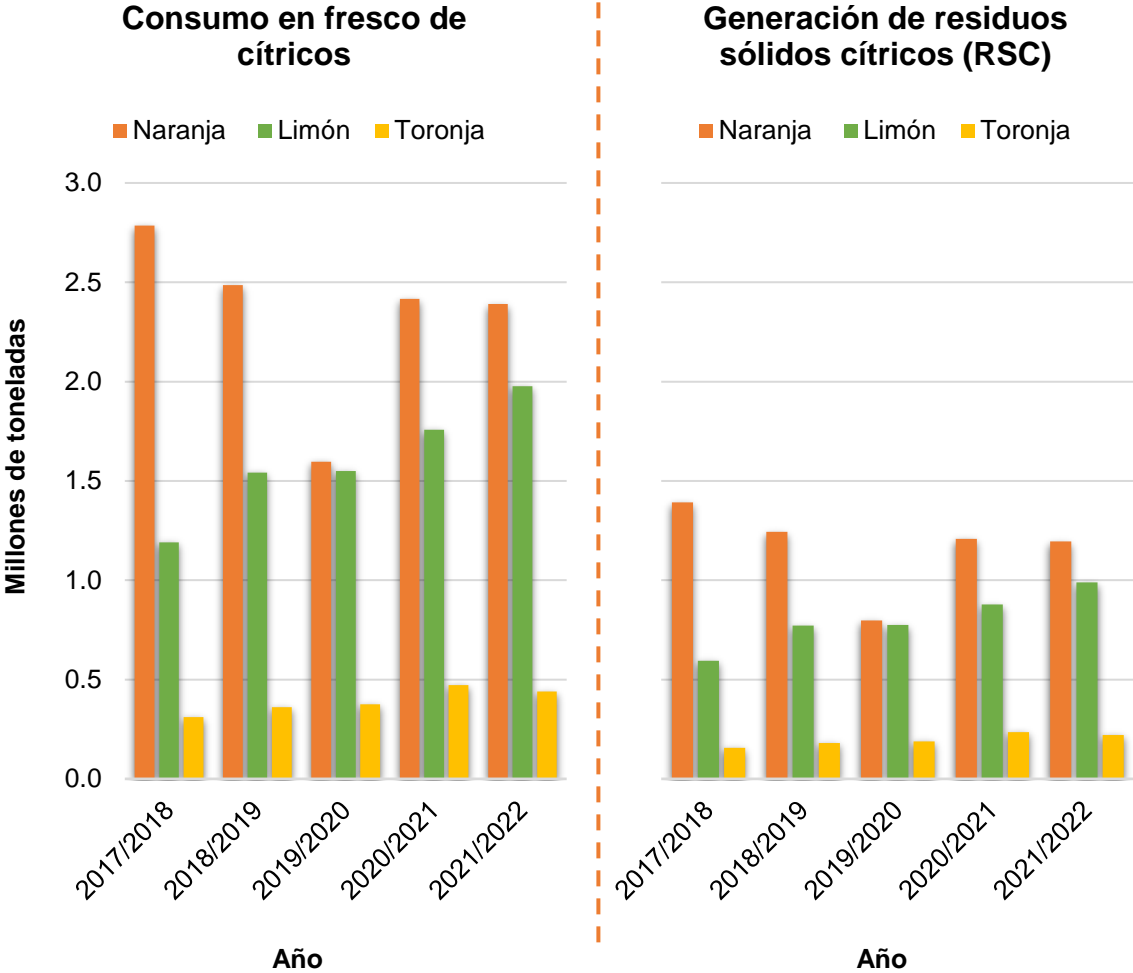


Figura 1.1 Consumo en fresco de cítricos y generación de RSC en México (USDA, 2022)

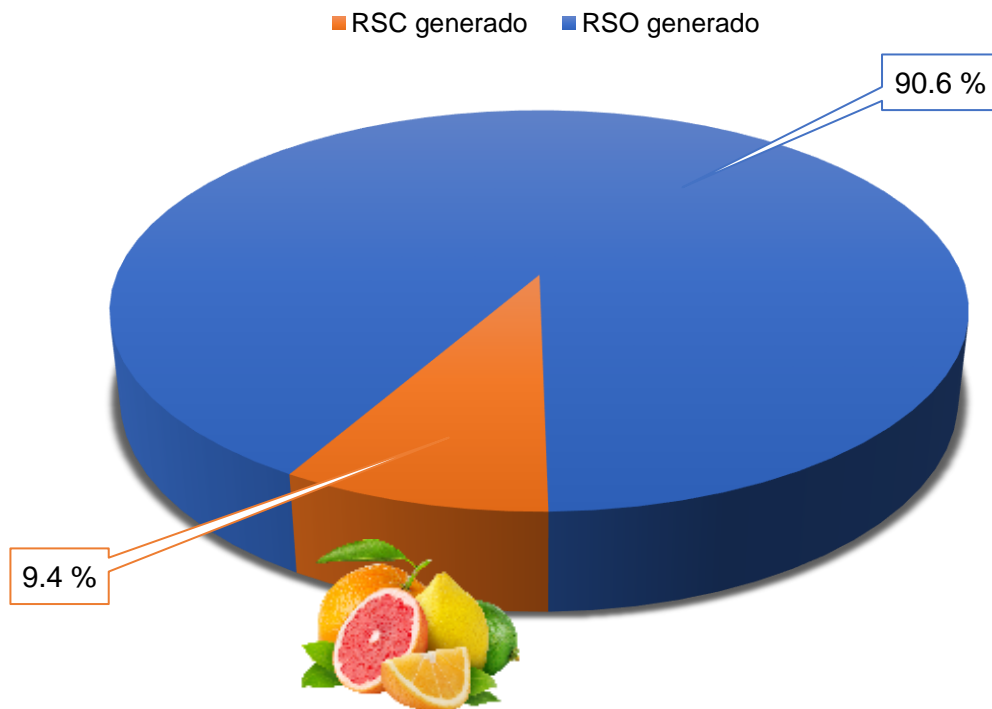


Figura 1.2 Aportación de residuos sólidos cítricos a los residuos sólidos orgánicos en México (SEMARNAT, 2019; USDA, 2022)

### 1.1.1 Impacto de los residuos sólidos orgánicos y cítricos en México

Para los gobiernos municipales, el manejo y disposición de los RSO representa un gran reto. Generalmente, los RSO son dispuestos en rellenos sanitarios, donde se convierten en la principal fuente de riesgos ambientales tales como generación de olores, de compuestos volátiles orgánicos, contaminación por lixiviados y emisiones de gases de efecto invernadero (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017). Por esa razón, se han desarrollado investigaciones para mejorar y optimizar tecnologías alternativas para el tratamiento de los residuos sólidos orgánicos.

### 1.2 Digestión anaerobia como tratamiento de residuos sólidos orgánicos

La digestión anaerobia de los residuos sólidos orgánicos se puede definir como un proceso bioquímico en el que ocurre la conversión de residuos sólidos orgánicos a dos productos de alto valor agregado: biogás y lodos estabilizados, también conocidos

como digestato (Chatterjee y Mazumder, 2019; Zamri *et al.*, 2021). El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo en ambientes pobres en oxígeno e implica la descomposición de la materia orgánica en biogás y otros gases traza, así como un efluente residual.

### 1.2.1 Etapas de la digestión anaerobia

Se identifican cuatro etapas durante la digestión anaerobia: 1) hidrólisis, 2) acidogénesis, 3) acetogénesis y 4) metanogénesis. Dichas etapas se pueden diferenciar debido a las diferentes poblaciones microbianas y los parámetros óptimos específicos necesarios para cada una (Horan *et al.*, 2018). En la Figura 1.3 se muestra el proceso de digestión anaerobia.

En el proceso de digestión anaerobia se ve involucrada una compleja red trófica: la materia orgánica es degradada secuencialmente por una variedad de microorganismos, a continuación se enuncian y describen cada una de las etapas de la DA (López-Vázquez *et al.*, 2017).

- Hidrólisis

Durante la hidrólisis, la materia orgánica insoluble de alto peso molecular es degradada en moléculas solubles simples por enzimas extracelulares. En esta fase, los componentes orgánicos de carbohidrato, proteína y polímeros lípidos son hidrolizados en azúcar, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga, respectivamente. De igual manera, los compuestos insolubles de celulosa y hemicelulosa son hidrolizados para producir monosacáridos. Esta tarea es llevada a cabo por bacterias hidrolíticas y fermentativas (López-Vázquez *et al.*, 2017).

- Acidogénesis

En la fase de acidogénesis, los productos hidrosolubles y de hidrólisis, como el azúcar simple, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga, se degradan aún más hasta

ácidos orgánicos de cadena corta, como los ácidos fórmico, acético, propiónico, butírico y pentanoico; alcoholes, como el metanol y etanol; aldehídos; dióxido de carbono e hidrógeno. Generalmente se considera que los productos creados en la acidogénesis son el alcohol y los ácidos grasos volátiles (AGVs), así como también material celular nuevo. En esta fase intervienen bacterias fermentativas (López-Vázquez *et al.*, 2017; Zamri *et al.*, 2021).

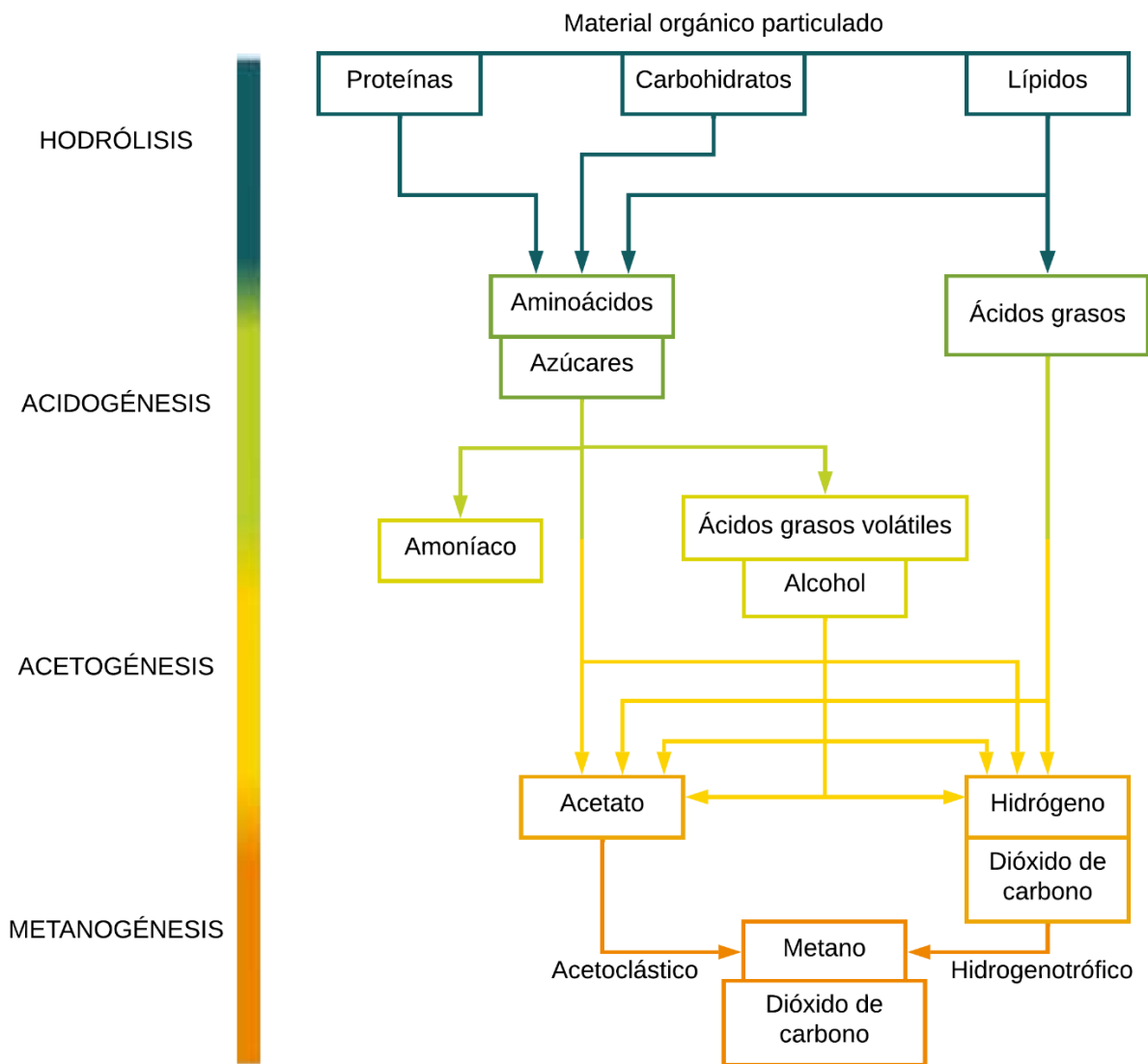


Figura 1.3 Diagrama del proceso de la digestión anaerobia

- Acetogénesis

La fase de acetogénesis produce productos intermedios esenciales para la generación de metano. En esta fase, las bacterias acetogénicas sintróficas metabolizan los ácidos grasos volátiles, alcoholes, algunos aminoácidos y compuestos aromáticos en sustratos de metanogénesis como el acetato, hidrógeno y dióxido de carbono, así como nuevo material celular. En esta etapa intervienen bacterias acetogénicas productoras y consumidoras de hidrógeno (López-Vázquez *et al.*, 2017; Zamri *et al.*, 2021).

- Metanogénesis

En la fase de metanogénesis, el ácido acético y el hidrógeno que se formaron en la fase de acetogénesis se transforman en biometano por vía metanogénica. Durante el proceso, el pH del proceso de conversión subirá a valores neutrales dentro del rango de 6.8–8. Las arqueas responsables de esta fase se conocen como metanógenas acetoclásticas o acetótrofes y metanógenas hidrogenotróficas o reductoras de CO<sub>2</sub>, los cuales pertenecen al dominio Arquea (López-Vázquez *et al.*, 2017; Zamri *et al.*, 2021).

### **1.2.2 Factores que influyen en la eficiencia de la digestión anaerobia**

Las condiciones de trabajo que se presenten durante el proceso de la digestión anaerobia tienen influencia en la producción de biogás, el proceso se ve afectado por factores como el potencial de hidrógeno (pH), la temperatura, la relación Carbono:Nitrógeno (C:N), la carga volumétrica aplicada (Cva), el tiempo de residencia hidráulica (TRH) (Zamri *et al.*, 2021), el inóculo, el contenido orgánico del sustrato y su biodegradabilidad y la inhibición por compuestos tóxicos (Akunna, 2019).

- Potencial de Hidrógeno (pH)

El valor de pH es un factor que caracteriza la alcalinidad o acidez del sustrato. La estabilidad de la actividad de las bacterias acidogénicas y metanogénicas está afectada directamente por los cambios en el pH. Las condiciones óptimas de pH para las etapas acidogénicas es en el rango de 5.5 a 6.5; mientras que para las etapas metanogénicas es en el rango de 6.5 a 8.2. Con el propósito de mantener la estabilidad en el pH, se puede utilizar bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) o hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) (Zamri *et al.*, 2021).

- Temperatura

Un proceso eficiente de digestión anaerobia depende de la temperatura óptima. La digestión anaerobia se puede llevar a cabo en condiciones psicrófilas (10 a 30 °C), mesófilas (30 a 40 °C) o termófilas (50 a 60 °C). Comúnmente se aplican las condiciones termófilas y mesófilas, las condiciones mesófilas brindan mayor estabilidad durante el proceso (Zamri *et al.*, 2021). En condiciones termófilas, las bacterias metanogénicas son más sensibles a las fluctuaciones en la temperatura (Rawoof *et al.*, 2020).

- Relación Carbono:Nitrógeno (C:N)

El carbono y el nitrógeno son las fuentes esenciales de energía y desarrollo de nueva estructura celular, también indican el nivel de nutrientes del sustrato. Este factor representa la relación entre la cantidad de Carbono y Nitrógeno presente en la materia orgánica y se requiere una relación C:N óptima para un proceso de digestión anaerobia efectiva. Un valor alto de la relación C:N indica las fuentes bajas de nitrógeno que se necesitan para sostener el suministro de materia para la digestión. Mientras que, un valor bajo de la relación C:N significa el potencial de inhibición del amonio ( $\text{NH}_4$ ) en el proceso de digestión. Idealmente, el valor óptimo de la relación C:N para el proceso de digestión anaerobia está dentro del rango de 20 a 35 (Zamri *et al.*, 2021).

- Carga volumétrica aplicada (Cva)

La carga volumétrica aplicada 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 SSV (o también SST) añadidos por unidad de volumen del reactor por día. Cuanto mayor sea la carga volumétrica aplicada que un sistema pueda tratar correctamente, será mayor la rentabilidad del sistema (Akunna, 2019).

- Tiempo de residencia hidráulica (TRH)

El tiempo de residencia hidráulico es definido como el periodo de retención del sustrato dentro del reactor para la generación de biogás. El periodo depende del tipo de sustrato y la temperatura del reactor (Zamri *et al.*, 2021).

- Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para conocer los contaminantes presentes en las aguas residuales, se considera uno de los parámetros más importantes: la DQO. En las pruebas estandarizadas de DQO la mayoría de los contaminantes orgánicos son convertidos a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, estas pruebas consisten en hacer uso de dicromato como oxidante a altas temperaturas (López-Vázquez, *et al.*, 2017).

El tratamiento anaerobio es el más adecuado para tratar aguas residuales que contengan concentraciones de DQO de intermedias a altas. En un sistema eficiente, es posible una remoción de DQO de entre el 80-90 %. La composición química de las aguas residuales es uno de los principales indicadores de la susceptibilidad de la materia orgánica al tratamiento biológico anaerobio. En la Figura 1.4 se muestra la relación de biodegradabilidad y el tiempo de retención para diferentes tipos de compuestos orgánicos (Akunna, 2019).



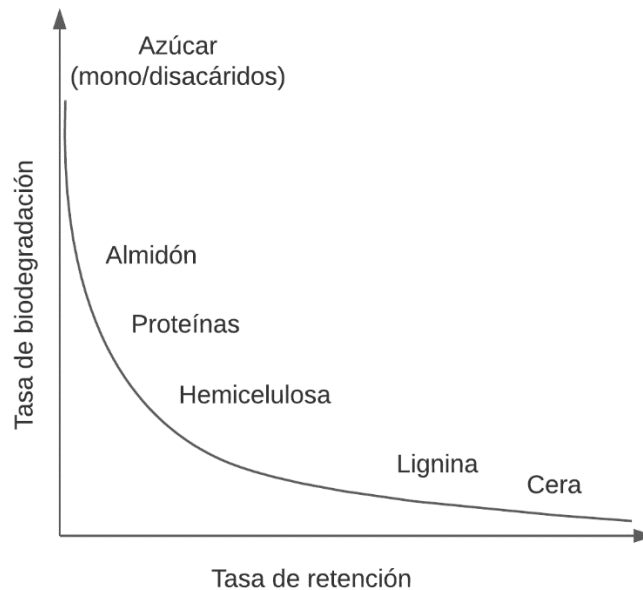


Figura 1.4 Tasa de biodegradabilidad

### 1.3 Producción de biogás

El biogás es un combustible gaseoso inflamable, producido por una fermentación anaerobia de material orgánico (Escamilla-García *et al.*, 2016). El biogás es considerado una alternativa eficiente para solucionar la escasez de energía en áreas pequeñas y su producción incluye ventajas significativas, como el tratamiento de materia orgánica y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera (Escamilla-García *et al.*, 2016). El biogás es inherentemente renovable, por el contrario de los combustibles fósiles, ya que es generado directamente por la biomasa, siendo así un mejorador del recurso energético y un conservador de los recursos naturales de un país (Abanades *et al.*, 2022). Las fuentes renovables de energía son aquellas que disponen la energía a partir de procesos permanentes y naturales, con posibilidades técnicas de explotarse económicamente. Así mismo, el biogás es considerado como energía primaria, la energía primaria incluye a los productos energéticos que son extraídos directamente de los recursos naturales (SENER, 2021).

El biogás producido en el proceso de digestión anaerobia cuenta con una composición variable, la cual que depende en su mayoría del tipo de sustrato y las condiciones de operación del reactor; sin embargo, el contenido se puede estimar de la siguiente manera: entre 50-70 % de metano ( $\text{CH}_4$ ), 30-50 % de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y gases como vapor de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). De los gases enumerados, solo el metano es capaz de producir energía (López-Vázquez *et al.*, 2017; Parra-Ortiz *et al.*, 2019), el metano presente en el biogás posee un poder calorífico alrededor de  $9.94 \text{ kWh/m}^3$  en condiciones estándar de temperatura y presión (Rosas-Mendoza *et al.*, 2020).

### **1.3.1 Uso de biogás como bioenergía en México**

En lo que respecta a la producción y uso de biogás en México, la mayoría de las iniciativas o tentativas de aplicación del año 2005 a la fecha no han alcanzado los resultados que se proyectaban. A pesar de que existen numerosos programas de fomento de energías renovables, la bioenergía y el biogás se han encontrado en los últimos lugares en las estadísticas de energías limpias. Se estima que en México se producen actualmente alrededor de  $114 \text{ Mm}^3/\text{a}$  de biogás, lo cual es una pequeña fracción de la meta de energía limpia para el año de 2024 (Gutiérrez, 2018).

De acuerdo con los datos de la SENER (2021) en el Balance Nacional de Energía 2020, se tiene que en el año de 2020 el biogás representó tan solo el 0.04 % de la generación de energía primaria en México. Considerando el periodo de 2012 a 2020, el promedio anual de generación eléctrica en Petajoules (PJ) en México es de 2.24 PJ. Por otro lado, de acuerdo con estadísticas del periodo de 2012 a 2020 de la Agencia Internacional de Energía Renovable (IRENA, por sus siglas en inglés) (2022) se tiene lo siguiente: el promedio de la generación eléctrica anual por biogás en el mundo es de 302.54 PJ y en México es de 0.67 PJ. Con estos datos se puede estimar que México aporta el 0.22 % de PJ de generación eléctrica en el mundo por concepto de biogás. En la Figura 1.5 se muestra el incremento de la generación eléctrica anual con base en los dos informes, tanto internacional como nacional; en la misma se puede observar

que los datos que reporta la SENER son mayores a los reportados por la IRENA, sin embargo, ambas mantienen tendencias de incremento, aunque en los años del 2019 y 2020 se nota una reducción considerable con respecto al año de 2018 que fue el que mayor generación de energía registró.

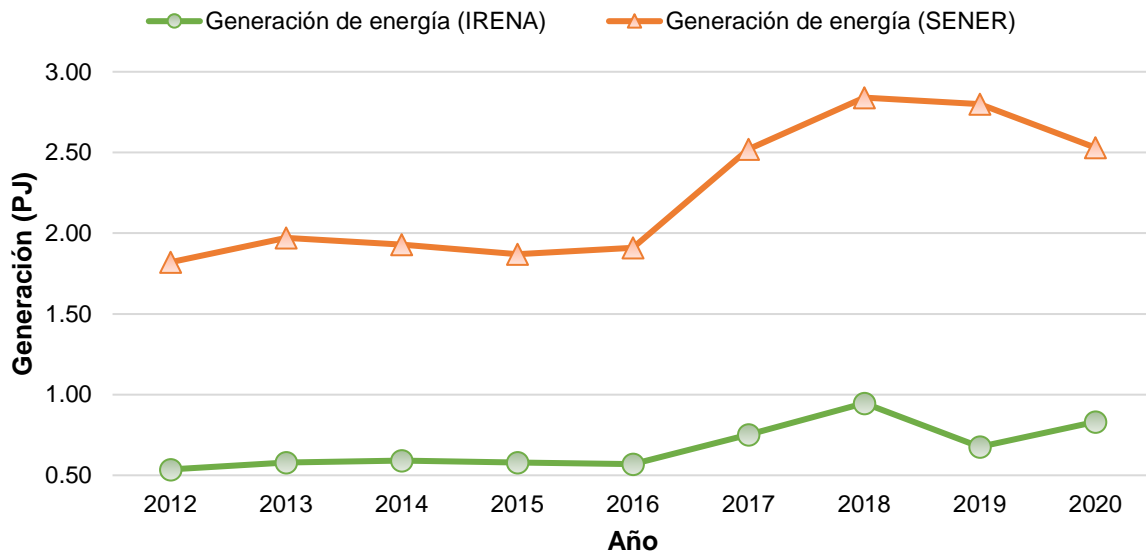


Figura 1.5 Incremento de la generación de energía por concepto de biogás en México (IRENA, 2022; SENER, 2021)

## 1.4 Sustrato complejo para la digestión anaerobia

Un sustrato es considerado como complejo para la digestión anaerobia cuando es difícil de tratar con esta tecnología. Generalmente se trata de sustratos que en su composición presentan algún compuesto inhibidor para la población microbiana encargada de realizar la fermentación propia de la digestión anaerobia.

### 1.4.1 Composición de los residuos sólidos cítricos

Los residuos cítricos consisten principalmente de: (a) residuos generados por el jugo de la industria manufacturera, constituido por cáscara y pulpa prensada; (b) fruta descartada por razones comerciales (por ejemplo, fruta dañada); y (c) fruta descartada debido a regulaciones que limitan la producción. Los residuos cítricos comúnmente

tienen un bajo pH (3-4), un alto contenido de agua (80-90 %), un alto contenido de materia orgánica (alrededor de 95 % de sólidos totales) y un alto contenido de carbohidratos en su composición. Los tratamientos térmicos alternativos no se pueden aplicar a los residuos cítricos debido a su alto contenido de agua (Ruiz y Flotats, 2014).

### **1.5 Inhibición durante la digestión anaerobia**

Los procesos anaerobios pueden ser inhibidos por sustancias contenidas en los desechos que son tóxicas para los microorganismos. Los inhibidores microbianos más comunes incluyen al amoníaco, sulfuro, ácidos grasos de cadena larga, sales, metales pesados, compuestos fenólicos, xenobióticos (Akunna, 2019) y, para el caso de los residuos cítricos, los aceites esenciales como el D-limoneno (Ruiz y Flotats, 2014).

De igual manera, se pueden presentar algunas toxinas orgánicas, como los ácidos grasos de cadena larga y los medicamentos, los cuales son capaces de inhibir la metanogénesis. Los ácidos grasos de cadena larga pueden dañar a los metanógenos debido a la permeabilidad y la reducción de la tensión superficial de la membrana de la célula microbiana (Wang *et al.*, 2018).

#### **1.5.1 El D-limoneno como inhibidor de la digestión anaerobia**

Los aceites esenciales cítricos son líquidos que contienen, entre otros componentes, los compuestos aromáticos volátiles de plantas cítricas. Sus propiedades antimicrobianas son bien conocidas, han sido reportadas y utilizadas con fines medicinales desde al menos el siglo IV y también como agentes antimicrobianos para la conservación de alimentos. El principal componente de los aceites esenciales son los terpenos (Han *et al.*, 2020; Ruiz y Flotats, 2014). En la mayoría de los cítricos, se ha encontrado que el D-limoneno es el compuesto mayormente acumulado en diferentes tejidos, tales como el flavedo y sacos de aceite (Zhang *et al.*, 2022). En los cítricos, se encuentra con una concentración de 73.9 - 97 % (Satari y Karimi, 2018). En la Figura 1.6 se muestran los tejidos de una naranja como ejemplo de un cítrico.

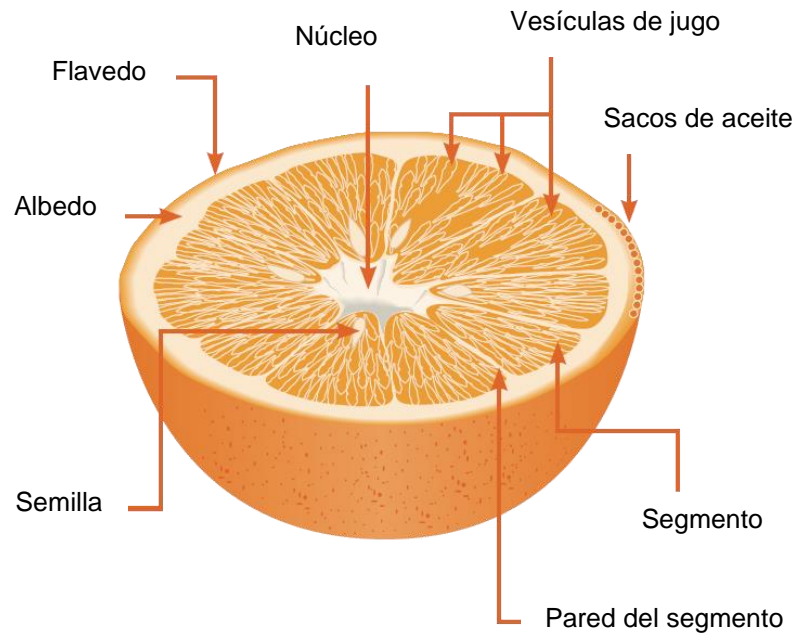


Figura 1.6 Anatomía de una naranja

El D-limoneno (1-metil-4-(1-metiletenilo)ciclohexano)) es un monoterpene monocíclico con fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ , su estructura química se presenta en la Figura 1.7. A temperatura ambiente, es un líquido incoloro y existe en dos isómeros comunes, L- y D-limoneno (Ruiz y Flotats, 2014; Sun, 2007).

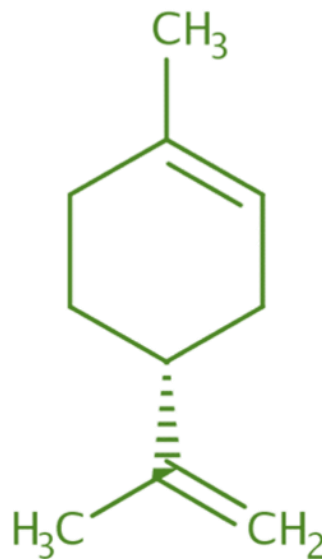


Figura 1.7 Estructura química del D-limoneno

El D-limoneno inhibe significativamente a bacterias gram-negativas y gram-positivas, de igual manera, se ha reportado que tiene actividad fungicida. Así mismo, diversos investigadores han confirmado que el D-limoneno puede inhibir efectivamente el crecimiento de *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* e incluso provocar su deceso (Han *et al.*, 2020); cabe resaltar que estas especies juegan un papel importante en el proceso de digestión anaerobia en las diferentes etapas previas a la etapa en la que se produce el metano, la metanogénesis.

Algunos de los efectos que provoca el D-limoneno en las bacterias fueron reportadas por Han *et al.* (2020): destrucción de la pared celular y membrana celular, lo cual provoca que exista una fuga de las proteínas y ácidos nucleicos; simultáneamente, el D-limoneno puede inhibir la síntesis de ATP al afectar la actividad de la ATPasa, y también la compleja actividad de la cadena respiratoria, lo cual lleva a trastornos metabólicos y respiratorios en la célula y conducir finalmente a la muerte celular.

## **1.6 Inóculo en la digestión anaerobia**

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. Las características microbianas de un inóculo dependen del tipo de sustrato y las condiciones operativas de su fuente. Se puede obtener un inóculo apropiado a partir de reactores anaerobios activos, preferentemente de aquellos que tratan tipos similares de residuos o lodos residuales (Akunna, 2019).

### **1.6.1 Poblaciones microbianas presentes durante la digestión anaerobia**

La actividad microbiana y la composición del biogás producido durante la DA es una consecuencia directa del tipo de sustrato que se esté degradando en el proceso. Las primeras etapas de la DA (hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis) son producto de distintas poblaciones bacterianas, mientras que la última etapa (metanogénesis) es llevada a cabo por grupos especializados de arqueas metanogénicas (Ziganshin *et al.*,

2013). En la Tabla 1.1 se muestran las etapas de la digestión anaerobia y las especies microbianas que participan en las mismas (Akunna, 2019; Rawoof *et al.*, 2020; Zamri *et al.*, 2021).

Tabla 1.1 Etapas de la digestión anaerobia y las especies microbianas participantes (Akunna, 2019; Rawoof *et al.*, 2020; Zamri *et al.*, 2021)

<b>Etapa</b>	<b>Microorganismos</b>
<b>Hidrólisis</b>	<i>Acetovibrio, Bacillus, Bacteroides, Butyrivibrio, Clostridium, Eubacterium, Micrococcus, Lactabaccillus, Peptococcus, Proteus vulgaris, Ruminococcus, Staphylococcus, Streptococcus</i> , entre otras.
<b>Acidogénesis</b>	<i>Acetivibrio, Actinomyces, Aminobacterium, Anaerococcus, Bacillus, Bacteroides, Butyrivibrio, Caldicellulosiruptor, Cellulomonas, Clostridium, Escherichia coli, Eubacterium, Eubacteriumlimosum, Desulfobacter, Desulforomonas, Desulfovibrio, Halocella, Lactobaccillus, Pelobacter, Peptococcus Anaerobus, Pseudomonas, Psychrobacter, Sarcina, Selenomonas, Spirochaeta, Staphylococcus, Streptococcus, Veillonella</i> , entre otras.
<b>Acetogénesis</b>	<i>Acetobacterium woodii, Methanobacillus omelionskii, Clostridium aceticum, Smithella, Syntrophobacter, Syntrophomonas buswellii, Syntrophomonas wolfei, Syntrophomonas wolinii</i> , entre otras.
<b>Metanogénesis</b>	Metanógenas acetótrofas: <i>Methanococcusmazei, Methanosaeta, Methanosarcina, Methanosarcinabarkeri, Methanotherixsoehngeni</i> , entre otras. Metanógenas reductoras de CO <sub>2</sub> : <i>Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanoplanus, Methanospirillum</i> , entre otras.

Como lo enuncian Atlas y Bartha (2002), el árbol filogenético de la vida que se muestra en la Figura 1.8, basado en homologías del ARN ribosómico 16S, indica que divergieron tres líneas evolutivas para formar tres dominios diferentes: Bacteria (eubacterias), Arquea (Arqueabacterias) y Eucaria (eucariotas). La similitud que presentan los dominios Bacteria y Arquea es que son consideradas como procariotas. Las procariotas son organismos de una sola célula pero pueden existir en asociación formando colonias con algunas diferencias de funciones celulares, las procariotas

tienen los organelos mínimos necesarios para los procesos vitales y no contienen núcleo en el cual se aloje el ADN (Campbell y Farrell, 2015).

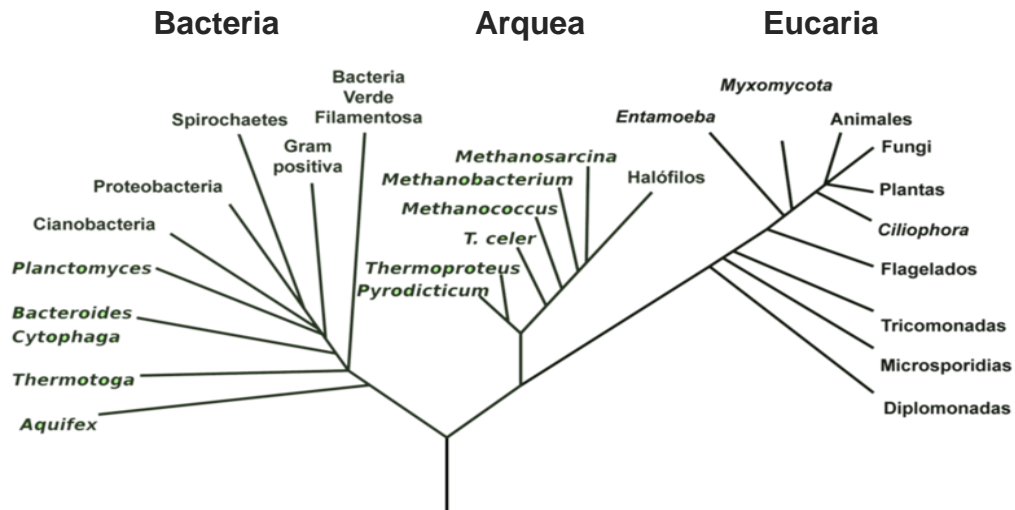


Figura 1.8 Árbol filogenético de la vida, dominios Bacteria, Arquea y Eucaria

La separación de los dominios Bacteria, Arquea y Eucaria ocurrió pronto en la historia de la evolución celular, y Arquea diverge entre Bacteria y Eucaria, siendo más próximo a Eucaria. Algunas de las diferencias entre el dominio Bacteria y Arquea se enumeran en la Tabla 1.2 (Atlas y Bartha 2002).

Tabla 1.2 Diferencias entre los dominios Bacteria y Arquea

Bacteria	Arquea
Membranas citoplasmáticas compuestas de lípidos con cadenas largas de ácidos grasos unidos al glicerol por enlaces éster.	Membranas citoplasmáticas con diéteres de glicerol y tetraéteres de glicerol, las cuales son adaptaciones para la supervivencia a altas temperaturas.
Mayor evolución a lo largo del tiempo.	Menor evolución a lo largo del tiempo.
Mecanismos de intercambio genético y de recombinación más desarrollados.	Mecanismos de intercambio genético y de recombinación relativamente limitados.
Reproducción asexual por fisión binaria, pero también por transformación, transducción y conjugación.	Reproducción sexual, sin muchos mecanismos para la reproducción.



## 1.7 Técnicas de biología molecular

Con el objetivo de analizar la estructura comunitaria de diferentes poblaciones microbianas y mejorar a su vez la degradación de la materia durante la DA, en los últimos años se han desarrollado y reportado diversas técnicas de biología molecular.

Información valiosa se reveló de la aplicación de estos enfoques moleculares: la mayoría de microorganismos en hábitats naturales y en reactores de producción de biogás mediante digestión anaerobia todavía se encuentran sin cultivar; de esta forma, su aislamiento y cultivo contribuiría a una comprensión más profunda de la ecología y funciones de estas poblaciones microbianas (Sanz y Köchling, 2019; Ziganshin *et al.*, 2013), aunado a la oportunidad de aplicarlos en la degradación especializada de sustratos complejos.

Con la aplicación de técnicas propias del área de biología molecular a los procesos de tratamiento de residuos orgánicos se ha profundizado en el conocimiento de la microbiota que habita en los sistemas de tratamiento. Algunas de las técnicas que se han utilizado a lo largo de los años son la Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés), Hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés), Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés), sin embargo existe otra técnica que puede ser utilizada para la secuenciación simultánea de grandes cantidades de muestras o diferentes plantillas de ADN: las técnicas de Secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) (Sanz y Köchling, 2019).

### 1.7.1 Secuenciación genética masiva

La Secuenciación genética masiva (SGM) o también conocida como NGS permite la acumulación de información cualitativa y cuantitativa sobre cualquier tipo de ácido nucleico en una muestra dada, con un buen rendimiento y con costos relativamente bajos (Reis-Filho, 2009). Esta tecnología puede generar varios cientos de miles a decenas de millones de lecturas de secuenciación en paralelo, con esta capacidad de

rendimiento se puede generar lecturas de secuencia de bibliotecas fragmentadas de un genoma específico (Shokralla *et al.*, 2012).

En la SGM, el gen que más se utiliza por ser taxonómicamente informativo es el gen del ARN ribosómico 16S, el cual es un marcador filogenético establecido utilizado para la identificación procariota. La secuenciación del rARN 16S permite inferir las relaciones filogenéticas microbianas ya que este gen codifica la pequeña subunidad de ribosomas procariotas, de los cuales su función principal es el proceso de traducción y se presenta tanto en el dominio Bacteria como Arquea (Boers *et al.*, 2019).

El gen rARN 16S tiene aproximadamente 1500 pares de bases en tamaño y su estructura genética comprende nueve regiones altamente conservadas y nueve hipervariables (V1-V9). Las regiones conservadas pueden servir como sitios de unión de cebadores universales para la amplificación por PCR de fragmentos de genes mientras que las regiones hipervariables contienen una diversidad considerable de secuencias, las cuales son útiles para propósitos de identificación procariota (Boers *et al.*, 2019).

Los pasos que seguir en la SGM se enuncian a continuación y se presentan en la Figura 1.9: (1) Recolección de las muestras, extracción del ADN y mediante PCR la simplificación del gen rARN 16S. (2) Secuenciación de un fragmento de gen rARN 16S mediante SGM, produciendo un conjunto de lecturas. (3) Procesamiento de las secuencias usando diferentes softwares y comparación con bases de datos. (4) Evaluación estadística y gráfica con programas computacionales y librerías funcionales (Sanz y Köchling, 2019).

Las plataformas comerciales más populares para la SGM en el ámbito de tratamiento de residuos y aguas residuales son: 1) 454-pyrosequencing (Roche), el cual fue intrucido al comercio en el año de 2005 y fue la primera tecnología de SGM en volverse comercialmente disponible, manteniéndose como la tecnología de SGM dominante en el mercado por una década; 2) Illumina (Illumina Inc.) introdujo su analizador genómico

Illumina MiSeq en el año de 2011, el cual ha reemplazado la tecnología de Roche debido a la gran capacidad que posee, sus bajos costos y un bajo índice de error (Sanz y Köchling, 2019).

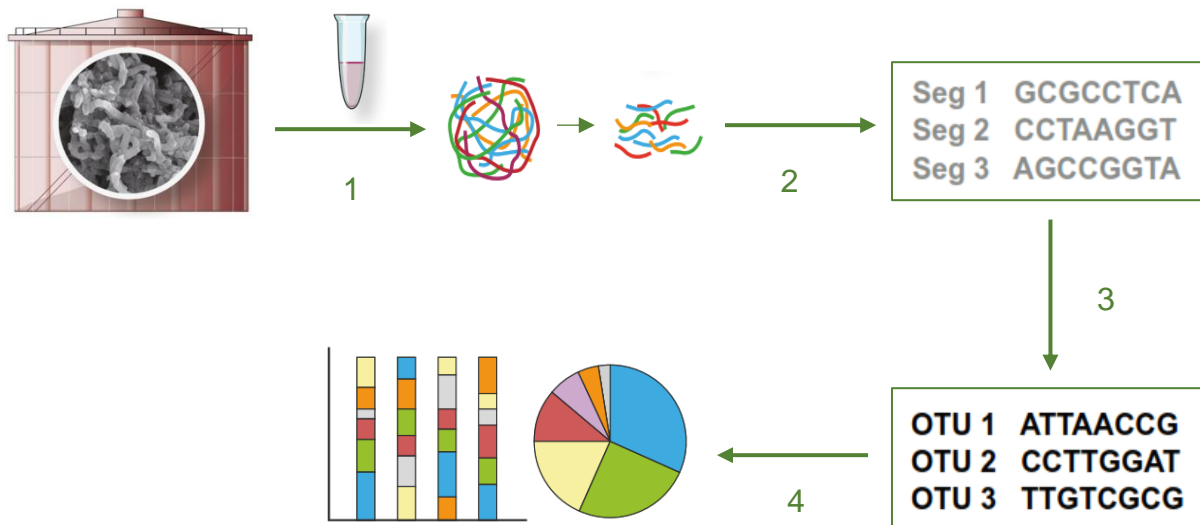


Figura 1.9 Pasos a seguir en la SGM

### 1.7.2 Secuenciación metagenómica shotgun

La secuenciación metagenómica shotgun es una técnica de alto rendimiento que permite el análisis genómico idealmente de todos los microorganismos en una muestra, no sólo de aquellos que son susceptibles a cultivo. Esta técnica se puede utilizar para perfilar la composición taxonómica y el potencial funcional de las poblaciones microbianas y para recuperar secuencias completas del genoma (Quince *et al.*, 2017). En el caso de la secuenciación metagenómica shotgun, el ADN es extraído de todas las células de la población microbiana, pero, en lugar de seleccionar un gen taxonómicamente informativo para la amplificación, todo el ADN es procesado en pequeños fragmentos que serán secuenciados de forma independiente, dando como resultado secuencias de ADN que se alinean con varias ubicaciones genómicas (Sharpton, 2014).

Un estudio típico de metagenómica shotgun comprende cinco pasos, después del diseño inicial del estudio (1) Recolección, procesamiento y secuenciación de las muestras. (2) Procesamiento de las lecturas de secuenciación. (3) Análisis de secuencia para perfilar las características taxonómicas, funcionales y genómicas del microbioma. (4) Análisis estadístico y biológico de posprocesamiento, y por último (5) Validación. La plataforma Illumina predomina en la metagenómica shotgun debido a su amplia disponibilidad, rendimientos muy altos y alta precisión. Sin embargo, Ion Torrent S5 o S5 XL son una alternativa que utilizar.

## **1.8 Reactores de alta carga**

A continuación, se describen algunos reactores considerados para el tratamiento de alta carga orgánica:

### **1.8.1 Reactores de flujo ascendente y manto de lodos (UASB)**

El reactor anaerobio de flujo ascendente y manto de lodos (UASB, por sus siglas en inglés) cuenta con ciertas ventajas: los costos de operación y mantenimiento son relativamente bajos comparado con otras tecnologías; no necesita ningún medio de soporte para el desarrollo de las poblaciones microbianas ya que la hidráulica dentro del reactor induce la formación de gránulos densos que se mantienen en la parte baja del reactor; la tasa de crecimiento de la biomasa es lenta por lo que una descarga de la misma sucede después de mucho tiempo. Entre las desventajas que presenta el reactor UASB es que el arranque puede tomar mucho tiempo, sobre todo cuando el inóculo inicial son lodos y no gránulos densos ya que es probable que el lodo sea llevado hacia arriba y expulsado fuera del reactor. La mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo en un reactor UASB son con sustratos fácilmente hidrolizables (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2014).

### **1.8.2 Reactores de lecho fluidizado inverso (IFB)**

El reactor de lecho fluidizado inverso (IFB, por sus siglas en inglés) consiste en el uso de partículas suspendidas con una densidad específica que es menor que la del líquido de tal forma que las partículas son fluidizadas hacia la abajo. El líquido y el biogás producido fluyen en sentidos contrarios, de tal forma que se promueve la expansión del lecho. Una de las ventajas con las que cuenta este reactor es que el flujo inverso reduce los requerimientos de energía debido a la baja velocidad de fluidización (Bialek *et al.*, 2014).

### **1.8.3 Reactores anaerobios híbridos (RAH)**

Considerando las características de estos reactores, sus ventajas y desventajas; y aunado a que se ha encontrado que una buena opción para el proceso de DA es el uso de reactores de alta carga de biopelícula con soportes pre colonizados (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017), se encuentra también un reactor anaerobio híbrido (RAH) que fue diseñado y utilizado en investigaciones previas por González-Paz (2015), Domínguez-Hernández (2016), Rosas-Mendoza (2018) y Juárez-García (2022), el cual consiste de dos secciones principales:

#### Sección 1: Lecho fijo (LF)

Se logra una distribución del flujo óptima a través del reactor mediante el LF pues se retiene una cantidad más grande de sólidos en él y a su vez se crea una biopelícula resistente tanto en el LF como en el LFI.

#### Sección 2: Lecho fluidizado inverso (LFI)

El flujo ingresa por la parte superior del reactor, al mismo tiempo el lecho posee una densidad menor a la del sustrato, por lo que el lecho flota en el líquido y se logra que las partículas sean fácilmente fluidizadas y se promueve un mayor contacto entre la

biopelícula y la materia orgánica del sustrato. Esta configuración permite tratar efluentes con un alto contenido de carga orgánica (Rosas-Mendoza, 2018).

## **1.9 Antecedentes y avances**

Como antecedentes, en los últimos años se han llevado a cabo múltiples investigaciones que estudian el rendimiento de metano en el biogás producido mediante DA utilizando como sustrato los residuos provenientes del procesamiento de los cítricos, así como estudios sobre la dinámica microbiana en la digestión anaerobia utilizando otro tipo de sustratos, la información es condensada en la Tabla 1.3.

Simultáneamente, el equipo de trabajo de la presente línea de investigación ha desarrollado múltiples avances con proyectos que involucran el tratamiento de efluentes de la industria citrícola mediante DA y optimizando los reactores utilizados para este fin.

### **1.9.1 Antecedentes**

Rosas-Mendoza *et al.* (2018), evaluaron la producción de biogás mediante digestión anaerobia para el tratamiento de efluentes provenientes de una industria citrícola sin pre tratamiento para la eliminación del D-limoneno. Dicha investigación se llevó a cabo utilizando un reactor anaerobio híbrido (RAH) que consistió de dos secciones: en la parte superior un lecho fijo de volumen útil de 0.26 L y en la parte inferior un lecho fluidizado inverso con un volumen útil de 2.53 L, siendo un volumen útil total de 2.76 L. El medio de soporte utilizado fue Extendsphere™. Los parámetros establecidos durante el proceso fueron: carga orgánica de 8 gDQO/Ld en modo continuo; condiciones mesófilas de  $35 \pm 2$  °C; el pH durante el proceso se mantuvo en un rango entre 6.8 y 7.2 con bicarbonato de sodio; con un periodo de operación de 158 días y con 1 día de residencia hidráulica. Obtuvieron una remoción de aproximadamente 85 % de DQO y rendimientos de metano de 0.15 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem.</sub>

Tabla 1.3 Antecedentes de la DA con sustrato complejo y análisis de dinámica microbiana

Sustrato complejo			Dinámica microbiana				
	Rosas-Mendoza <i>et al.</i> (2018)	Zema <i>et al.</i> (2018)	Wan <i>et al.</i> (2013)	Botello-Suárez <i>et al.</i> (2018)	Mudzanani <i>et al.</i> (2021)	Zhao <i>et al.</i> (2021)	Presente investigación (2022)
<b>Reactor</b>	RAH	CSTR	STR	UASB dos etapas	STR y CSTR	STR	RAH
<b>V (L)</b>	2.53	84	300	20 y 10	0.4 y 3	0.1 L	3.81
<b>T (°C)</b>	35 ± 2	42 / 51	36 ± 1	20 - 25	35 – 40 ± 1	35	35 ± 1
<b>pH</b>	7 ± 0.2	6.5 – 8.5	7	7 ± 0.2	6.5 – 8	N.E.	7 ± 0.2
<b>Sustrato</b>	Efluentes de la industria cítrica	Residuo industrial de cáscara de naranja	Residuos alimentarios municipales y hierba plateada china	Efluentes de la industria del café	Grano gastado de cerveza y lodos residuales municipales	Residuos de estiércol de pollo y cartón	Fración líquida de RSO y RSC, diferentes proporciones
<b>Inhibidor</b>	D-limoneno	D-limoneno	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	D-limoneno
<b>Inóculo</b>	Extendosphere™ colonizado	Digestato crudo	Lodos de una PTAR	N.E.	Lodos activados	Lodos granulares	Extendosphere™ colonizado
<b>Cva (gDQO/Ld)</b>	8	0.64	2.1	R1: 6.1 – 18.2 R2: 1.6 - 9.5	0.5	N.E.	5
<b>TRH (d)</b>	1	N.E.	N.E.	0.625, 1.25 y 2.5	1	17	1
<b>Periodo de operación (d)</b>	158	43	45	365	150	27	145
<b>DQO<sub>rem</sub> (%)</b>	85	N.E.	88.1	84	N.E.	N.E.	> 90
<b>Y<sub>CH4</sub> (LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub>)</b>	0.15	0.27 / 0.11	0.27	2.2 (L/d)	N.E.	0.319	N.E.
<b>Estudio de biología molecular</b>	N.E.	N.E.	PCR	qPCR y SGM	SEM	N.E.	Secuenciación metagenómica shotgun
<b>Población bacteriana dominante</b>	N.E.	N.E.	<i>Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Spirochaetes</i>	<i>Syntrophus y Candidatus Cloacimonas</i>	<i>Proteobacteria, Bacteroides, Firmicutes y Actinobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfobulbus propionicus, Mesotoga infera, Syntrophus aciditrophicus, Atribacter laminatus</i>
<b>Población metanogénica dominante</b>	N.E.	N.E.	N.E.	<i>Methanosaeta, Methanoculleus, Methanobacterium y Methanoma-ssilicoccus</i>	<i>Spirochaetae, Anaerolineae</i>	<i>Methanosaeta, Methanobacterium, Methanolinea, y Methanoma-ssilicoccus</i>	<i>Methanotherix soehngeni, Methanobacterium formicicum, Methanosarcina mazei</i>

Zema *et al.* (2018), también evaluaron la producción de metano en el biogás mediante digestión anaerobia de cáscara de naranja como residuo industrial sin pre tratamiento para la eliminación del D-limoneno. La experimentación se llevó a cabo en un CSTR de 84 L. El inóculo fue digestato crudo tomado de una planta comercial, alimentada principalmente por estiércol y residuos agro-industriales. Se llevaron a cabo dos pruebas, a diferentes condiciones de temperatura. Los parámetros establecidos durante el proceso fueron: condiciones mesófilas (M) de 42 °C y condiciones termófilas (T) de 51 °C; carga orgánica de 0.64 gDQO/Ld con aumentos graduales de 2.0 y 2.5 para las pruebas mesófilas y termófilas respectivamente; el pH durante el proceso se mantuvo en un rango entre 6.5 y 8.5 hasta que al finalizar la prueba se obtuvo un pH de 3.55 (M) y de 5.56 (T); con un periodo de operación de 43 días y con 1 día de residencia hidráulica. Obtuvieron rendimientos de metano en un rango de 0.27 – 0.49 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> (M) y 0.11 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub> (T).

Simultáneamente, se han realizado investigaciones de la dinámica microbiana en el proceso de digestión anaerobia mediante biología molecular empleando diferentes sustratos:

Wan *et al.* (2013), investigaron el potencial de la denominada “hierba plateada china” como co-sustrato para mejorar la digestión anaerobia de residuos sólidos alimentarios municipales. La investigación se llevó a cabo en un reactor agitado (STR) con un volumen útil de 300 L. Como inóculo utilizaron lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales. Se realizó el proceso de digestión anaerobia a condiciones mesófilas de 36 ± 1 °C. La relación de mezcla de residuos alimentarios y hierba plateada china fue de 50 % cada una, en base seca. Se llevó a cabo en condiciones semi húmedas. La carga orgánica fue de 2.1 gSV/Ld, el pH fue ajustado a valores cercanos a 7 utilizando carbonato de calcio. El tiempo de operación fue de 45 días. Obtuvieron una remoción final de DQO de 88.1 % y rendimientos de metano de 268.4 L/kgVS<sub>agregado</sub>. Para el análisis microbiológico, se utilizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) , en este caso obtuvieron los siguientes resultados: las bacterias presentes durante todo el proceso de digestión fueron *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y



*Proteobacteria*, *Spirochaetes* y otras bacterias no identificadas., sin embargo no se realiza la identificación de las etapas en las que participa cada una.

Botello-Suárez *et al.* (2018), estudiaron el efecto de la carga orgánica en el rendimiento y la composición microbiana de dos reactores UASB, teniendo como sustrato aguas residuales provenientes del procesamiento del café. Las pruebas se llevaron a cabo en dos reactores anaerobios UASB en serie, con volúmenes útiles de 20 L y 10 L. El proceso de digestión anaerobia fue realizado bajo condiciones mesófilas de en rangos desde los 20 °C a los 25 °C. La carga orgánica fue aumentando desde 6.1 hasta por encima de los 18.2 gDQO/Ld con un efluente en recirculación, el pH fue ajustado a  $7 \pm 0.2$  utilizando hidróxido de calcio. El tiempo de operación fue de 365 días, con tiempos de retención hidráulica de 15, 30 y 60 horas. Obtuvieron una remoción final de DQO de 84 % y rendimientos de metano de 2.2 L/d. Con el objetivo de conocer la dinámica microbiana, fue utilizada la secuenciación de última generación o secuenciación genética masiva (SGM) y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR); obtuvieron que las bacterias sintróficas presentes durante el proceso de digestión anaerobia fueron *Syntrophus* y *Candidatus Cloacimonas*, mientras que las metanógenas acetoclásticas e hidrogenotróficas fueron principalmente *Methanosaeta*, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanomassiliicoccus*.

Mudzanani *et al.* (2021), evaluaron la mejora de la producción de biogas utilizando una co-digestión de lodos residuales municipales con residuos de grano gastado de la cerveza, con un inóculo de lodos activados. La investigación fue llevada a cabo en reactor en modo batch y posteriormente en modo semi continuo. La etapa en modo batch se llevó a cabo en STR con un volumen útil de 400 mL, en condiciones mesófilas a  $35-40 \pm 1$  °C. Ambos modos fueron realizados a un pH de entre 6.5 y 8. Para la etapa en modo semi continuo, se llevó a cabo en un CSTR con un volumen útil de 3 L, con tiempos de residencia hidráulica de 24 h y un tiempo de operación de 150 días, se usaron niveles bajos de Cva hasta que fue aumentando gradualmente para mantenerse en 0.5 gSV/Ld. Se caracterizó la comunidad microbiana utilizando

microscopía electrónica de barrido, la cual funciona como nueva técnica para caracterización microbiana ya que las muestras orgánicas son sensibles a reaccionar al haz de electrones, encontraron que fue dominante el dominio bacteria , seguido del Arquea. De las primeras resaltaron *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Hay un buen conteo de especies metanógenas, entre las que resaltaron *Spirochaetae*, *Anaerolineae* y la familia más abundante de Arquea fueron *Methanomicrobiales*.

Zhao *et al.* (2021), investigaron el efecto de variaciones entre estiércol de pollo y cartón durante una co-digestión anaerobia, utilizando un inóculo de lodo granular. La experimentación se llevó a cabo en reactores STR modo batch de 100 mL , en condiciones mesófilas de 35 °C, la digestión duró un total de 650 horas. Obtuvieron un rendimiento de metano de 319.62 mLCH<sub>4</sub>/gSV y para la caracterización microbiana encontraron bacterias como *Proteobacteria*, y las metanógenos dominantes fueron *Methanosaeta*, *Methanobacterium*, *Methanolinea*, y *Methanomassiliicoccus*.

### **1.9.2 Avances**

En los últimos años, se han desarrollado proyectos de investigación en el equipo de trabajo de Ingeniería Ambiental, entre los cuales se encuentra el estudio realizado por González-Paz (2015) quien implementó el tratamiento anaerobio del efluente proveniente del proceso de una industria citrícola en un reactor híbrido y se evaluó la inhibición del D-Limoneno al proceso de digestión anaerobia. Se determinó que la concentración máxima tolerable del aceite esencial fue de 10 % ya que a partir de 15 % se inhibió el proceso de fermentación.

Luis-Garcez (2015) realizó la codigestión de los residuos sólidos de la industria citrícola en combinación con excretas de ganado bovino en un digestor anaerobio para analizar y evaluar la producción de biogás y las propiedades de la biomasa, operando el digestor en modo batch, se concluyó que los residuos sólidos cítricos presentan características que los hacen adecuados para su uso en la generación de

bioenergéticos, manteniendo cuidado en los parámetros de pH y la concentración del inóculo.

En el estudio realizado por Domínguez-Hernández (2016) se llevó a cabo el diseño e implementación de un Reactor de Lecho Semifluidizado Inverso (RLSFI) para dar tratamiento a un efluente citrícola y comparación con un Reactor de Lecho Fluidizado Tradicional, el cual sentó precedente de la comparativa de diferentes tipos de reactores y factores de operación de los mismos en la digestión anaerobia.

Rosas-Mendoza (2018) desarrolló y modeló los procesos de tratamiento de efluentes de la industria citrícola mediante un Reactor Anaerobio Híbrido, minimizando el efecto inhibitor del D-Limoneno. Efectivamente, se concluyó que con la implementación del RAH se minimiza los efectos de inhibición del D-limoneno en la digestión anaerobia de efluentes cítricos, sin necesidad de utilizar un pretratamiento para la eliminación del inhibidor, de igual manera se encontró que, operando el reactor con alta carga orgánica de 8 gDQO/Ld en modo continuo, se obtuvo una remoción de DQO entre el 75 y 85 % con mejoras sustanciales en tiempos de residencia hidráulica y rendimientos de metano ( $0.15 \text{ LCH}_4/\text{gDQO}_{\text{rem}}$ ) en condiciones estándar de temperatura y presión.

En el estudio llevado a cabo por Villaraldo-Falfán (2018) se realizó un balance del consumo y generación de energía a partir del proceso de digestión anaerobia de un lodo residual con y sin tratamiento de la industria citrícola. Mientras que, Reyes-Rosas (2019) se evaluó el grado de inhibición de la digestión anaerobia por la presencia de D-limoneno utilizando un efluente de la industria citrícola, se encontró que el D-limoneno actuó como inhibidor no competitivo mixto en el proceso de DA, uniéndose a la enzima y al complejo enzima-sustrato.

En el estudio realizado por Juárez-García (2022) se analizó la dinámica de poblaciones microbianas en reactores de biopelícula anaerobia para la producción de biogás. El sustrato utilizado fue la fracción líquida de RSO, y aumentando gradualmente la carga volumétrica aplicada, de este modo se encontró el equilibrio entre Bacterias y Arqueas

presentes en el inóculo. Se encontró que, en la etapa con Cva = se alcanzaron remociones superiores al 90 %, se produjeron alrededor de 20 L de biogás con rendimientos de metano de 0.33 LCH<sub>4</sub>/gDQO<sub>rem</sub>. En cuanto al dominio Arquea, fueron dominantes el género *Methanosaeta* y *Methanosarcinaceae*, y del dominio Bacteria fueron *Anaerolinea*. La vía principal de metabolismo se llevó a cabo mediante la vía acetótrofa.

# **CAPÍTULO 2**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

La descripción de la metodología que se llevó a cabo para el cumplimiento de los objetivos de la presente investigación se muestra en la Figura 2.1.

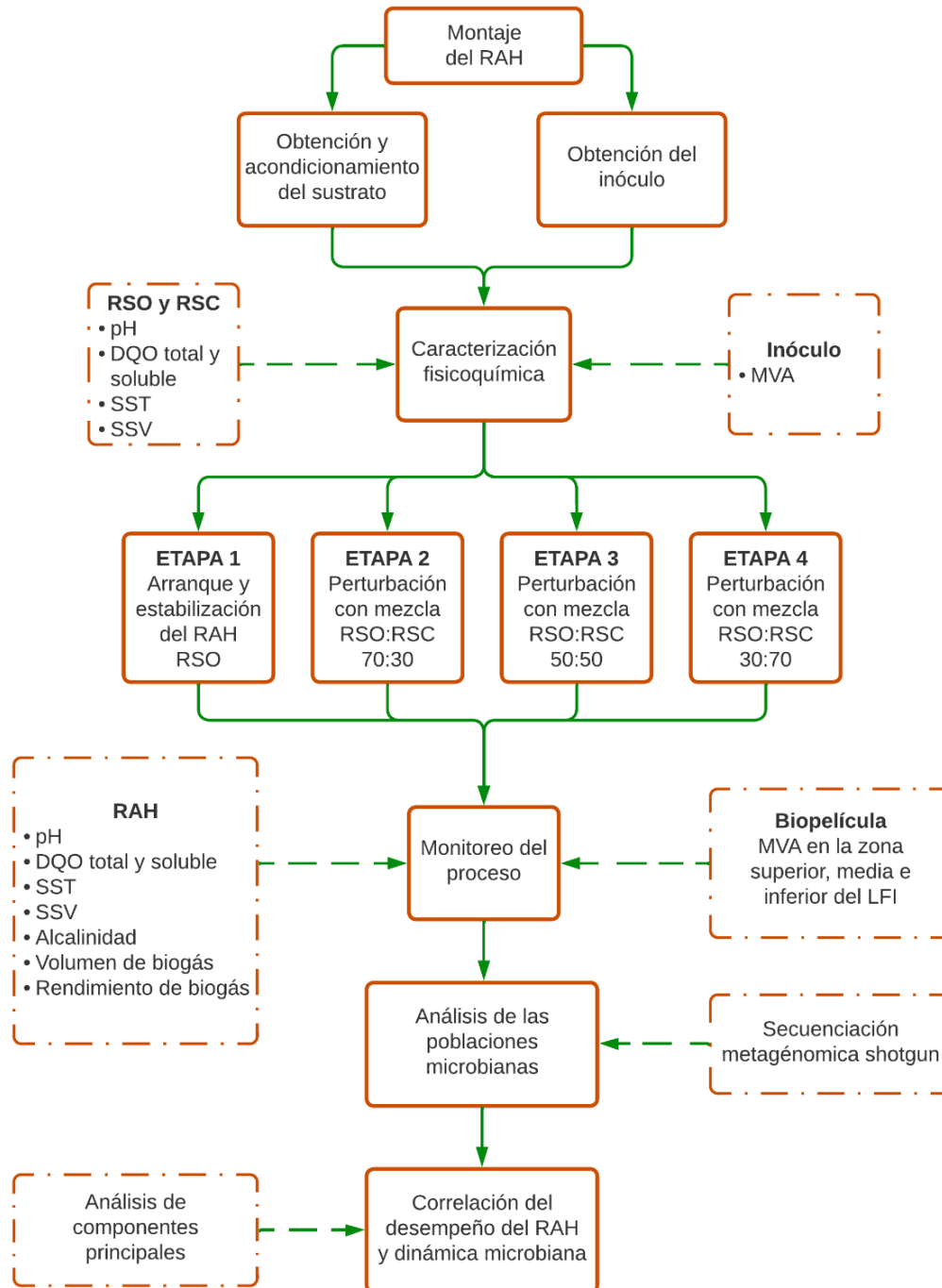


Figura 2.1 Metodología para la presente investigación

## 2.1 Montaje del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

Para el proceso de DA se utilizó un Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) diseñado con anterioridad y utilizado en las investigaciones previas de González-Paz (2015), Domínguez-Hernández (2016), Rosas-Mendoza (2018) y Juárez-García (2022). El RAH estuvo compuesto por dos secciones, como lo describen Rosas-Mendoza *et al.* (2018): un lecho fijo (LF) y un lecho fluidizado inverso (LFI). En la Figura 2.2 se observa un esquema del RAH y sus componentes.

### Sección 1: Lecho fijo

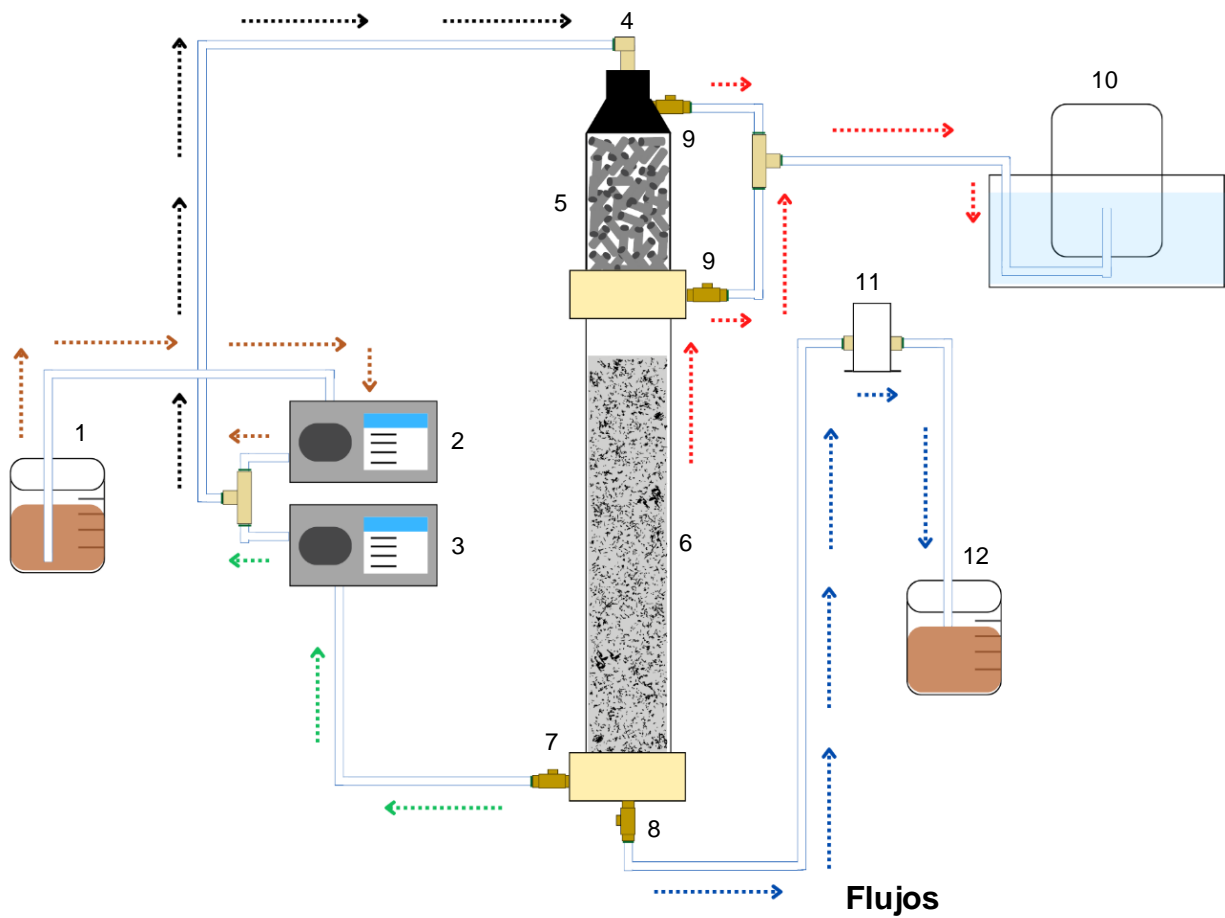
Conformado por un tubo de acrílico de 23 cm de longitud y 7.62 cm (3 in) de diámetro nominal. El medio de soporte que se utilizó en esta sección fueron anillos poliméricos de 2.5 × 0.5 cm en promedio, recubiertos por esmalte acrílico.

### Sección 2: Lecho fluidizado inverso

Conformado por un tubo de acrílico de 80 cm de longitud y 7.62 cm (3 in) de diámetro nominal. El medio de soporte utilizado fue arena sílica de nombre Extendsphere™ de 0.170 mm de diámetro, así como 20,000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> de área de superficie específica y 0.69 kg/m<sup>3</sup> de densidad.

Conectado a la parte superior del RAH, se instaló un sistema de desplazamiento gas-líquido para captar el biogás producido. Así mismo, se instaló un sistema de control de nivel para el LFI.

Se utilizó una bomba peristáltica marca Shenchen modelo V1 con cabezal YZ1515x Shenchen para la alimentación del RAH y una bomba peristáltica marca MasterFlex Economy Drive modelo 77200-60 con cabezal Easy-Load II para la recirculación. Se utilizaron válvulas, conectores y mangueras marca Neumaver.



### Componentes del reactor

1. Recipiente con sustrato (afluente)
2. Bomba peristáltica de alimentación
3. Bomba peristáltica de recirculación
4. Conector de alimentación
5. Lecho fijo
6. Lecho fluidizado inverso
7. Válvula de recirculación
8. Válvula de salida (efluente)
9. Válvulas de salida de biogás
10. Sistema de recolección de biogás
11. Sistema de control de nivel
12. Recipiente de salida (efluente)

- ⤴ Afluente
- ⤴ Recirculación
- ⤴ Flujo total
- ⤴ Efluente
- ⤴ Biogás

Figura 2.2 Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) y sus componentes



## 2.2 Obtención y acondicionamiento del sustrato

El sustrato utilizado en el proceso de digestión anaerobia de la presente investigación incluyó mezclas en diferentes proporciones de la fracción líquida de residuos sólidos orgánicos (RSO) y residuos sólidos cítricos (RSC). Los RSO están compuestos por frutas y verduras en general; mientras que los RSC están compuestos por naranja, limón y mandarina, en la Figura 2.3 se muestran los RSO y RSC recolectados.



Figura 2.3 Residuos sólidos recolectados en el mercado municipal Emiliano Zapata:

a) RSO, b) RSC

Los RSO y RSC fueron recolectados en el Mercado Municipal Emiliano Zapata, ubicado en la calle Oriente 9, colonia Emiliano Zapata, código postal 94320, en la ciudad de Orizaba, Veracruz. En el mercado, los residuos son generados en los locales comerciales, debido a ello la composición varía dependiendo de las especies de frutas y verduras que abundan en la temporada del año en la que se efectúe la recolección.

Posterior a la recolección, se realizó el método de cuarteo a la muestra como se describe en la Norma Mexicana NMX-AA-15-1985 (SEDUE, Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología, 1985) con el propósito de la homogenización y reducción de la misma.

### 2.2.1 Acondicionamiento del sustrato

Siguiendo la metodología descrita por Alvarado-Lassman *et al.* (2017), los RSO y RSC recolectados se acondicionaron por separado de la siguiente manera: en primer lugar, los residuos se cortaron para reducir su tamaño en pedazos de aproximadamente 2 a 5 cm de longitud.

Posteriormente, se procedió a la trituración en un equipo comercial de 1.5 L de capacidad, hasta crear una pasta semisólida en la que la fracción líquida fuera considerable.

Se realizó la separación de la fracción líquida mediante filtración, utilizando un filtro de algodón con porosidad de 0.2 mm aproximadamente. Dicha fracción líquida se filtró tres veces más para evitar que partículas sólidas de mayor tamaño sean ingresadas al reactor y prevenir posibles obstrucciones en las mangueras. En la Figura 2.4 se muestran los RSO y RSC reducidos en tamaño y la fracción líquida filtrada.



Figura 2.4 a) RSO y RSC reducidos de tamaño, b) fracciones líquidas de RSO y RSC

### 2.3 Obtención del inóculo

El inóculo inicial utilizado para la sección 2: LFI del RAH fue extraído del Reactor de Lecho Fluidizado Inverso (RLFI) ubicado en la Planta Piloto de Procesamiento y Aprovechamiento de Residuos Sólidos del Instituto Tecnológico de Orizaba, el cual es alimentado con la fracción líquida de RSO, utilizando como soporte arena sílica Extendsphere™, de esta manera, el soporte utilizado para el LFI se encontraba pre colonizado. Por otro lado, el soporte utilizado para el LF fueron anillos de material polimérico sin previa colonización.

### 2.4 Caracterización del sustrato e inóculo

Se caracterizaron los diferentes sustratos que fueron utilizados en las etapas de operación del RAH. En cada etapa se utilizó una mezcla con proporciones diferentes de la fracción líquida de RSO y RSC, las proporciones establecidas para cada una de las etapas se describen en la sección 2.4.2. Para cada una de las muestras, se evaluaron los parámetros que se enuncian en la Tabla 2.1. La descripción de la determinación analítica de cada parámetro se muestra en la sección 2.5.1.

Tabla 2.1 Parámetros evaluados al sustrato

Parámetro	Símbolo	Unidad	Método
<b>Sustrato</b>			
Potencial de hidrógeno	pH		Potenciométrico
Demanda química de oxígeno total	DQO <sub>T</sub>	gDQO/L	Colorimétrico
Demanda química de oxígeno soluble	DQO <sub>S</sub>	gDQO/L	Colorimétrico
Sólidos suspendidos totales	SST	g/L	Gravimétrico
Sólidos suspendidos volátiles	SSV	g/L	Gravimétrico
<b>Inóculo</b>			
Materia volátil adherida	MVA		Gravimétrico

En la Figura 2.5 se observan las determinaciones analíticas realizadas para la caracterización del sustrato y el inóculo.

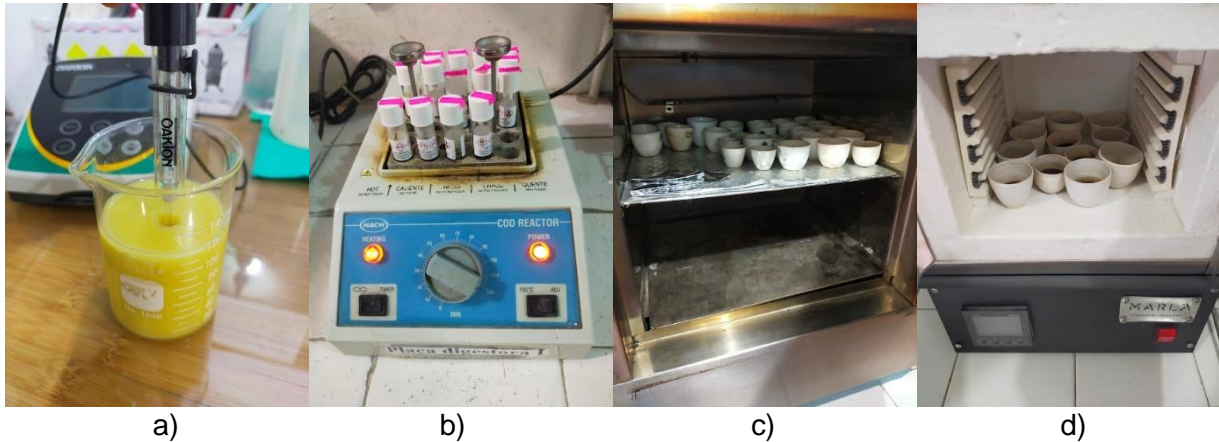


Figura 2.5 Determinaciones analíticas para la caracterización: a) pH, b) DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>, c) SST, d) SSV

## 2.5 Operación del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH)

El RAH se operó de manera continua durante las cuatro diferentes etapas. En las cuatro etapas se ajustó la Carga volumétrica aplicada (Cva) a 5 gDQO/Ld. La temperatura se estableció como constante en condiciones mesófilas. Se estableció una temperatura controlada de  $35 \pm 1$  °C.

### 2.5.1 Parámetros de control del RAH

Para el control del RAH, similar a las investigaciones previas de Juárez-García (2022) y Rosas-Mendoza (2018), se establecieron los parámetros:

- Flujo o caudal de alimentación (Q):

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

Donde:

$Q$  – Flujo o caudal de alimentación [L/d]

$Cva$  – Carga volumétrica aplicada [gDQO/Ld]

$V_u$  – Volumen útil del RAH [L]

$DQO_E$  – DQO de alimentación [gDQO/L]

- Tiempo de residencia hidráulica (TRH):

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

Donde:

$TRH$  – Tiempo de residencia hidráulica [h]

$V_u$  – Volumen útil del RAH [L]

$Q$  – Flujo o caudal de alimentación [L/d]

24 – Factor de conversión

- Relación sustrato/biomasa ( $S_0/X_0$ ):

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

Donde:

$S_0/X_0$  – Relación sustrato/biomasa

$DQO_E$  – DQO de alimentación [gDQO/L]

$Q$  – Flujo o caudal de alimentación [L/d]

$MVA$  – Materia volátil adherida [gSV/L]

$V_s$  – Volumen de soporte colonizado [L]

### 2.5.2 Etapas de operación del RAH

Se operó el RAH en cuatro diferentes etapas, hasta alcanzar la estabilización:

- Etapa 1, Arranque y estabilización del RAH

En esta etapa se arrancó el RAH, utilizando como sustrato la fracción líquida de RSO, la cual incluyó frutas y verduras. Se utilizó la fracción líquida de RSO ya que, de acuerdo con Rosas-Mendoza (2018), es una buena fuente de carbono y también se encuentra enriquecida con macro y micronutrientes. Se operó el RAH en esta etapa hasta la estabilización, es decir, hasta que se alcanzaron remociones de DQO del 85 – 90 % y valores de alcalinidad  $\alpha$  inferiores a 0.3, de acuerdo a lo establecido por Ripley *et al.* (1986).

- Etapa 2, Perturbación 1 con mezcla RSO:RSC

Una vez que se alcanzó la estabilización en la Etapa 1, se procedió a perturbar el sistema por primera vez. En esta etapa se utilizó como sustrato una mezcla (% v/v) de fracción líquida de RSO:RSC al 70:30.

- Etapa 3, Perturbación 2 con mezcla RSO:RSC

Para la segunda perturbación del sistema, se utilizó como sustrato una mezcla (% v/v) de fracción líquida de RSO:RSC al 50:50.

- Etapa 4, Perturbación 3 con mezcla RSO:RSC

Finalmente, en la tercera perturbación del sistema, el sustrato utilizado fue una mezcla (% v/v) de fracción líquida de RSO:RSC al 30:70.

Durante las cuatro etapas, se reguló el pH del sustrato a valores de  $7 \pm 0.2$  con bicarbonato de sodio comercial ( $\text{NaHCO}_3$ ), esto debido a experiencias anteriores en las que no fue posible ajustar el pH con una solución de NaOH.

## 2.6 Monitoreo del proceso de digestión anaerobia

Durante las cuatro etapas de operación del RAH, se tomaron muestras del efluente e influente y del biogás producido durante el proceso de DA. Así mismo, se tomaron muestras de la biopelícula en los LF y LFI, en la zona de arriba, en medio y debajo.

### 2.6.1 Determinaciones analíticas

- Potencial de hidrógeno (pH)

El valor de pH se midió en las muestras del efluente y afluente de manera directa con un potenciómetro marca OAKTON pH 700 modelo AO-35419-03 con una resolución de lectura de 0.01 unidades y una exactitud en la lectura de  $\pm 0.01$ .

- Demanda química de oxígeno total y soluble (DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>)

La determinación de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> se llevó a cabo al efluente y afluente del RAH mediante el método estándar 5220 D descrito por la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, por sus siglas en inglés) (2017), el cual es el método colorimétrico. Se procedió a la preparación de las muestras en tubos con tapa rosca, utilizando una dilución del efluente y afluente, y una solución digestora que contiene dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), así como sulfato mercúrico ( $HgSO_4$ ) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ). En el caso de la DQO<sub>S</sub>, 10 mL de muestra del efluente y afluente se centrifugaron en una centrifuga marca HERMLE modelo Z 383 a 3500 rpm durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante para preparar la muestra en tubos con tapa rosca.

Posteriormente, la digestión de las muestras de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> se realizó en una placa digestora marca HACH modelo 45600 a una temperatura de 150 °C durante 2 horas. Y para finalizar, se utilizó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR-2500 a una longitud de onda de 620 nm para obtener los valores de absorbancia de cada una de las muestras, la curva de calibración se presentó guardada en el equipo.

Con los valores obtenidos, fue posible calcular el porcentaje de DQO removida ( $DQO_{rem}$ ), tanto para la  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , la mediante la ecuación 2.4.

$$\% DQO_{rem} = \frac{DQO_E - DQO_S}{DQO_E} (100) \quad (2.4)$$

Donde:

$\% DQO_{rem}$  – Porcentaje de DQO removida [%]

$DQO_E$  – DQO de alimentación [gDQO/L]

$DQO_S$  – DQO soluble [gDQO/L]

100 – Factor de conversión

- Sólidos suspendidos totales (SST)

La determinación de SST se llevó a cabo en el efluente y afluente del RAH por medio del método estándar 2540 D (APHA, 2017). Este método es gravimétrico y consistió en evaporar 5 mL de la muestra en un crisol, previamente puesto a peso constante, en una estufa marca Riossa modelo H-33 a una temperatura de entre 103 y 105 °C a lo largo de 24 horas. Al enfriarse, se pesó el crisol con la muestra seca en una balanza analítica marca OHAUS Adventurer modelo AR2140 Para finalizar, se utilizó la ecuación 2.5 para calcular el valor de sólidos suspendidos totales.

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

Donde:

$SST$  – Sólidos suspendidos totales [g/L]

$P_1$  – Peso del crisol puesto a peso constante [g]

$P_3$  – Peso del crisol puesto a peso constante más el peso de la muestra seca [g]

$V$  – Volumen de la muestra [mL]



- Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Al efluente y afluente del RAH se les realizó la determinación de SSV medio del método estándar 2540 E (APHA, 2017), el cual es un método gravimétrico. Posterior a la determinación de SST, se introdujo el crisol con muestra (5 mL) a una mufla marca Barnstead Themolyne modelo Furnace 1300 a una temperatura de  $550 \pm 50$  °C durante 2 horas. Se colocó en un desecador y una vez se enfrió, se pesó en una balanza analítica marca OHAUS Adventurer modelo AR2140. Se utilizó la ecuación 2.6 para calcular el valor de sólidos suspendidos volátiles.

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

Donde:

$SSV$  – Sólidos suspendidos volátiles [g/L]

$P_3$  – Peso del crisol puesto a peso constante más el peso de la muestra seca [g]

$P_4$  – Peso del crisol puesto a peso constante más el peso de la muestra calcinada [g]

$V$  – Volumen de la muestra [mL]

- Alcalinidad ( $\alpha$ )

Para determinar la alcalinidad de las muestras de efluente y afluente del RAH, se utilizó una variación del método volumétrico establecido por Ripley *et al.* (1986). En un vaso de precipitado, se colocaron 10 mL de muestra y la medición de pH se efectuó con un potenciómetro marca OAKTON pH 700 modelo AO-35419-03. A continuación, se adicionó ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0.02N hasta alcanzar un pH de 5.75 y posteriormente hasta alcanzar un pH de 4.30. Para calcular la relación de alcalinidad se utilizó la ecuación 2.7.

$$\alpha = \frac{V_2 - V_1}{V_2} \quad (2.7)$$

Donde:

$\alpha$  – Relación de alcalinidad

$V_1$  – Volumen de ácido sulfúrico 0.02N gastado para alcanzar un pH de 5.75 [mL]

$V_2$  – Volumen de ácido sulfúrico 0.02N gastado para alcanzar un pH de 4.30 [mL]

- Volumen de biogás

El volumen de biogás producido durante la DA se cuantificó haciendo uso de un dispositivo de desplazamiento gas-líquido graduado.

### **2.6.2 Análisis de la biopelícula**

- Materia volátil adherida (MVA)

Se determinó la MVA tanto al LF como al LFI, haciendo uso del método gravimétrico de sólidos volátiles. La toma de muestras se efectuó en tres puntos de los LF y LFI: en la zona superior, en el medio e inferior. Se colocó 1 mL de muestra en charolas metálicas previamente puestas a peso constante. Se introdujeron a una estufa marca Riossa modelo H-33 a una temperatura de entre 103 y 105 °C a lo largo de 24 horas y posteriormente se introdujeron a una mufla marca Barnstead/Themolyne modelo Furnace 1300 a una temperatura de 550 ± 50 °C durante 2 horas. La muestra se pesó en una balanza analítica marca OHAUS Adventurer modelo AR2140. Se calculó la MVA con la diferencia de pesos, lo cual representa la biomasa denotada en [g/L]. De igual manera, se tomaron evidencias fotográficas de la biopelícula de los LF y LFI al inicio de la Etapa 1 y posteriormente al finalizar cada una de las Etapas de operación del RAH.

### **2.7 Análisis de la composición del inóculo anaerobio**

La caracterización de las poblaciones microbianas presentes en cada una de las etapas de operación del RAH se llevó a cabo mediante secuenciación metagenómica shotgun con el propósito de distinguir entre Arquea y Bacteria mediante el análisis del

ADN genómico (ADNg). A continuación, se presenta el método empleado, similar al empleado por Juárez-García (2022) en su investigación.

### 2.7.1 Muestreo

La toma de muestras se realizó al LF, LFI y también la biomasa suspendida. Se llevó a cabo al inicio de la Etapa 1, así como al finalizar cada una de las Etapas de operación del RAH. En el LF se raspó con una espátula estéril, mientras que en el LFI se tomaron muestras de soporte Extendsphere™ colonizado de las tres zonas establecidas (superior, en el medio e inferior). Posteriormente, las muestras se colocaron en un tubo falcon de 50 mL esterilizado. El volumen de muestra que se tomó para cada determinación se observa en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Volumen de muestra para análisis de dinámica microbiana

Determinación	Volumen (mL)
Dinámica microbiana en biopelícula adherida al LF	10
Dinámica microbiana en biopelícula adherida al soporte en el LFI	10
Dinámica microbiana en biomasa suspendida	20

Las muestras para determinación de dinámica microbiana se refrigeraron a  $4 \pm 1$  °C, posterior a ello, se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI) de la Universidad de Guadalajara. Con base en experiencias previas, se decidió analizar mediante secuenciación metagenómica shotgun las muestras del LF y las muestras de la zona media del LFI del final de las cuatro Etapas de operación.

### 2.7.2 Conservación de las muestras de biomasa

La metodología empleada para este propósito tuvo como base los trabajos de Godon *et al.* (1997) para muestras de biomasa suspendida en líquidos, es decir, las muestras

de la biopelícula adherida al LF; mientras que para muestras de biomasa fija a soportes fluidizados, es decir, las muestras de Extendsphere™ tomadas del LFI se siguió la metodología propuesta por Cresson *et al.* (2009).

A las muestras de la biopelícula adherida al LF se le añadieron 10 mL de PBS para posteriormente centrifugarlas a una velocidad de 6,500 rpm durante 12 minutos a una temperatura de 4 °C, utilizando una centrífuga Eppendorf 5810R. Se removió cuidadosamente el sobrenadante para evitar resuspender los botones celulares y, posteriormente, éstos últimos se retiraron del tubo con una espátula esterilizada y se colocaron en un mortero con pistilo esterilizados y congelados a -20 °C. Se añadieron 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl 0.1M con pH 8 y se procedió a macerar la muestra con el pistilo esterilizado hasta la homogenización y lograr fluidez, también se añadieron 0.6 mL de solución de N-Lauroyl sarcosina al 10 %. De la pasta macerada, se tomaron 7 alícuotas de 0.5 mL y se colocaron en microtubos de 2 mL con tapa rosca y anillo de goma Bead Bug previamente esterilizados y etiquetados como se muestra en la Tabla 2.3. Para finalizar, las muestras en los microtubos se conservaron a -20 °C.

Tabla 2.3 Clasificación y etiquetado de las muestras de biomasa conservadas

<b>Etap</b>	<b>Muestra</b>	<b>Clave</b>
<b>1</b> RSO 100:0	Biopelícula adherida al LF	D5
	Biopelícula adherida al LFI, zona media	D13
<b>2</b> RSO:RSC 70:30	Biopelícula adherida al LF	D6
	Biopelícula adherida al LFI, zona media	D14
<b>3</b> RSO:RSC 50:50	Biopelícula adherida al LF	D7
	Biopelícula adherida al LFI, zona media	C15
<b>4</b> RSO:RSC 30:70	Biopelícula adherida al LF	D8
	Biopelícula adherida al LFI, zona media	C16

Por otra parte, para las muestras de Extendsphere™ tomadas del LFI, se añadieron 30 mL de PBS 1X en tubos esterilizados y 6 mL de muestra líquida con los soportes colonizados por la biomasa, se realizó un lavado de los soportes agitando suavemente los tubos. Se removió la totalidad de PBS 1X, evitando colectar el líquido donde se encontraron los soportes colonizados, y se procedió a realizar un segundo lavado con 30 mL de PBS 1X. Al terminar los lavados pertinentes, se virtió el líquido que contiene a los soportes colonizados en un mortero con pistilo esterilizados y congelados a -20 °C. Se añadieron 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl 0.1M con pH 8 y maceró la muestra con el pistilo esterilizado para desprender la biomasa de los soportes colonizados, cuando se observó suficiente biomasa desprendida en la suspensión y con fluidez, se añadieron 0.9 mL de solución de N-Lauroyl sarcosina al 10 %. De la suspensión, se tomaron 7 alícuotas de 0.5 mL y se colocaron en microtubos de 2 mL con tapa rosca y anillo de goma Bead Bug previamente esterilizados y etiquetados como se muestra en la Tabla 2.3. Para finalizar, las muestras en los microtubos se conservaron a -20 °C.

Es de resaltarse que todo el material que se utilizó fue previamente esterilizado y se tomaron medidas de seguridad personal. En la Figura 2.6 se presentan las 7 alícuotas de cada muestra en sus respectivos microtubos, listos para su conservación.



Figura 2.6 Alícuotas de las muestras listas para su conservación

### 2.7.3 Extracción del ADN

A la muestra encontrada en los microtubos previamente congelada, se le agregaron 0.5 mL de solución de Lauril-sarcosina al 5 % (disuelto en buffer de fosfatos con pH 8, 0.1M). Se colocó la muestra en un baño María Precisión a 70 °C a lo largo de 1 hora, se agitó para mezclar la muestra y la solución de Lauril-sarcosina al 5 %. Se colocó en hielo triturado y allí se añadieron 0.5 mL de perlas de zirconio esterilizadas y se colocó el microtubo en el triturador vibratorio marca Bead Bug modelo D1030 a 300 rpm, un valor de 400 para la velocidad y un valor de 60 para el tiempo. Nuevamente, la muestra se llevó a hielo y se agregaron 15 mg de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) y se agitó en un vórtex Genie 2 a velocidad máxima durante 5 segundos, con ello se fijaron los ácidos húmicos que son inhibidores de la ADN polimerasa, dicha muestra se centrifugó a 12,000 rpm en una centrífuga MiniSpin plus (Eppendorf) a lo largo de 3 minutos y se recuperaron 0.4 mL del sobrenadante a otro microtubo de 2 mL esterilizado y frío. Se añadieron 0.5 mL de TENP al sedimento del microtubo y se agitó durante 5 a 15 segundos para recuperar el ADN que se encuentra en el sedimento. Se centrifugó y recuperó el sobrenadante un total de tres veces, al final se tuvieron 1.2 mL de sobrenadante en el microtubo, el cual se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos para eliminar partículas suspendidas.



Figura 2.7 Precipitación del ADN

Con la muestra en hielo, se repartió el sobrenadante en 2 microtubos de 2 mL y a cada uno se les añadieron 0.7 mL de isopropanol, se agitó suavemente durante 3 minutos hasta que se observaron fibras o cambio de densidad del líquido, dicho fenómeno es la precipitación del ADN, como se muestra en la Figura 2.7. Se dejaron reposar las muestras por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 14,500 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservó el botón formado al fondo que contiene el ADN en ambos microtubos. Se utilizó 0.2 mL de agua para PCR para resuspender el sedimento en un tubo y se llevó al otro tubo. Se añadieron 0.01 mL de RNAsa a 2.5 mg/mL y se agitó durante 1 a 3 segundos. Se llevó el microtubo a un baño seco a 37 °C durante 30 minutos. Para finalizar, se colocó en hielo.

#### **2.7.4 Eliminación de impurezas del ADN**

En esta etapa se utilizó un Kit QIAamp®. Se añadieron 0.2 mL de Buffer AL al microtubo y se agitó en un vórtex por 1 a 3 segundos y se incubó en un baño María a 70 °C por 10 minutos. Con la muestra en hielo, se añadieron 0.2 mL de etanol de entre 96 y 100 % de pureza y se agitó. Dicha mezcla se añadió a la micro-columna QIAamp incluida en el Kit, misma que se encontró en un microtubo, se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos en una centrífuga MiniSpin plus (Eppendorf), al finalizar se cambió de microtubo. Se repitió el procedimiento con 0.5 mL de Buffer AW1 una segunda vez y con 0.5 mL de Buffer AW2 una tercera vez. Se añadieron 0.05 mL de Buffer AE, se llevó a incubación a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 8,000 rpm por 3 minutos. Se recuperaron un aproximado de 0.04 mL de filtrado, en donde se encuentra el ADN extraído, y se llevaron a congelación a -20 °C, como se muestra en la Figura 2.8.

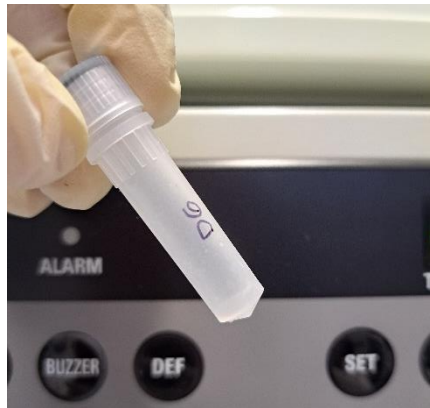


Figura 2.8 Muestra de ADN extraído

### 2.7.5 Visualización de la integridad del ADN

Se tomaron 0.004 mL de la muestra de ADN extraído y se mezclaron con una cantidad equivalente de solución de deposición bluejuice, posteriormente, cada mezcla se depositó en las celdas de un gel de agarosa al 0.7 %, el cual se colocó en la cámara electroforética para iniciar la electroforesis de las muestras junto con un marcador de talla o peso molecular llamado Fago lambda/Hind III a 60 V, 400 A, durante 50 minutos, como se observa en la Figura 2.9. Se utilizó un fotodocumentador Bio-RAD modelo Gel Doc™ EZ Imager para la visualización de la talla y distribución del ADN extraído. Las imágenes fueron obtenidas mediante la instalación del software ImageLab en un equipo de cómputo.

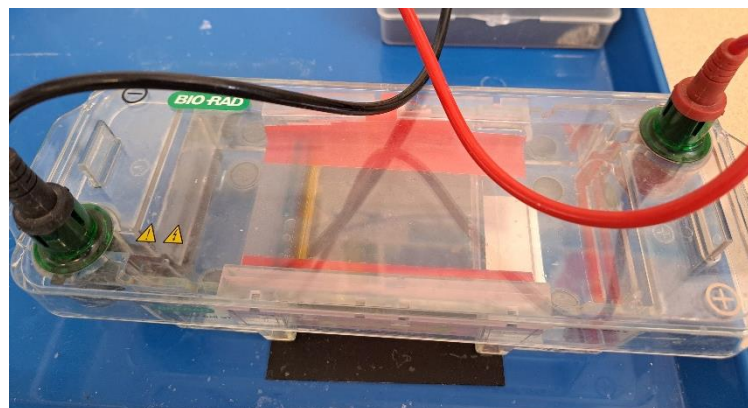


Figura 2.9 Electroforesis de las muestras de ADN extraído



### 2.7.6 Medición de pureza y concentración del ADN

Se cuantificó la concentración y pureza del ADN extraído por medio de la absorbancia. Se tomaron 0.002 mL de la muestra de ADN extraído y se colocaron en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Nanodrop 2000, a una longitud de onda de 260 nm. En la Figura 2.10 se muestra el espectrofotómetro utilizado. Los resultados fueron visualizados en un equipo de cómputo.



Figura 2.10 Medición de concentración y pureza del ADN extraído

### 2.7.7 Secuenciación metagenómica shotgun del ADN

La caracterización de la composición de las poblaciones microbianas de la biopelícula en el LF y el LFI se llevó a cabo mediante secuenciación metagenómica shotgun de baja profundidad. Las muestras de ADN extraídas y purificadas se enviaron al Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Genómica Microbiana del Centro de Investigación en la Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) para llevar a cabo el procedimiento.

Posteriormente, se realizó un análisis bioinformático de las muestras para la clasificación en taxones. Se realizaron los procesos bioinformáticos básicos: limpieza de secuencias con pair-end\_cleaner v1.1.0, eliminación de secuencias quiméricas con chimera\_detector v1.5.1 y la clasificación de las secuencias en taxones con mg\_classifier v1.8.5.

Se reportó la composición de las poblaciones microbianas en porcentaje de abundancia relativa para las poblaciones procariotas dominantes. Con ello, se interpretó la dinámica de las poblaciones microbianas presentes en el proceso de DA para la generación de biogás con sustratos complejos en un RAH.

### **2.7.8 Correlaciones del desempeño del RAH y la dinámica microbiana**

Para correlacionar el desempeño del reactor durante las cuatro etapas de operación y la dinámica poblacional, se llevó a cabo una descripción por métodos multivariados utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI (Statpoint Technologies Inc.), el cual es un software de análisis estadístico, visualización de datos y análisis predictivo. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), el cual explica el mayor porcentaje de la variación entre las variables consideradas, el ACP puede ser utilizado para reducir el tamaño del problema y apoyar en la comprensión de los factores que afectan el proceso analizado, es por ese motivo que es una herramienta comúnmente utilizada en el área de procesos biológicos. Se seleccionaron los parámetros operativos y fisicoquímicos de mayor relevancia en el desempeño del RAH durante el proceso de DA, así como las poblaciones microbianas relevantes y con dinámica durante las cuatro etapas de operación del RAH. Solamente fueron considerados para el análisis total de la variación los componentes principales que tuvieran un eigenvalor mínimo de 1.

# **CAPÍTULO 3**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Se construyó y montó el RAH tomando como base lo reportado en las investigaciones previas de Domínguez-Hernández (2016), González-Paz (2015), Juárez-García (2022) y Rosas-Mendoza (2018). La sección 1 del RAH, la cual corresponde al LF, se construyó con un tubo de acrílico, las dimensiones del mismo se enuncian en la Tabla 3.1. Dicha sección contuvo 280 anillos de material polimérico recubiertos por esmalte acrílico de 2.5 cm de longitud promedio y 0.5 cm de diámetro, los cuales funcionaron como el medio de soporte fijo en el cual se formó la biopelícula de microorganismos. En la Figura 3.1 a) se observa la sección 1: LF al momento del montaje del RAH, previo a la colonización del soporte.

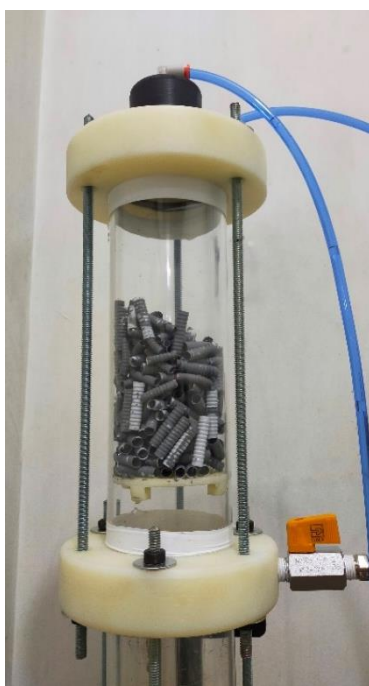
Tabla 3.1 Dimensiones de la sección 1: LF del RAH

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

La sección 2 del RAH, correspondiente al LFI, también se construyó con tubo de acrílico y sus dimensiones se enuncian en la Tabla 3.2. Se encontró como medio de soporte fluidizado inverso arena sílica Extendsphere™ de 0.17 mm de diámetro, la cual se encontraba pre colonizada al momento del montaje del RAH. En esta sección fue imprescindible disponer espacio para el flujo de biogás producido durante el proceso de DA, por lo que se estableció una cámara de biogás del 20 % del volumen total, a su vez, el lecho representó el 30 % y el volumen útil el 50 %, como se puede observar en la Figura 3.2 b).

Tabla 3.2 Dimensiones de la sección 2: LFI del RAH

Dimensión	Valor	Unidad
Longitud	80	cm
Diámetro	7.62	cm
Longitud del lecho	24	cm
Volumen total	3.65	L
Volumen del soporte colonizado	1.10	L
Volumen útil	1.82	L
Volumen de la cámara de biogás	0.73	L



a)



b)

Figura 3.1 Secciones del RAH: a) LF, b) LFI

### 3.2 Caracterización del sustrato

Se obtuvo la fracción líquida de los RSO y RSC posterior a la recolección de los residuos en el Mercado Emiliano Zapata de la ciudad de Orizaba, Veracruz y su

acondicionamiento. Los RSO estuvieron compuestos por frutas y verduras en general, la composición de estos residuos depende de las especies vegetales de temporada durante la recolección, siendo la lechuga, col, tomate, piña, papaya, hojas de coliflor, pimientos, melón, sandía, pepino, manzana, cilantro, chayote, zanahoria, cebolla, rábano, mango, acelgas, papa, brócoli, plátano, perejil y aguacate las especies más abundantes en los RSO del Mercado Emiliano Zapata (Alvarado-Lassman *et al.*, 2017). Por otro lado, los RSC estuvieron compuestos por naranja, limón, toronja y mandarina en el mismo orden de abundancia, coincidiendo con lo datos de la USDA (2022). En la Figura 3.2 se muestran los sustratos para cada una de las etapas de operación del RAH, dichos sustratos se obtuvieron de las mezclas de las fracciones líquidas de RSO:RSC a diferentes proporciones (% v/v).



a)                      b)                      c)                      d)                      e)

Figura 3.2 Mezclas de las fracciones líquidas RSO:RSC: a) 100:0, b) 70:30, c) 50:50, d) 30:70, e) 0:100

Cada uno de los sustratos, así como las fracciones líquidas puras de RSO y RSC fueron caracterizados y los valores obtenidos se enuncian en la Tabla 3.3, junto con una comparación con previas investigaciones.

Tabla 3.3 Caracterización de los sustratos y comparación con previas investigaciones (media aritmética  $\pm$  desviación estándar)

	Presente investigación (2022)					Rosas-Mendoza (2018)		Juárez-García (2022)
	RSO	RSC	70:30	50:50	30:70	RSO	RSC	RSO
<b>pH</b>	4.61 $\pm 0.02$	3.86	4.32 $\pm 0.01$	4.17 $\pm 0.01$	4.03 $\pm 0.01$	6.78 $\pm 0.21$	3.88 $\pm 0.10$	5.00 $\pm 0.20$
<b>DQO<sub>T</sub></b> (gDQO/L)	36.35	67.20	46.00	50.80	56.60	14.79 $\pm 2.03$	38.78 $\pm 2.50$	39.57 $\pm 0.98$
<b>DQO<sub>s</sub></b> (gDQO/L)	34.35	58.55	43.80	49.40	55.15	12.50 $\pm 1.79$	35.42 $\pm 1.29$	35.48 $\pm 0.49$
<b>SST</b> (g/L)	25.58 $\pm 0.16$	41.09 $\pm 2.42$	29.40 $\pm 0.34$	33.45 $\pm 0.71$	36.59 $\pm 0.65$	6.39 $\pm 0.88$	21.66 $\pm 0.11$	10.60 $\pm 0.73$
<b>SSV</b> (g/L)	21.97 $\pm 0.15$	38.41 $\pm 2.22$	26.15 $\pm 0.43$	30.22 $\pm 0.73$	33.50 $\pm 0.46$	4.10 $\pm 0.84$	19.23 $\pm 0.36$	9.48 $\pm 0.69$

A partir de los valores enunciados en la Tabla 3.3, se tiene que el valor de pH obtenido para la fracción líquida pura de los RSC fue menor que para la fracción líquida pura de RSO, esto debido a que en las especies cítricas se tiene la presencia de ácidos orgánicos, tales como ácido oxálico, cítrico, ascórbico, succínico, acético y málico (Viuda-Martos *et al.*, 2010). Los resultados de pH de RSC fueron similares a lo reportado por Anjum *et al.* (2017), Martín *et al.* (2010), Navarro *et al.* (2013) y Ruiz y Flotats (2014). Mientras que, los resultados de pH de RSO coincidieron con lo reportado por Alvarado-Lassman *et al.* (2017). Se observó que el pH disminuyó a medida que la concentración de RSC (% v/v) en los sustratos fue mayor.

Por otro lado, los resultados de la determinación de DQO indican que la fracción líquida pura de los RSC contienen una alta concentración de materia orgánica (Ruiz y Flotats, 2014) y fue evidente una tendencia creciente de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>s</sub> mientras mayor era la concentración (% v/v) de RSC en los sustratos. Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron similares a lo reportado por Anjum *et al.* (2017) en la

caracterización de residuos de naranja, mientras que, los resultados obtenidos de la fracción líquida de RSO son similares a lo reportado por Alvarado-Lassman *et al.* (2017). La  $DQO_S$  representó el 94 y el 87 % de la  $DQO_T$  en la fracción líquida pura de RSO y RSC respectivamente.

Algo similar ocurre con los valores obtenidos en la determinación de sólidos suspendidos, pues se observó que mientras mayor concentración (% v/v) de RSC en los sustratos, aumentaron los valores de SST y SSV. Dichos valores fueron similares a lo reportado por Navarro *et al.* (2013), Serrano *et al.* (2014) para los RSC; mientras que, para los RSO los valores reportados por Alvarado-Lassman *et al.* (2017) coincidieron. Se encontró que los SSV representaron el 86 y el 93 % de los SST en la fracción líquida de RSO y RSC, respectivamente.

### 3.3 Caracterización del inóculo

Para la sección 1, correspondiente al LF, se utilizaron como medio de soporte anillos poliméricos sin colonizar al arranque de la operación del RAH. Sin embargo, para la sección 2, correspondiente al LFI, se utilizó como medio de soporte Extendsphere™ pre colonizado. Se realizó la caracterización de la biopelícula adherida al Extendsphere™ mediante la determinación de MVA, para ello se tomaron muestras de la zona superior, media e inferior del LFI. Con los valores de MVA se calculó el porcentaje de colonización, a partir de lo reportado por Buffiére *et al.* (2000) como valor máximo de colonización: 0.21 gBiomasa/gSoporte. En la Tabla 3.4 se muestran los valores obtenidos en la caracterización, de acuerdo con esto, se encontró que la zona inferior del LFI es la que contó con mayor porcentaje de colonización, esto se puede asociar con la densidad de las partículas y el nulo flujo de líquido: las partículas de soporte con mayor cantidad de MVA se desplazan a la zona inferior por ser más densas.



Tabla 3.4 Caracterización del soporte pre colonizado

Zona	Soporte (g)	Biomasa (g)	Biomasa:Soporte (g/g)	MVA (g/L)	Colonización (%)
Superior	1.0457	0.0628	0.0601	20.93	29
Media	1.1030	0.0703	0.0637	23.43	30
Inferior	0.9555	0.0827	0.0866	27.57	41

### 3.4 Monitoreo del desempeño del RAH en modo continuo

La operación en modo continuo del RAH tuvo una duración de 145 días, divididos en cuatro etapas, como se muestra en la Tabla 3.5. La operación en modo continuo del RAH se llevó a cabo bajo condiciones mesófilas, es decir, a  $35 \pm 2$  °C en un cuarto de temperatura controlada y ajustando la Cva del afluente a un valor de 5 gDQO/Ld durante las cuatro etapas. Se llevó a cabo un monitoreo del pH en el afluente, efluente y al interior del RAH, el factor  $\alpha$  de alcalinidad, la remoción de DQO, así como la remoción de SST y SSV, la producción y el rendimiento de biogás y la relación sustrato/biomasa.

Tabla 3.5 Etapas de operación del RAH

Etapa	Nombre de la etapa	Proporción del sustrato (RSO:RSC)	Días de operación	Duración (d)
1	Arranque y estabilización	100:0	1 – 73	73
2	Perturbación 1	70:30	74 – 113	40
3	Perturbación 2	50:50	114 – 133	20
4	Perturbación 3	30:70	134 – 145	12

#### 3.4.1 pH en el RAH

El pH del afluente fue ajustado con bicarbonato de sodio a valores entre 6.8 y 7.2, y se mantuvo en un valor promedio de  $7.02 \pm 0.05$  durante las cuatro etapas de

operación del RAH. En la Figura 3.3 se muestra el monitoreo de los valores de pH durante la operación del RAH.

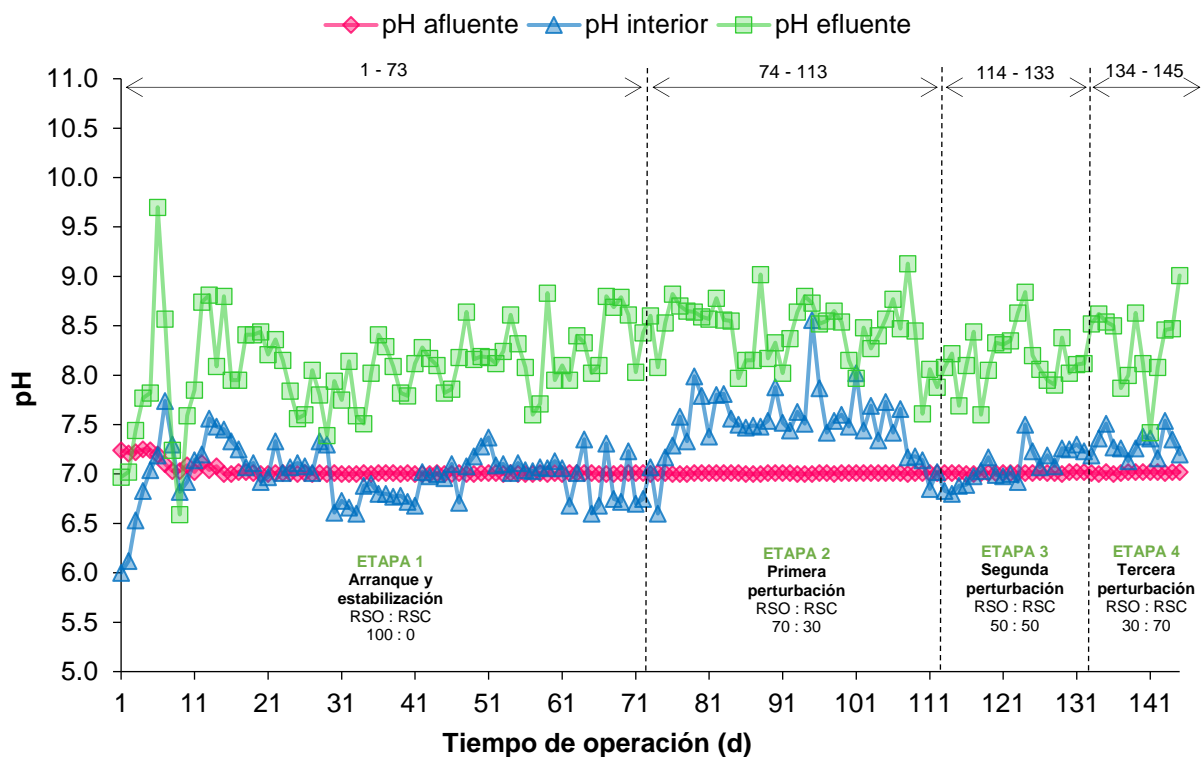


Figura 3.3 Valores de pH del afluente, efluente y al interior del RAH

Al arranque de la operación, el pH al interior del RAH fue de 6.00, el cual no era óptimo para la producción de metano ya que, de acuerdo con Zamri *et al.* (2021), el pH óptimo para la etapa de metanogénesis se encuentra en el rango de 6.5 a 8.2. Sin embargo, el pH al interior fue en aumento y a partir del día 4 de operación se encontró dentro del rango óptimo, manteniéndose entre 6.60 y 7.74 durante la Etapa 1 utilizando como sustrato la fracción líquida de los RSO. En condiciones similares de temperatura, Cva y sustrato, Juárez-García *et al.* (2022) reportaron un pH de 8.31, mientras que Alvarado-Lassman *et al.* (2017) reportaron que los valores de pH se mantuvieron por debajo de 8.

En la Etapa 2 se realizó la primera perturbación del proceso de DA al introducir la fracción líquida de RSC, en esta etapa se utilizó como sustrato una mezcla % v/v de

las fracciones líquidas de RSO y RSC al 70:30. Al inicio de esta etapa se presentó un aumento considerable en el pH al interior del RAH, pues se observaron valores entre 7.17 y 7.99, a pesar del aumento, el pH se mantuvo en el rango óptimo para la metanogénesis, a excepción de un valor aislado de 8.56 en el día 95 de operación. Sin embargo, a partir del día 108 de operación y hasta el final de esta etapa, se observó nuevamente el descenso del pH al interior del RAH a valores entre 6.83 y 7.17, los cuales son semejantes a los observados durante la Etapa 1. De acuerdo con Parra-Orobio *et al.* (2015), el aumento de los valores de pH se le puede atribuir a la buena capacidad buffer del inóculo, es decir, una buena neutralización de la acidez que es provocada por la transformación de la materia orgánica en AGVs.

Durante las Etapas 3 y 4, en las cuales se realizaron la segunda y tercera perturbación, respectivamente, no se observaron alteraciones considerables del pH al interior del RAH. El pH durante la Etapa 3 se encontró estable con valores entre 6.80 y 7.17, mientras que, en la Etapa 4 se tuvieron valores en el rango de 7.13 y 7.54. Esto se puede atribuir a que en las Etapas 3 y 4 ya se contaba con una previa aclimatación de la población microbiana del RAH al sustrato con fracción líquida de RSC.

### 3.4.2 Factor $\alpha$ de alcalinidad en el RAH

El factor  $\alpha$  de alcalinidad indica estabilidad durante el proceso de digestión anaerobia, pues denota que no se tienen indicios de acidificación debido a la posible acumulación de AGVs. De acuerdo a lo que reportaron Ripley *et al.* (1986), mientras el valor del factor  $\alpha$  tenga un valor inferior a 0.3, el proceso de digestión anaerobia se encuentra estable.

En la Figura 3.4 se muestra el monitoreo del factor  $\alpha$  de alcalinidad. Al arranque de la operación del RAH, este valor fue de 0.44. En el día 4 de operación se tuvo un valor de  $\alpha = 0.10$  y al finalizar la Etapa 1 el valor fue de  $\alpha = 0.22$ . Durante esta etapa los valores del factor  $\alpha$  de alcalinidad se mantuvieron inferiores a 0.3 al utilizar como sustrato la fracción líquida de RSO.

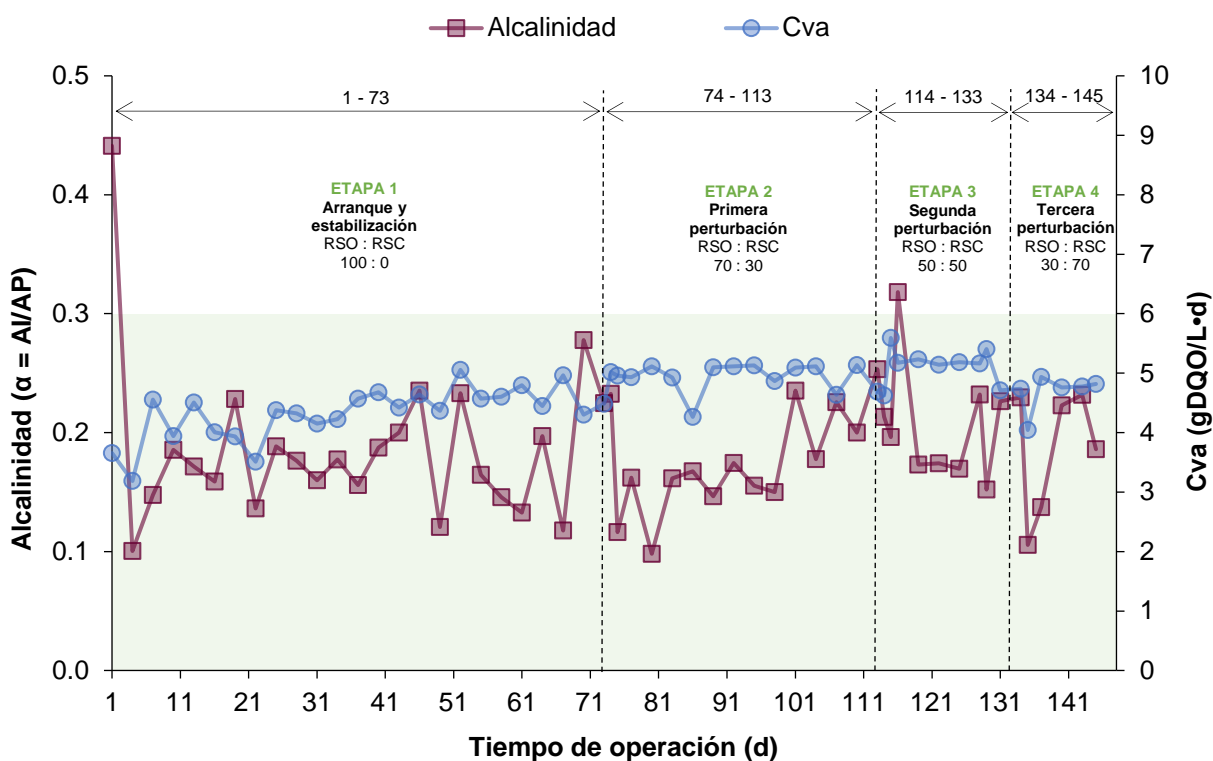


Figura 3.4 Factor  $\alpha$  de alcalinidad en el RAH

Al inicio de la Etapa 2, en el día 74 de operación, se tuvo un valor de  $\alpha = 0.23$ , cercano al valor en el final de la Etapa 1. Sin embargo, en el día 75 de operación el valor del factor  $\alpha$  disminuyó hasta un valor de 0.12, posteriormente, aumentó paulatinamente hasta alcanzar un valor de  $\alpha = 0.25$  al final de la Etapa 2. El factor  $\alpha$  de alcalinidad en esta etapa también se mantuvo por debajo de 0.3, es decir, la primera perturbación con una mezcla (% v/v) de fracciones líquidas de RSO:RSC al 70:30 no propició la inestabilidad en el proceso de DA dentro del RAH.

En el día 114 de operación, correspondiente al inicio de la Etapa 3, se tuvo un valor de  $\alpha = 0.21$  y se percibió que el valor del factor  $\alpha$  de alcalinidad fue en decremento paulatino. Sin embargo, en el día 116 de operación se obtuvo un valor de  $\alpha = 0.32$ , dicha inestabilidad fue mínima y tuvo una duración de 2 días, para posteriormente seguir con su tendencia a la baja. Aparentemente, la mezcla (% v/v) de fracciones líquidas de RSO:RSC al 50:50 provocó una ligera inestabilidad dentro del RAH.

Durante la Etapa 4, el factor  $\alpha$  disminuyó hasta alcanzar un valor de 0.11 y gradualmente se observó un aumento del mismo. De acuerdo con lo observado, durante esta etapa no se provocó inestabilidad dentro del RAH.

### 3.4.3 Remoción de DQO en el RAH

La remoción de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  durante el proceso de DA dentro del RAH se denotó en porcentaje y se presenta en la Figura 3.8. Al arranque de la operación, utilizando como sustrato la fracción líquida de RSO, la remoción de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  fue inestable durante los primeros 9 días de operación, sin embargo, se observó que el reactor fue capaz de aclimatarse considerablemente rápido al sustrato pues a partir del día 10 de operación la remoción de DQO fue en aumento hasta alcanzar remociones de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  del 80 % en el día 13 de operación. Las remociones siguieron en incremento hasta alcanzar remociones superiores a 95 % a partir del día 15. El RAH alcanzó la estabilización a partir del día 20 de operación, manteniéndose así hasta el final de la Etapa 1 en el día 73 de operación, donde se alcanzó 97.9 % de remoción de  $DQO_T$  y 99.8 % de remoción de  $DQO_S$ .

En el día 74 de operación se presentó una disminución de la remoción de  $DQO_T$  y  $DQO_S$  con valores de 97.1 % y 95.1 %, respectivamente, lo cual fue provocado por la primera perturbación e inicio de la Etapa 2 utilizando como sustrato una mezcla (% v/v) de fracciones líquidas de RSO:RSC al 70:30. Gradualmente las remociones fueron disminuyendo, hasta alcanzar un valor mínimo de 91.3 % de remoción de  $DQO_T$  y 93.8 % de remoción de  $DQO_S$  en el día 77 de operación. La estabilización en esta etapa ocurrió en un periodo de 16 días, en los cuales se alcanzaron remociones superiores al 95 % tanto para  $DQO_T$  y  $DQO_S$ . Para el final de esta etapa, se alcanzaron remociones del 97.1 % de  $DQO_T$  y del 97.9 % de  $DQO_S$ . Se observó que las remociones durante la Etapa 2 no alcanzaron las obtenidas durante la Etapa 1, sin embargo, la disminución no es significativa, esto se puede atribuir a que la perturbación del proceso de DA fue con poca concentración de fracción líquida de RSC en el sustrato.

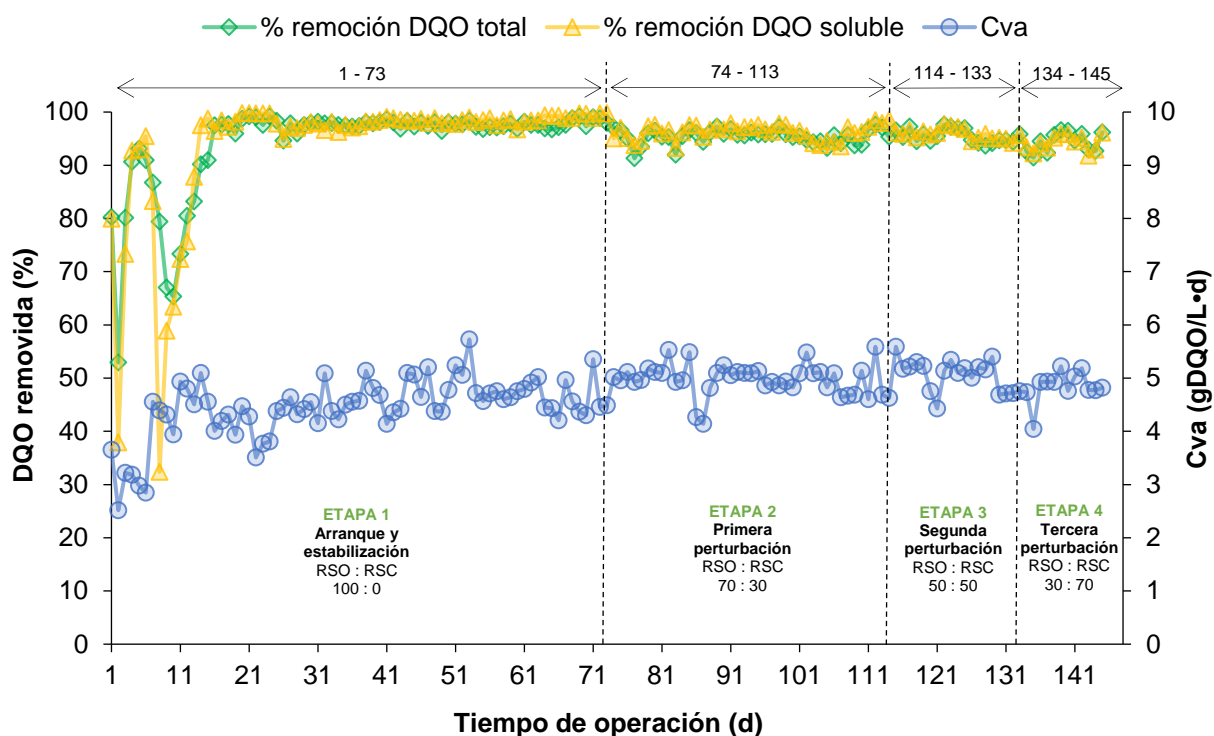


Figura 3.5 Porcentaje de remoción de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> en el RAH

Lo mismo ocurrió con el inicio de la Etapa 3, pues se observó la disminución de las remociones en el día 114 de operación con una remoción del 95.8 % de DQO<sub>T</sub> y 98.5 % de DQO<sub>S</sub>. En el caso de Etapa 4, la remoción de DQO disminuyó hasta un valor de 91.5 % de DQO<sub>T</sub> y 92.2 % de DQO<sub>S</sub> en el día 135 de operación, sin embargo, gradualmente aumentó hasta finalizar la operación del RAH con remociones de 96.2 % y 96.1 % de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>, respectivamente.

Con un valor de Cva semejante, pero utilizando solamente la fracción líquida de RSO, Juárez-García *et al.* (2022), obtuvieron remociones mayores a 95 %, lo cual es comparable con los resultados obtenidos en la presente investigación, a pesar de la presencia de inidores debido a los RSC. Por otro lado, en las investigaciones en las que se aprovechan residuos cítricos mediante DA, se busca eliminar el D-limoneno mediante algún pre tratamiento, sin embargo, sí existen algunos otros en los que se lleva a cabo el aprovechamiento sin efectuar ningún pre tratamiento: Anjum *et al.* (2017) obtuvieron una remoción de DQO<sub>T</sub> máxima de 49 % con una mezcla al 50 %

de cítricos, mientras que Rosas-Mendoza *et al.* (2018) alcanzaron una remoción de hasta el 85 % con la fracción líquida de RSC, en la presente investigación se alcanzaron remociones superiores al 96 % con la concentración máxima de RSC, lo cual se puede atribuir a que se realizaron perturbaciones graduales.

Durante la operación del RAH, una vez que llegó a la estabilización, las remociones de DQO no fueron inferiores al 90 %, lo cual denota que la población microbiana fue capaz de adaptarse a las condiciones de inhibición causadas por la presencia de D-limoneno en el sustrato.

#### **3.4.4 Remoción de SST y SSV en el RAH**

Se monitoreó el porcentaje de remoción de sólidos suspendidos totales y volátiles dentro del RAH, representado en la Figura 3.6. Durante la Etapa 1, se observaron fluctuaciones en la remoción de sólidos, en promedio, la remoción de SST fue de 28.1 % y 55.3 % la remoción de SSV. En las etapas subsecuentes se aprecia una tendencia creciente de la remoción de SST y SSV, esto puede ser atribuible a que la fracción líquida de los RSC contiene más SST y SSV que la fracción líquida de RSO (Tabla 3.3), de tal manera que la configuración del RAH permite una remoción eficiente de sólidos a pesar de que el sustrato empleado contenga mayor cantidad de estos.

En la Etapa 2 se tuvo una remoción promedio de 29.8 % de SST y 69.3 % de SSV. Mientras que, en la Etapa 3 se removieron en promedio 39 % de SST y 67.4 % de SSV, y finalmente, en la Etapa 4 hubo una remoción de 30.9 % de SST y 63.4 % de SSV. También, se aprecia que la remoción de SSV es mayor durante toda la operación del RAH, siendo éstas las partículas que orgánicas.

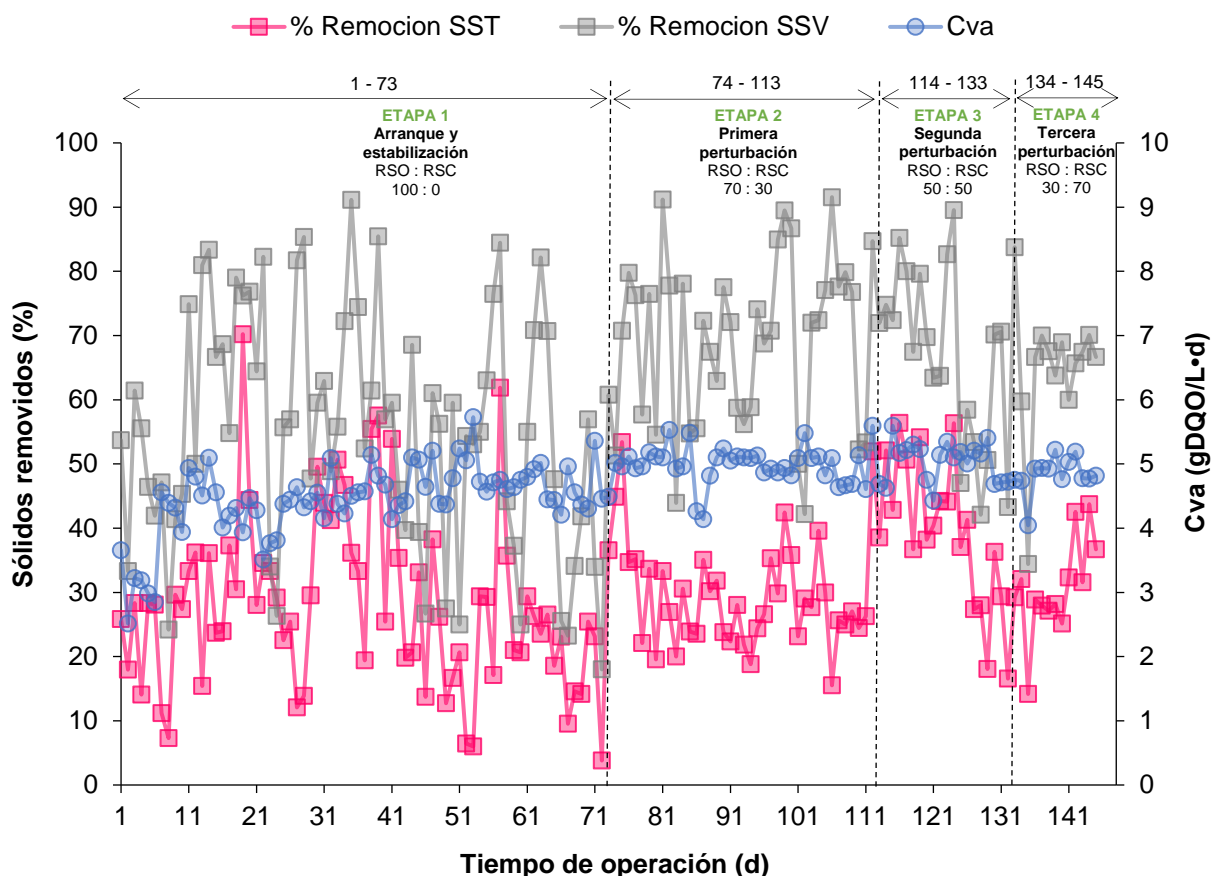


Figura 3.6 Porcentaje de remoción de SST y SSV en el RAH

### 3.4.5 Producción y rendimiento de biogás en el RAH

Durante la operación en modo continuo del RAH, se cuantificó la producción de biogás y su rendimiento con respecto a los gramos de DQO removidos, los valores obtenidos se muestran en la Figura 3.7. Al arranque de la operación del RAH, se tuvo una producción de 3,000 mL/d de biogás con un rendimiento de biogás de 410 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub>, esto es debido a que el carbono del sustrato se utilizó para la formación de biopelícula microbiana en el soporte, que al inicio del proceso estaba pre colonizado en la sección del LFI. Para el final de la Etapa 1, utilizando como sustrato la fracción líquida de RSO, se alcanzó una producción de 5,000 mL/d de biogás con un rendimiento de 555 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub>.



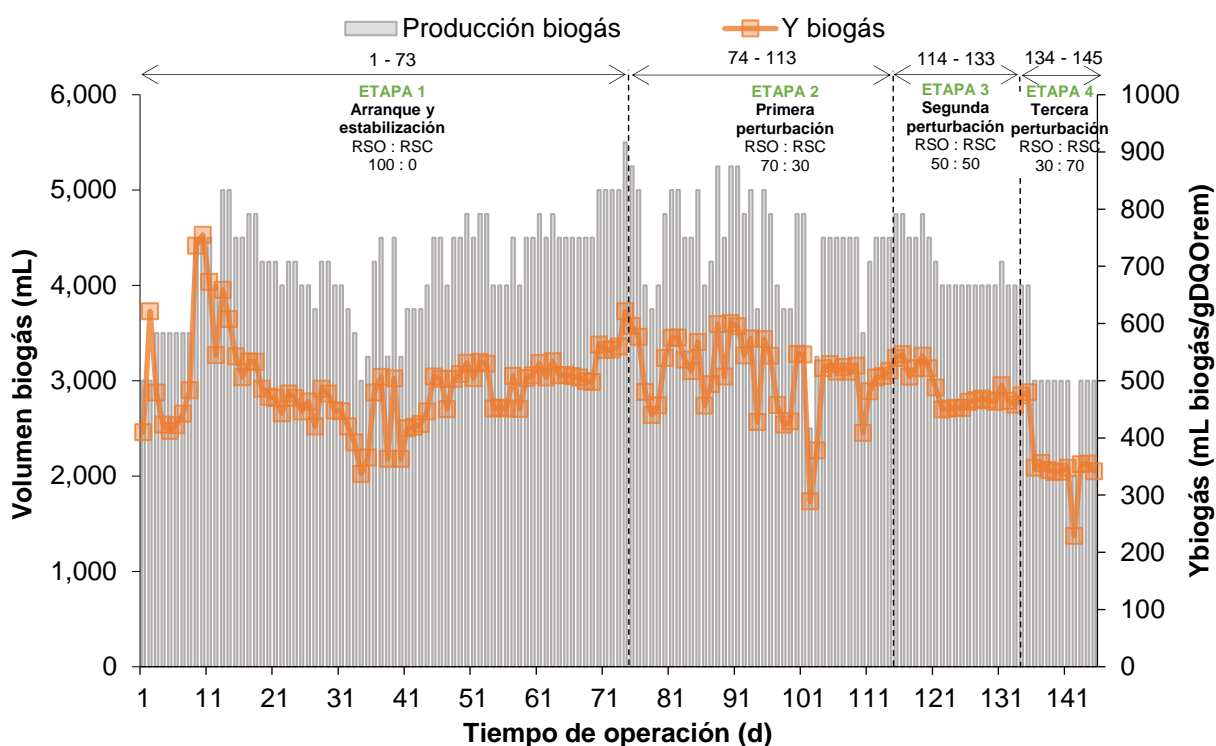


Figura 3.7 Producción y rendimiento de biogás del RAH

Al realizarse el cambio de sustrato a la mezcla (% v/v) de fracciones líquidas de RSO:RSC al 70:30, se observó una disminución gradual de la producción de biogás hasta 3,750 mL/d en el día 78 de operación, posteriormente, se presentaron fluctuaciones en la producción de biogás, las cuales pueden ser atribuibles a la adaptación de la población microbiana del inóculo anaerobio a las nuevas condiciones del sustrato con la inhibición del D-limoneno presente en la fracción líquida de los RSC. Sin embargo, después de 24 días, la población microbiana se estabilizó y se alcanzó una producción de 4,500 mL/d de biogás con un rendimiento de 508 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub> al final de la Etapa 2.

En cuanto a la Etapa 3, se observó un decrecimiento progresivo de la producción de biogás, hasta alcanzar la estabilización en 4,000 mL/d de biogás con un rendimiento de 458 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub>. Mientras que, en la Etapa 4, la producción disminuyó hasta 3,000 mL/d de biogás con un rendimiento de 342 mL biogás/gDQO<sub>rem</sub>. De tal manera que, es evidente una disminución de la producción de biogás en cada una de

las etapas de operación, conforme se aumenta la concentración de fracción líquida de RSC en el sustrato.

### **3.5 Monitoreo del desarrollo de la biopelícula del RAH**

Se realizó el monitoreo del desarrollo de la biopelícula adherida al soporte en las secciones del LF y del LFI al arranque de la operación, y al final de las cuatro etapas de operación. A continuación, se enuncian los resultados obtenidos.

#### **3.5.1 Cuantificación de la MVA en el RAH**

Se llevó a cabo la cuantificación de MVA y con ello se calculó el porcentaje de colonización en las zonas superior (S), media (M) e inferior (I) en la sección del LFI y los resultados se presentan en la Tabla 3.6.

Al arranque de la operación del RAH, la zona que presentó mayor porcentaje de colonización fue la zona inferior con un 41 %, lo cual se puede atribuir a la sedimentación de las partículas más densas. Durante la Etapa 1 de operación del RAH, el carbono proveniente del sustrato fue aprovechado para propiciar el crecimiento de la biopelícula en el soporte, observándose un aumento de 30 %, 20 % y 3% en las zonas superior, media e inferior, respectivamente. De esta manera, al finalizar la Etapa 1, fue la zona superior la que presentó un mayor porcentaje de colonización con 59 %, lo anterior puede ser consecuencia de la recirculación y el flujo de sustrato desde la parte superior del RAH, siendo esta zona la que se encontró en mayor contacto con el sustrato.

Al finalizar la Etapa 2 de operación, en la cual se efectuó la primera perturbación del proceso con la fracción líquida de RSC, se observó que la colonización disminuyó en las zonas superior y media. Lo anterior se puede atribuir al contacto de D-limoneno con la biopelícula de estas zonas, ya que el efecto que tiene el D-limoneno como inhibidor radica en generar daño en la membrana celular de los microorganismos, producir fuga del contenido celular y así provocar la muerte de la célula (Ruiz y Flotats,

2014). Valor similares de colonización se observaron en las zonas superior y media al finalizar la Etapa 3 de operación, a diferencia de la Etapa 2, también la zona inferior se vió afectada al finalizar la Etapa 3 y esto puede ser consecuencia del aumento en la concentración de la fracción líquida de RSC. Por último, al final de la Etapa 4 se presentó un incremento en la colonización de la zona superior, lo cual se puede deber a la adaptación de las poblaciones microbianas a la presencia de D-limoneno.

A pesar de los cambios en los valores de colonización en el soporte del RAH, se obtuvieron buenas remociones de  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , pues Skiadas *et al.* (2003) enuncian que una de las ventajas de los lechos fluidizados es su alta capacidad de bioconversión y mejor calidad del afluente debido a la alta concentración de biomasa y al área de transferencia de masa.

Tabla 3.6 Monitoreo de la biopelícula del soporte en el LFI del RAH

Etapa	Zona	Soporte (g)	Biomasa (g)	Biomasa:Soporte (g/g)	MVA (g/L)	Colonización (%)
Arranque	S	1.0457	0.0628	0.0601	20.93	29
	M	1.1030	0.0703	0.0637	23.43	30
	I	0.9555	0.0827	0.0866	27.57	41
Final Etapa 1	S	0.3227	0.0397	0.1230	39.70	59
	M	0.3213	0.0341	0.1060	34.05	50
	I	0.2916	0.0267	0.0914	26.65	44
Final Etapa 2	S	0.3334	0.0287	0.0861	28.70	41
	M	0.3439	0.0308	0.0896	30.80	43
	I	0.3300	0.0377	0.1142	37.70	54
Final Etapa 3	S	0.3449	0.0316	0.0916	31.60	44
	M	0.3386	0.0298	0.0882	29.85	42
	I	0.3369	0.0313	0.0928	31.25	44
Final Etapa 4	S	0.3216	0.0344	0.1070	34.40	51
	M	0.2846	0.0254	0.0892	25.40	42
	I	0.3573	0.0285	0.0796	28.45	38

Adicional a ello, se tomaron micrografías de las muestras en las zonas superior, media e inferior con el propósito de visualizar el desarrollo de la biopelícula adherida al LFI, las cuales se muestran en la Figura 3.8. En estas micrografías se observó que al final de la Etapa 1 fue cuando se presentó un mayor porcentaje de colonización del soporte, lo cual coincide con los valores obtenidos.

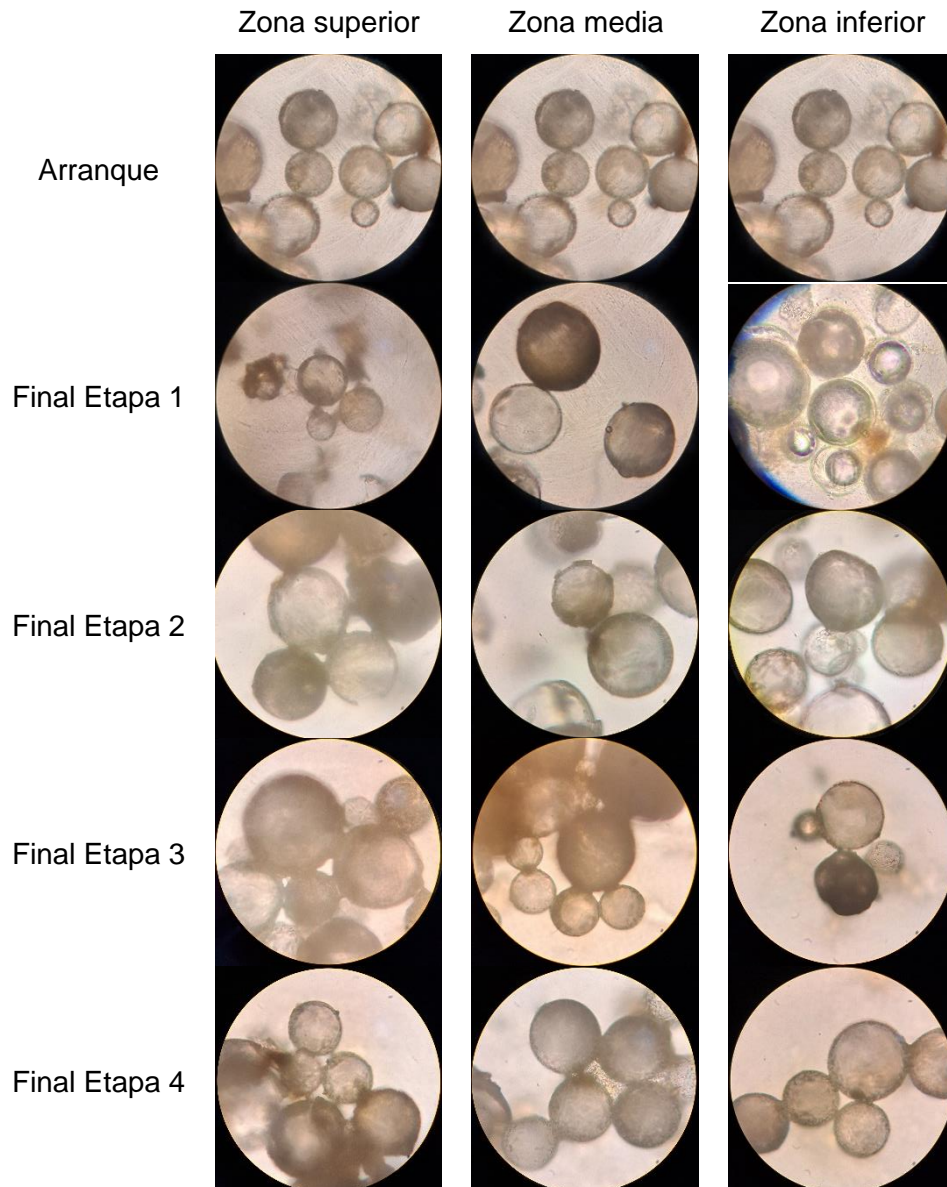


Figura 3.8 Micrografías de la biopelícula adherida al LFI

### 3.5.2 Relación sustrato/biomasa en el RAH

En la Tabla 3.7 se presentan los resultados obtenidos del cálculo de la relación sustrato/biomasa. Se observó que en todas las etapas de operación la relación es menor que 0.35, lo cual indica que la biomasa es superior al sustrato, esto es, el reactor se encontraba en condiciones de aumentar la Cva que fue alimentada (5 gDQO/L·d).

Tabla 3.7 Relación sustrato/biomasa durante la operación del RAH

<b>Etapas</b>	<b>Biomasa /Soporte (g/L)</b>	<b>Soporte (L)</b>	<b>Xo (g)</b>	<b>DQO<sub>E</sub> (g/L)</b>	<b>Q (L)</b>	<b>So (g)</b>	<b>So/Xo</b>
Arranque	23.98	1.10	26.38	3.03	3.00	9.10	0.35
Final de la Etapa 1	33.47	1.06	35.47	3.03	3.00	9.10	0.26
Final de la Etapa 2	32.40	1.02	33.05	3.03	3.00	9.10	0.28
Final de la Etapa 3	30.90	0.98	30.28	3.03	3.00	9.10	0.30
Final de la Etapa 4	29.42	0.94	27.65	3.03	3.00	9.10	0.33

### 3.6 Extracción y cuantificación del ADN

Se extrajo el ADN de ocho muestras de biomasa del final de las Etapas de operación: cuatro muestras del LF y cuatro muestras de la zona media del LFI. Posterior a la eliminación de impurezas del ADN, se procedió a visualizar su integridad, cuantificarlo y conocer la pureza de este, lo cual se presenta a continuación.

#### 3.6.1 Visualización de la integridad del ADN

En la Figura 3.9 se presentan los resultados de la visualización del gel agarosa al 0.7 % posterior a la electroforesis del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH, se observó una sola banda en cada uno de los carriles correspondientes a las

muestras, esto indica que el proceso de purificación del ADN fue correcto y no se degradó durante la extracción. Comparando con el marcador de talla Fago lambda/Hind III, se encontró que la talla de las ocho muestras fue cercana a los 20,000 bp, lo cual se considera adecuado para la secuenciación del ADN.

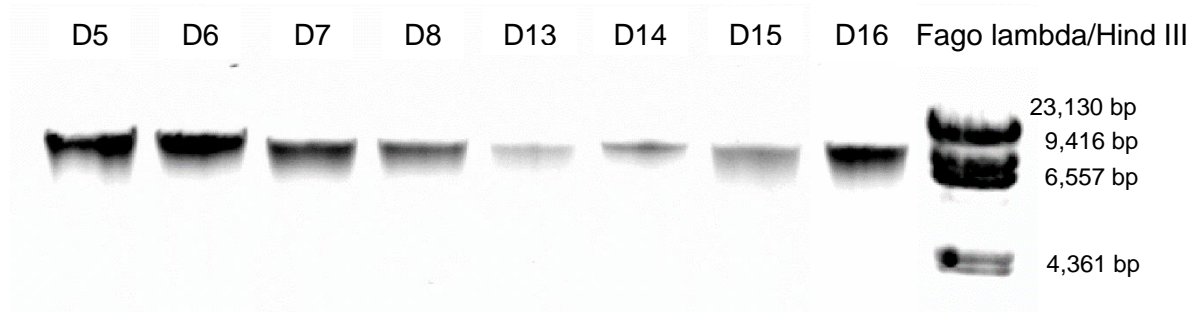


Figura 3.9 Visualización del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH, por medio de electroforesis en gel agarosa al 0.7 %

### 3.6.2 Cuantificación y pureza del ADN

Los resultados obtenidos de la medición de concentración y pureza del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH se presentan en la Tabla 3.8. Para que las muestras de ADN extraído se consideren adecuadas para la secuenciación, es necesario que la concentración de estas sea mayor a 6 ng/ $\mu$ L, la concentración de las ocho muestras se encontró en el rango de 24.3 y 103.7 ng/ $\mu$ L. Además, la pureza (A260/280) ideal de las muestras debe ser 1.8, es deseable que la pureza de la muestra se encuentre en un valor en el rango de 1.65 y 2.0, se observó que la pureza de las ocho muestras de ADN extraído se encontró dentro de este rango. Por lo anteriormente mencionado, se estableció que la totalidad de las muestras de ADN extraído se encontraron con concentración y pureza adecuada para realizar el análisis de las poblaciones microbianas mediante secuenciación metagenómica shotgun.

Tabla 3.8 Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras provenientes del RAH

<b>Clave</b>	<b>Muestra</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Pureza (A260/280)</b>
D5	Biopelícula adherida al soporte fijo. Etapa 1. Sustrato de RSO	103.7	1.80
D6	Biopelícula adherida al soporte fijo. Etapa 2. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 70:30	86.7	1.85
D7	Biopelícula adherida al soporte fijo. Etapa 3. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 50:50	50.5	1.83
D8	Biopelícula adherida al soporte fijo. Etapa 4. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 30:70	43.5	1.76
D13	Biopelícula adherida al soporte fluidizado. Etapa 1. Sustrato de RSO	31.2	1.74
D14	Biopelícula adherida al soporte fluidizado. Etapa 2. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 70:30	24.3	1.76
D15	Biopelícula adherida al soporte fluidizado. Etapa 3. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 50:50	38.9	1.80
D16	Biopelícula adherida al soporte fluidizado. Etapa 4. Mezcla de las fracciones líquidas RSO:RSC al 30:70	68.7	1.83

### 3.7 Análisis de la composición del inóculo anaerobio del RAH

El análisis de la composición del inóculo anaerobio del RAH se realizó mediante secuenciación metagenómica shotgun, obteniendo resultados taxonómicos hasta género y especie. Se encontraron 7,856 unidades taxonómicas operativas (OTUs) del dominio Bacteria y 198 OTUs pertenecientes al dominio Arquea en las ocho muestras de ADN<sub>g</sub> extraído de las muestras de biomasa provenientes del RAH. Se realizó un tratamiento de los datos para obtener la abundancia relativa de las especies Bacteria y Arquea, y se consideraron para la descripción de la dinámica poblacional aquellas que tuvieron una abundancia relativa mayor que 1 % durante alguna de las cuatro etapas de operación del RAH.

#### 3.7.1 Composición y dinámica poblacional del dominio Bacteria

- Biopelícula adherida al LF

La composición de la biopelícula adherida al LF del RAH y la dinámica poblacional del dominio Bacteria al final de las cuatro etapas de operación se muestra en la Figura 3.10. Se encontraron 15 especies con una abundancia relativa mayor que 1 % y las especies que tuvieron una abundancia relativa menor fueron agrupadas en el *Minor phyla*, el cual tuvo valores superiores al 60 % en las cuatro etapas de operación.

Al finalizar la Etapa 1, utilizando como sustrato la fracción líquida de RSO, se encontró que *Methylomonas rapida* fue la especie dominante con 9.82 % de abundancia relativa, esta especie es metanótrofa obligada (Tikhonova *et al.*, 2023), seguido de ella, se encontraron especies reductoras de sulfato: *Desulfobulbus propionicus* (7.17 %), *Sulfurospirillum cavolei* (4.08 %), *Solidesulfobulbus carbinoliphilus* (3.88 %), *Desulfobulbus propionicus* (2.52 %), y también *Mesotoga infera* (2.52 %) que son bacterias fermentadoras (Hania *et al.*, 2013). En la Etapa 2, las especies dominantes fueron *Dyella thiooxydans* (5.77 %), *Mesotoga infera* (5.23 %) y *Desulfobulbus propionicus* (4.92 %). Durante la Etapa 3 dominaron las especies *Desulfobulbus*



*propionicus* (8.58 %) y *Mesotoga infera* (6.60 %). Por último, en la Etapa 4 fueron dominantes *Mesotoga infera* (6.36 %) y *Desulfobulbus propionicus* (4.22 %).

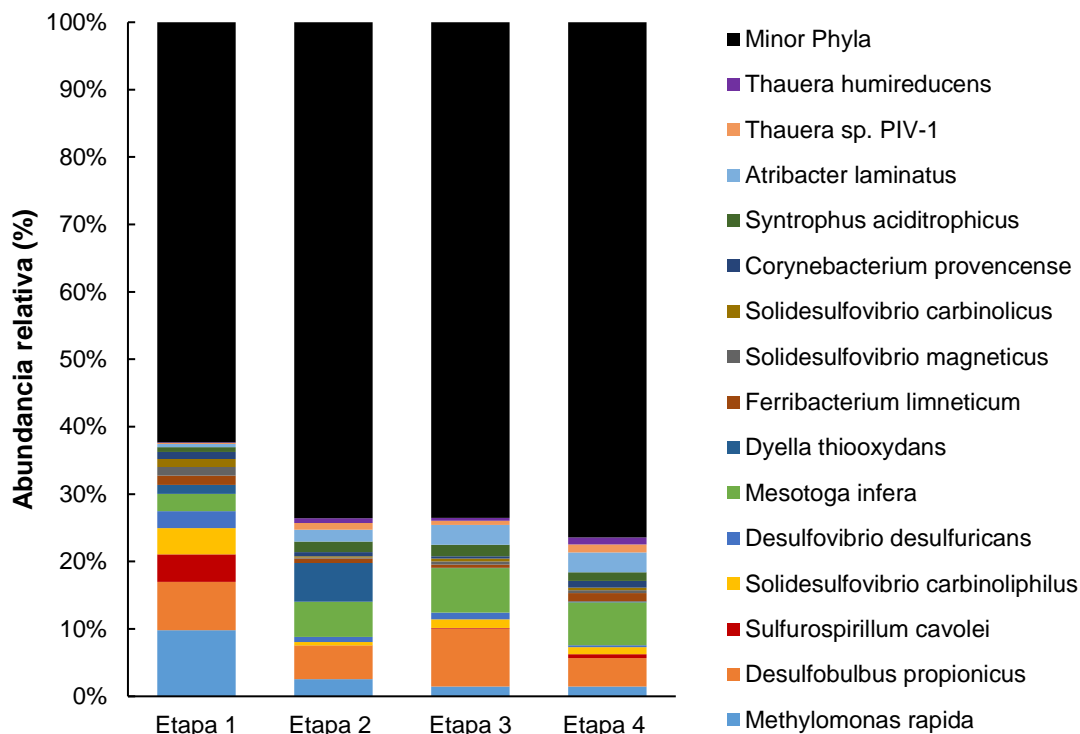


Figura 3.10 Composición de la biopelícula en el LF, dominio Bacteria

Las especies fueron clasificadas según su metabolismo para facilitar el análisis de las mismas, y fueron identificados los grupos tróficos que se muestran en la Figura 3.11. Se observó que después de propiciar la primera perturbación al introducir la fracción líquida de RSC en el sustrato, disminuyó la abundancia relativa de las metanótrofas obligadas conforme aumentó la concentración de RSC en el sustrato, esto sugiere que la disminución de la producción de biogás en cada una de las etapas afectó a estas bacterias pues disminuyó también su fuente de carbono y energía. La abundancia de las fermentadoras aumentó cuando se introdujo la fracción líquida de RSC, provocado por el aumento de azúcares en el sustrato provenientes de los RSC y también su buena adaptación a la inhibición por D-limoneno. Así mismo, se observó que la abundancia de las bacterias acetógenas sintróficas obligadas aumentó, este grupo estuvo

conformado por la especie *Syntrophus aciditrophicus*, la cual es capaz de producir acetato de una manera sintrófica a partir de butirato (Jackson *et al.*, 1999).

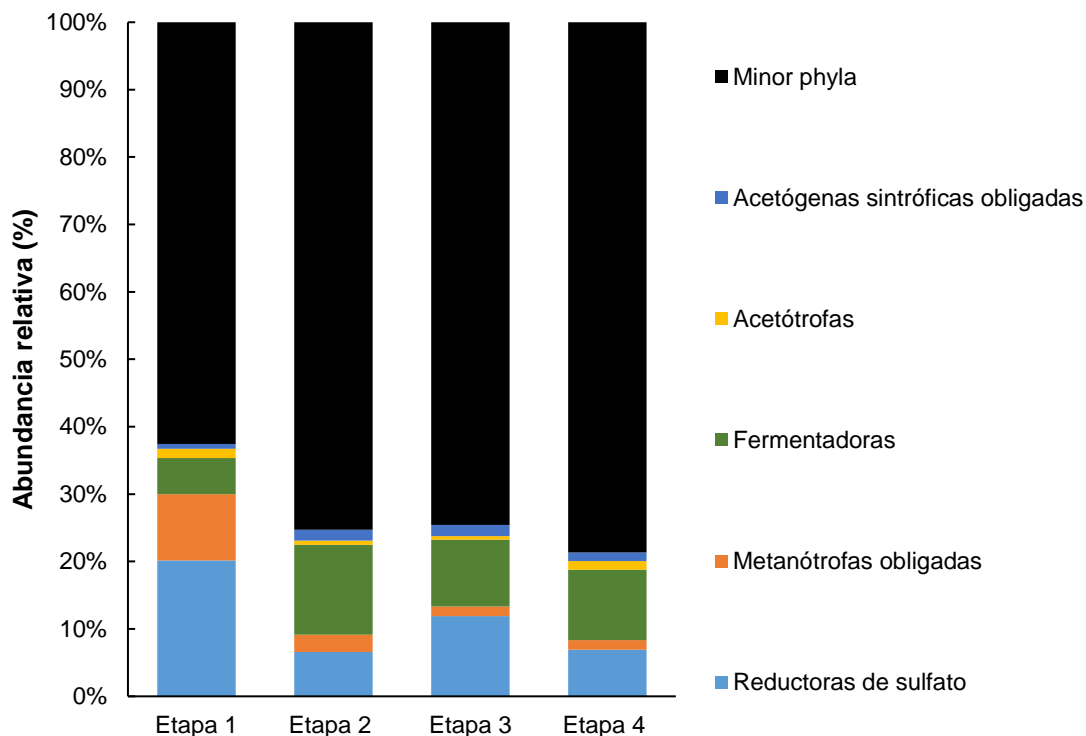


Figura 3.11 Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LF, dominio Bacteria

- Biopelícula adherida al LFI

Por otro lado, en la biopelícula adherida al LFI del RAH se encontraron 10 especies con abundancia relativa mayor que 1 %, mientras que, el *Minor phyla* representó alrededor del 80 % en las cuatro etapas, lo cual se presenta en la Figura 3.12. En la Etapa 1, fue dominante la especie *Desulfobulbus propionicus* (8.76 %), seguido de *Mesotoga infera* (3.10 %) y *Syntrophus aciditrophicus* (2.37 %). Durante la Etapa 2, las especies dominantes fueron *Desulfobulbus propionicus* (7.24 %) y *Mesotoga infera* (4.67 %). En la Etapa 3 se encontró que *Mesotoga infera* (6.74 %) fue la especie dominante, seguida de *Desulfobulbus propionicus* (5.40 %) y *Atribacter laminatus* (3.57 %), que también fermenta la glucosa y la convierte en acetato, hidrógeno y dióxido de

carbono (Katayama *et al.*, 2020). Finalmente, en la Etapa 4 dominaron las especies *Mesotoga infera* (6.74 %) y *Atribacter laminatus* (4.43 %).

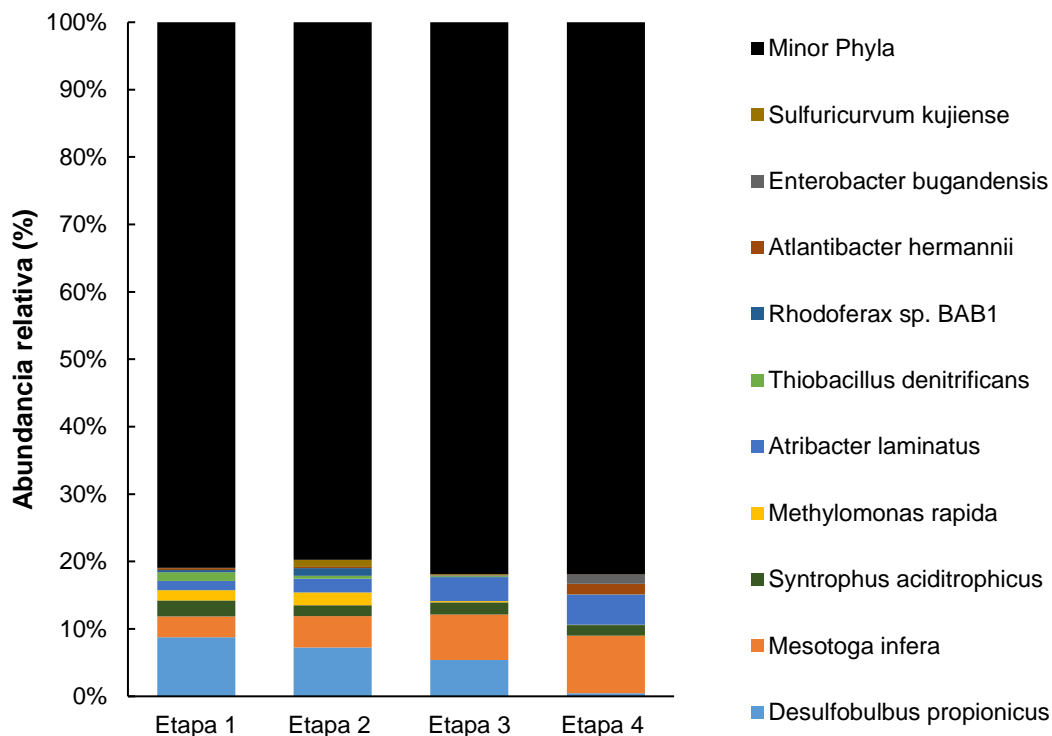


Figura 3.12 Composición de la biopelícula en el LFI, dominio Bacteria

Los principales grupos tróficos encontrados en la biopelícula del LFI se presentan en la Figura 3.13. Se encontró que las bacterias reductoras de sulfato fueron el grupo trófico dominantes durante la Etapa 1, sin embargo, al propiciar las perturbaciones con RSC, este grupo decreció hasta alcanzar una abundancia relativa por debajo de 1 %, lo cual puede indicar que este tipo de bacterias no fueron capaces de adaptarse a las condiciones de inhibición ocasionado por el D-limoneno. Del mismo modo sucedió con las metanótrofas obligadas, similar que lo sucedido en la biopelícula del LF. En cambio, se observó que el grupo de bacterias fermentadoras, constituido por *Mesotoga infera*, *Atribacter laminatus*, *Atlantibacter hermannii* y *Enterobacter bugandensis*, fueron capaces de adaptarse a las condiciones de inhibición y su aumento fue propiciado por el incremento de azúcares en el sustrato debido a la fracción líquida de RSC.

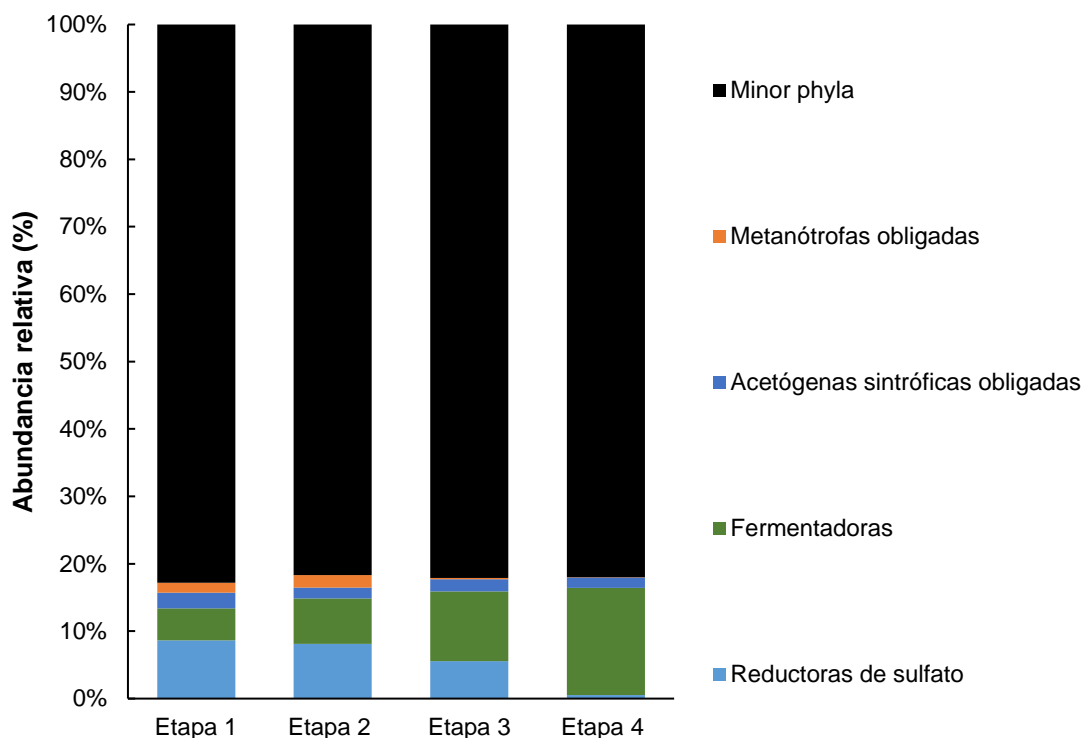


Figura 3.13 Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LFI, dominio Bacteria

Cabe resaltar que, las especies encontradas en la biopelícula del LF y del LFI con abundancia relativa mayor que 1 % fueron Gram-negativas, y de acuerdo con Ruiz y Flotats (2014), las bacterias Gram-negativas pueden tolerar concentraciones más altas de compuestos lipofílicos (tales como el D-limoneno) que las bacterias Gram-positivas, debido a que la pared celular externa de las bacterias Gram-negativas es hidrofílica y repele los compuestos lipofílicos.

### 3.7.2 Composición y dinámica poblacional del dominio Arquea

- Biopelícula adherida al LF

En cuanto a las especies del dominio Arquea, la biopelícula adherida al LF del RAH estuvo compuesto por cuatro especies con abundancia relativa mayor que 1 %, las cuales se muestran en la Figura 3.14. El grupo *Minor phyla* representó alrededor de 3 % en las cuatro etapas de operación. La especie acetótrofa *Methanotherix soehngeni*

(Touzel *et al.*, 1988) fue dominante durante las cuatro etapas de operación con abundancias relativas de 75.63 %, 92.23 %, 90.26 % y 92.55 %, respectivamente. Seguida de la especie *Methanobacterium formicicum*, la cual es reductora de CO<sub>2</sub> (Bryant y Boone, 1987), con abundancias relativas de 14.53 %, 2.34 %, 3.05 % y 2.44 % en cada una de las etapas, respectivamente.

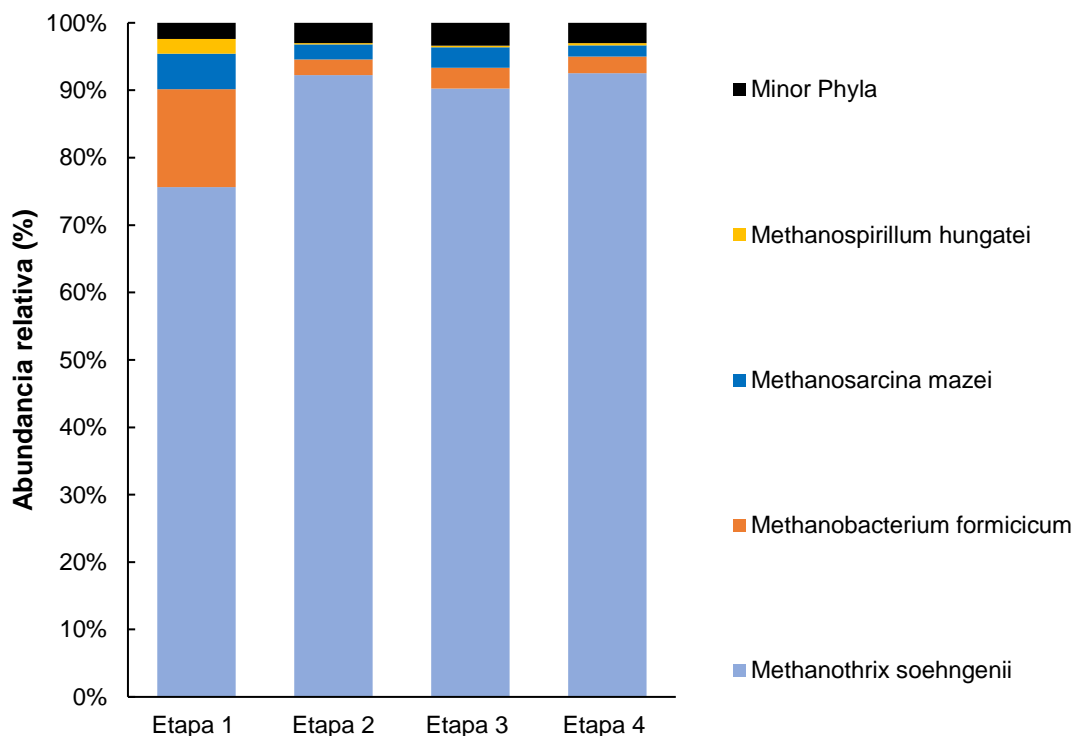


Figura 3.14 Composición de la biopelícula en el LF, dominio Arquea

Fueron identificados dos grupos tróficos de arqueas en la composición de la biopelícula del LFI: acetótrofas y reductoras de CO<sub>2</sub>, lo cual se presenta en la Figura 3.15. Se observó que, la abundancia relativa de las arqueas acetótrofas fue mayor a 80 % en las cuatro etapas de operación y también se observó que esta incrementó cuando se propiciaron las perturbaciones con RSC, esto se puede atribuir a que las especies tuvieron la capacidad de prosperar bajo estas condiciones de inhibición. Por lo contrario, la abundancia relativa de las arqueas reductoras de CO<sub>2</sub> decreció cuando se propiciaron las perturbaciones, siendo incapaces de prosperar en estas condiciones

y teniendo una abundancia relativa de aproximadamente 3 % durante las etapas en las que se tuvo presencia de RSC en el sustrato.

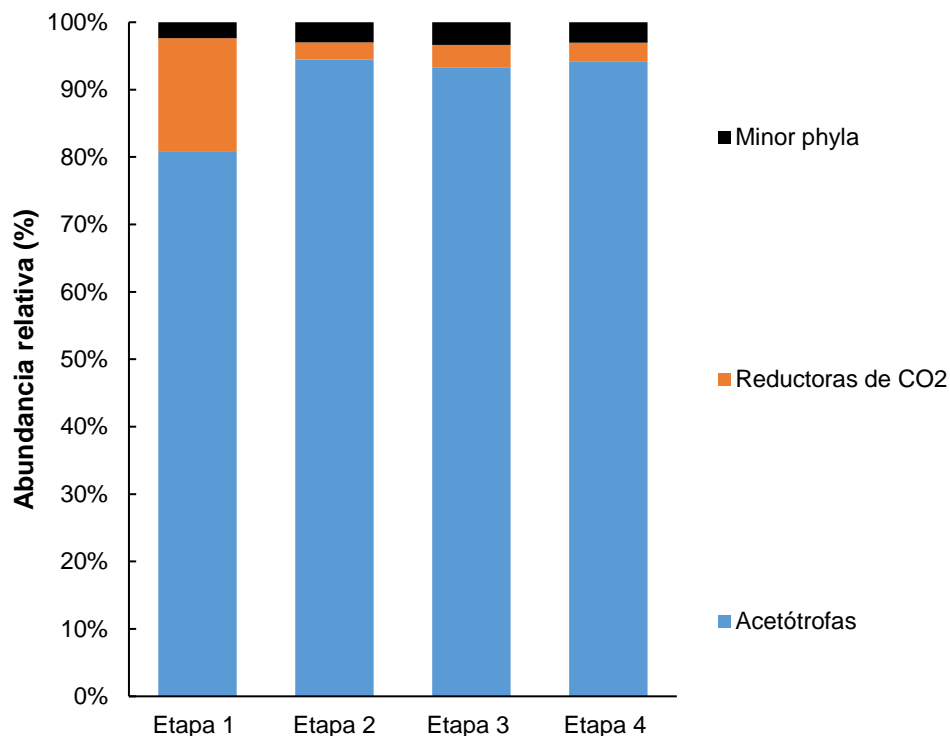


Figura 3.15 Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LF, dominio Arquea

- Biopelícula adherida al LFI

En el caso de la biopelícula adherida al LFI, se identificaron cuatro especies con abundancia relativa mayor que 1 %, las cuales se observan en la Figura 3.16 y el grupo *Minor phyla* representó alrededor de 3 % de abundancia relativa en las cuatro etapas de operación. La especie dominante durante las cuatro etapas de operación fue la acetótrofa *Methanotherix soehngenii* (Touzel *et al.*, 1988) con abundancias relativas de 86.02 %, 91.74 %, 91.02 % y 90.09 %, respectivamente. Seguida de *Methanosarcina mazei*, también una especie acetótrofa (Maestrojuán y Boone, 1991), con 8.72 %, 2.64 %, 2.03 % y 2.36 % de abundancia relativa, respectivamente.

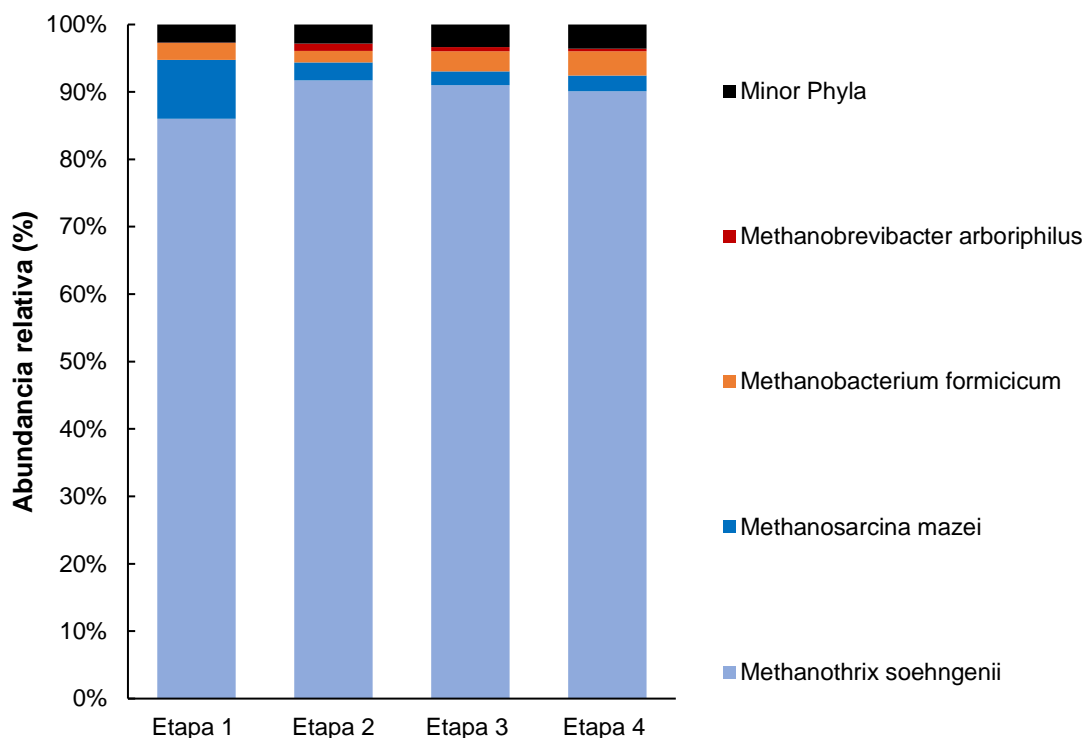


Figura 3.16 Composición de la biopelícula en el LFI, dominio Arquea

Una vez clasificadas las especies del dominio Arquea presentes en la biopelícula del LFI, mostradas en la Figura 3.17, se observó que las arqueas acetótrofas fueron las dominantes en las cuatro etapas de operación, teniendo una abundancia relativa alrededor del 90 % en cada etapa. En cuanto a las acetótrofas, no se observó una dinámica poblacional, pues los valores de abundancia relativa fueron muy similares a pesar de las perturbaciones con RSC. Del mismo modo ocurre con las especies reductoras de  $\text{CO}_2$ , pues la abundancia relativa se mantuvo alrededor de 3% en cada etapa y no se observó dinámica poblacional significativa. Fue evidente que, tanto en la biopelícula del LF como del LFI, fueron dominantes las arqueas con un metabolismo acetótrofo.

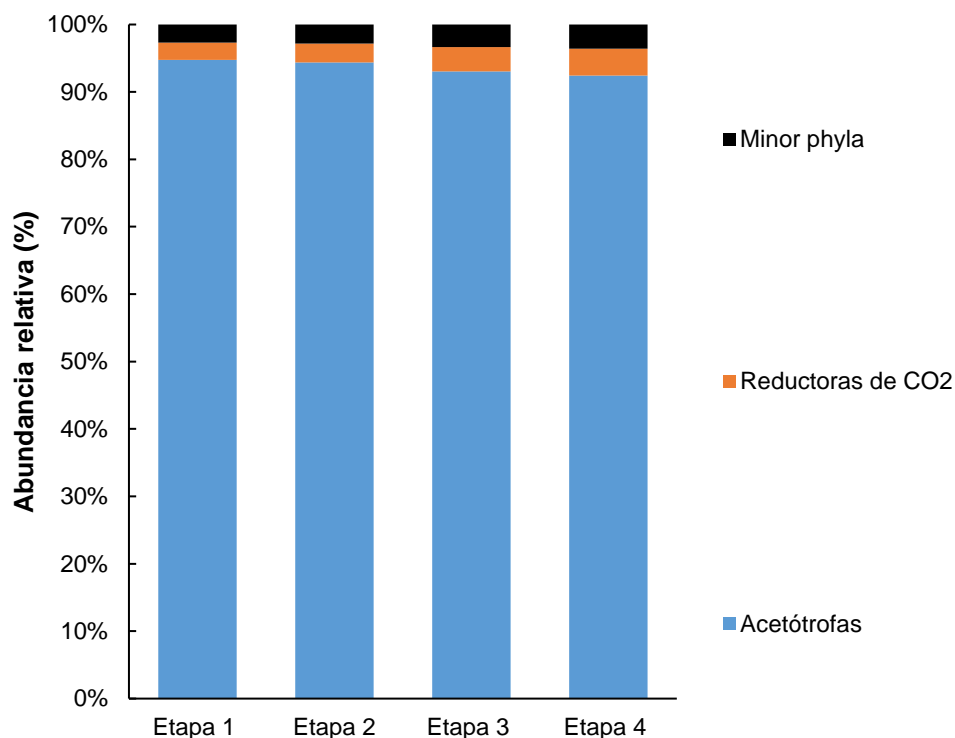


Figura 3.17 Clasificación según el metabolismo en la biopelícula del LFI, dominio Arquea

### 3.7.3 Correlaciones del desempeño del RAH y dinámica microbiana

Para analizar y comprender el comportamiento de las poblaciones microbianas dominantes durante el proceso de DA, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para el LF y el LFI. Mediante este análisis se relacionaron los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH, así como los valores de abundancia relativa de las poblaciones microbianas que fueran mayor que 1 %. Inicialmente, se realizaron los ACP considerando las especies de bacterias y arqueas, junto con los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH, sin embargo, el análisis ofreció mejores resultados cuando se realizó por grupo trófico, por lo que, a continuación, se presentan los resultados de acuerdo con esta clasificación.

En primer lugar, en la Tabla 3.9 se muestran los valores de los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH más relevantes, así como las abundancias relativas según el



grupo trófico de las poblaciones microbianas encontradas en la biopelícula del LF (> 1 %). Estos valores se ingresaron a Statgraphics Centurion para llevar a cabo el ACP.

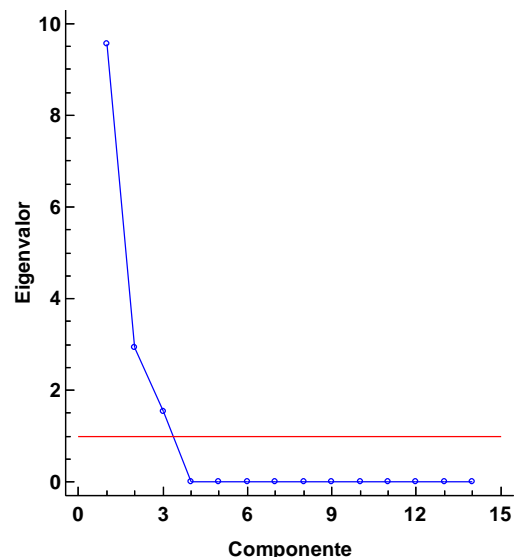
Tabla 3.9 Valores para el ACP del LF

Clave ACP	Parámetro	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
RSC	Concentración de cítricos (%)	0	30	50	70
Cva	Carga volumétrica aplicada (gDQO/L d)	4.76	4.66	5.08	4.78
pHin	pH interno	6.84	7.33	7.19	7.36
DQOT	DQO <sub>T</sub> removida (%)	98.59	94.51	94.15	93.94
alpha	Factor $\alpha$	0.22	0.22	0.23	0.18
biogás	Producción de biogás (mL/d)	5000	4500	4000	3000
Rbiogás	Rendimiento de biogás (mL/gDQO <sub>rem</sub> )	556.09	522.08	465.83	350.23
RedSul	Reductoras de sulfato (%)	20.15	6.60	11.87	6.90
Metano	Metanótrofas obligadas (%)	9.82	2.55	1.46	1.44
Fermen	Fermentadoras (%)	5.39	13.31	9.92	10.44
Ace	Acetótrofas (%)	1.33	0.63	0.48	1.26
ASO	Acetógenas sintróficas obligadas (%)	0.71	1.60	1.70	1.27
AceCH4	Arqueas Acetótrofas (%)	80.88	94.46	93.29	94.22
CO2CH4	Arqueas reductoras de CO <sub>2</sub> (%)	16.73	2.53	3.32	2.74

Nota: Los valores de los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH son el promedio de los días de operación durante cada etapa.

En la Figura 3.18 a) se presenta la información generada por el software con la varianza de los componentes, en ella se observa que se obtuvieron tres componentes con eigenvalores mayores que 1, estos explican el 100 % de la variabilidad de los datos ingresados al ACP, dicha información es apoyada por la Figura 3.19 b) que es la gráfica de sedimentación generada.

<i>Componente</i>		<i>Porcentaje de</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>Número</i>	<i>Eigenvalor</i>	<i>Varianza</i>	<i>Acumulado</i>
1	9.54975	68.213	68.213
2	2.92145	20.867	89.080
3	1.5288	10.920	100.000
4	9.21625E-16	0.000	100.000
5	6.24219E-16	0.000	100.000
6	4.00244E-16	0.000	100.000
7	6.26919E-17	0.000	100.000
8	0.0	0.000	100.000
9	0.0	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



a)

b)

Figura 3.18 Información generada por el software, LF: a) Variabilidad de los componentes, b) Gráfica de sedimentación

Los resultados del ACP indican que el Componente 1 explica 68.213 % de la variabilidad y el Componente 2 explica 20.867 % de la variabilidad del sistema de datos ingresados. En la Tabla 3.10 se muestran los pesos de los componentes, tomados de la información generado por el software, con estos datos se estableció un criterio de clasificación y se obtuvieron tres grupos que explican el proceso de DA en el LF del reactor. Mientras que, en la Figura 3.19 se muestra la gráfica de pesos de los componentes, según los grupos encontrados.

Tabla 3.10 Pesos de los componentes y agrupación, LF

Clave ACP	Componente 1	Componente 2
RSC	0.2919	-0.1962
Cva	0.0554	0.1411
pHin	0.3140	-0.0139
DQOT	-0.3220	-0.0442
alpha	-0.1265	0.5336
biogás	-0.2537	0.3355
Rbiogás	-0.2334	0.3773
RedSul	-0.3039	0.0154
Metano	-0.3203	-0.0538
Fermen	0.2755	0.1794
Ace	-0.1609	-0.5010
ASO	0.2707	0.3168
AceCH4	0.3198	0.0775
CO2CH4	-0.3198	-0.0848
Criterio	0.1700	0.2668

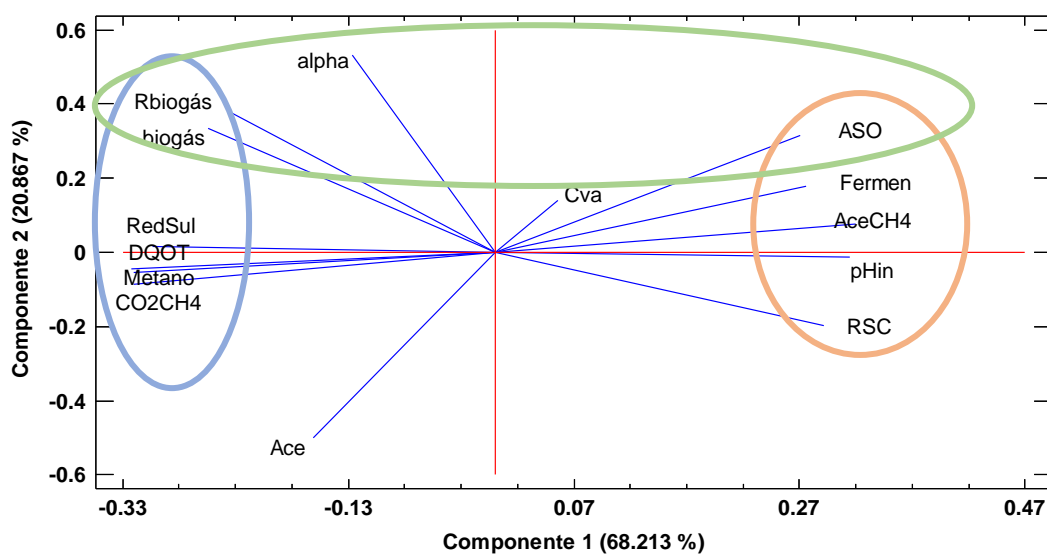


Figura 3.19 Gráfica de pesos de los componentes y agrupación, LF

El Grupo 1 correlaciona la proporción (% v) de fracción líquida de RSC en el sustrato (RSC), el pH interno del reactor (pHin), las arqueas acetótrofas (AceCH<sub>4</sub>) conformadas por *Methanotherix soehngeni* y *Methanosarcina mazei* (Maestrojuán y Boone, 1991; Touzel *et al.*, 1988), las bacterias fermentadoras (Fermen) conformadas por *Mesotoga infera*, *Dyella thiooxydans*, *Corynebacterium provencense* y *Atribactar laminatus*, y las bacterias acetógenas sintróficas obligadas (ASO) representadas por la especie *Syntrophus aciditrophicus*. Este grupo denota las dos vías metabólicas por el acetato: la vía facultativa, llevada a cabo por las bacterias fermentadoras y posteriormente por las arqueas acetótrofas, y la vía obligada que se llevó a cabo por una relación sintrófica entre las bacterias acetógenas sintróficas obligadas y las arqueas acetótrofas. En este caso, la vía obligada se estableció entre la especie bacteriana *Syntrophus aciditrophicus*, la cual es capaz de producir acetato de una manera sintrófica a partir de butirato (Jackson *et al.*, 1999) y la especie arqueana *Methanotherix soehngeni*. Estas vías fueron propiciadas por el incremento de RSC, lo que se puede atribuir al aumento de azúcares en el sustrato, sin embargo, también cabe resaltar que estas especies fueron capaces de adaptarse a las condiciones de inhibición por D-limoneno, ya que su abundancia relativa aumentó. En otras palabras, el Grupo 1 sugiere que la producción de metano en el proceso de DA fue llevada a cabo en su mayoría por la vía acetótrofa y esto fue beneficiado por el aumento de la concentración de RSC en el sustrato.

En el Grupo 2, por el contrario, se denota la producción de metano en el proceso de DA por la vía reductora de CO<sub>2</sub>, pues se relaciona a las arqueas reductoras de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>CH<sub>4</sub>) conformadas por las especies *Methanobacterium formicicum* y *Methanospirillum hungatei* (Bryant y Boone, 1987; Lino *et al.*, 2010), con la disminución del porcentaje de remoción de DQO<sub>T</sub> (DQOT) y la producción y rendimiento de biogás (biogás y Rbiogás), por consecuencia influyó también en la abundancia relativa de las bacterias metanótrofas (Metano) ya que se vio reducida su fuente carbono (Tikhonova *et al.*, 2023). Este grupo sugiere que la disminución de la producción de biogás y remoción de DQO<sub>T</sub> fue debido al decremento de especies reductoras de CO<sub>2</sub>,

probablemente porque no fueron capaces de adaptarse a las condiciones de inhibición por D-limoneno. Adicional a ello, se correlacionan también bacterias reductoras de sulfato (RedSul), lo cual se puede deber a la competencia por sustratos entre estas bacterias y las arqueas reductoras de CO<sub>2</sub>.

El Grupo 3 correlaciona el factor  $\alpha$  (alpha) con las bacterias acetógenas sintróficas obligadas y la producción y rendimiento de biogás. Esto sugiere que la estabilidad del reactor, denotada por el factor  $\alpha$ , influyó en el comportamiento de las acetógenas sintróficas obligadas, que a su vez impactaron en la producción y rendimiento de biogás, ya que estas bacterias están involucradas en la vía acetótrofa de producción de metano.

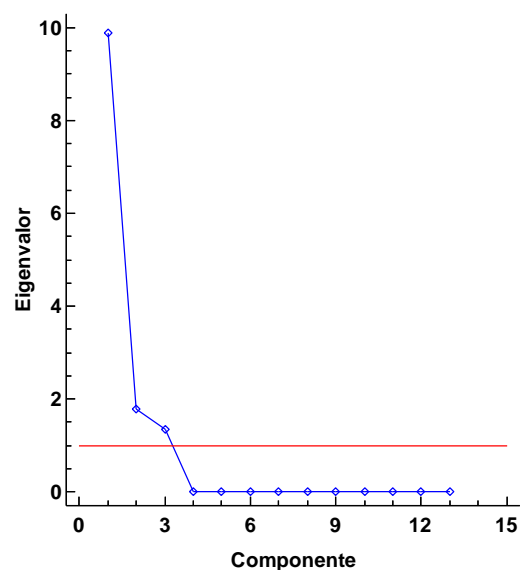
Tabla 3.11 Valores para el ACP del LFI

Clave ACP	Parámetro	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
RSC	Concentración de cítricos (%)	0	30	50	70
Cva	Carga volumétrica aplicada (gDQO/L d)	4.76	4.66	5.08	4.78
pHin	pH interno	6.84	7.33	7.19	7.36
DQOT	DQO <sub>T</sub> removida (%)	98.59	94.51	94.15	93.94
alpha	Factor $\alpha$	0.22	0.22	0.23	0.18
biogás	Producción de biogás (mL/d)	5000	4500	4000	3000
Rbiogás	Rendimiento de biogás (mL/gDQO <sub>rem</sub> )	556.09	522.08	465.83	350.23
RedSul	Reductoras de sulfato (%)	8.78	8.27	5.54	0.53
Fermen	Fermentadoras (%)	4.78	6.87	10.39	15.87
ASO	Acetógenas sintróficas obligadas (%)	2.37	1.62	1.78	1.54
Metano	Metanótrofas obligadas (%)	1.51	1.87	0.19	0.03
AceCH4	Arqueas Acetótrofas (%)	94.74	94.37	93.04	92.44
CO2CH4	Arqueas reductoras de CO <sub>2</sub> (%)	2.55	2.80	3.62	3.98

Nota: Los valores de los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH son el promedio de los días de operación durante cada etapa.

En segundo lugar, en la Tabla 3.11 se presentan los valores de los parámetros operativos y fisicoquímicos del RAH relevantes y las abundancias relativas según el grupo trófico de las poblaciones microbianas encontradas en la biopelícula del LFI. En la Figura 3.20 a) se presenta la varianza de los componentes, en ella se observa que se obtuvieron tres componentes con eigenvalores mayores que 1, estos explican el 100 % de la variabilidad de los datos, y en la Figura 3.19 b) se presenta la gráfica de sedimentación generada por el software.

Componente		Porcentaje de	Porcentaje
Número	Eigenvalor	Varianza	Acumulado
1	9.89236	76.095	76.095
2	1.7687	13.605	89.700
3	1.33894	10.300	100.000
4	7.97563E-16	0.000	100.000
5	4.92277E-16	0.000	100.000
6	3.98926E-16	0.000	100.000
7	2.28252E-16	0.000	100.000
8	0.0	0.000	100.000
9	0.0	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



a)

b)

Figura 3.20 Información generada por el software, LFI: a) Variabilidad de los componentes, b) Gráfica de sedimentación

El Componente 1 explica 76.095 % y el Componente 2 el 13.605 % de la variabilidad del sistema de datos ingresados. En la Tabla 3.12 se muestran los pesos de los componentes, en este caso se encontraron cuatro grupos que explican el proceso de DA en el LFI del reactor, los cuales se observan también en la Figura 3.21.

Tabla 3.12 Pesos de los componentes y agrupación, LFI

Clave ACP	Componente 1	Componente 2
RSC	0.3147	0.0328
Cva	0.0980	-0.6200
pHin	0.2404	0.4215
DQOT	-0.2604	-0.2159
alpha	-0.2266	-0.1586
biogás	-0.3150	-0.0177
Rbiogás	-0.3102	0.0121
RedSul	-0.3030	0.0611
Fermen	0.3139	-0.0319
ASO	-0.2543	-0.3759
Metano	-0.2683	0.4031
AceCH4	-0.3095	0.1712
CO2CH4	0.3101	-0.1638
Criterio	-0.1575	0.1700

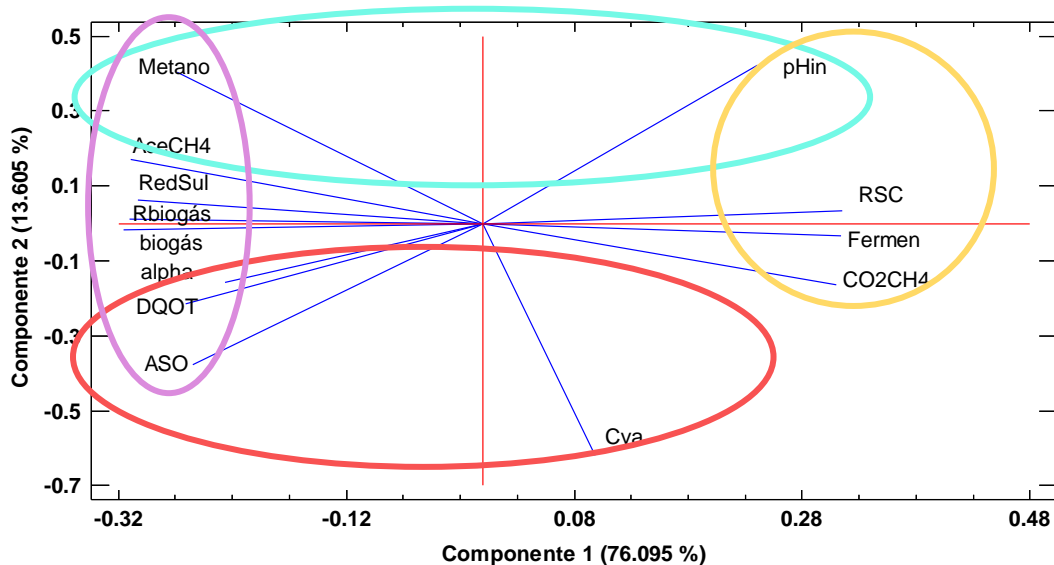


Figura 3.21 Gráfica de pesos de los componentes y agrupación, LFI

En el Grupo 1 se correlaciona la proporción (% v) de RSC en el sustrato con el pH interno del RAH, las bacterias fermentadoras (Fermen) y las arqueas reductoras de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>CH<sub>4</sub>). El aumento de la concentración de RSC impactó en el pH interno, pues provocó un incremento gradual en cada una de las etapas, probablemente debido a la capacidad buffer del reactor; así mismo, ambos aspectos influyeron en la dinámica de las bacterias fermentadoras y las arqueas reductoras de CO<sub>2</sub> pues su abundancia relativa aumentó durante las cuatro etapas de operación del RAH. De tal modo que, este grupo sugiere que la concentración de RSC impactó no solo en el pH interno del reactor, sino también en la actividad fermentativa y favoreció la metanogénesis por la vía reductora de CO<sub>2</sub>.

El Grupo 2 correlaciona los parámetros decrecientes de remoción de DQO<sub>T</sub>, factor  $\alpha$ , la producción y el rendimiento de biogás con las bacterias acetógenas sintróficas obligadas (ASO), las arqueas acetótrofas y las bacterias reductoras de sulfato. Existe un fenómeno, llamado sintrofia, que se puede observar en este proceso de DA, el cual involucra a una especie capaz de producir acetato (acetógenas sintróficas obligadas) siempre y cuando esté presente otra especie que consuma el acetato producido (acetótrofas). En este caso, la especie ASO, *Syntrophus aciditrophicus*, produce acetato a partir de butirato (Jackson *et al.*, 1999) y las especies acetótrofas son *Methanothrix soehngenii* y *Methanosarcina mazei* (Maestrojuán y Boone, 1991; Touzel *et al.*, 1988). Se presenta también una relación trófica con las bacterias reductoras de sulfato, pues el producto metabólico de algunas de ellas, *Desulfobulbus propionicus*, es el acetato (Widdel y Pfennig, 1982). La disminución de la producción de metano por la vía acetótrofa, afectó la abundancia relativa de las bacterias metanotrófas al disminuir su fuente de carbono. Por lo tanto, este grupo sugiere que la disminución de la abundancia relativa de las especies reductoras de sulfato y acetógenas sintróficas obligadas, provocó la disminución de las arqueas acetótrofas y por lo tanto impactó directamente en la producción de biogás y remoción de DQO<sub>T</sub>.

En el Grupo 3 se correlacionaron la Cva, DQO<sub>T</sub>, y las bacterias ASO, esta correlación se presentó probablemente por la tendencia a fluctuar a lo largo de las etapas de



operación del RAH. De tal modo que, este grupo sugiere que la estabilidad de las bacterias sintróficas obligadas estuvo muy influenciado por la estabilidad de la Cva y DQO<sub>T</sub>.

El Grupo 4 correlaciona al pH interno con las arqueas acetótrofas y las bacterias metanótrofas. Así que, este grupo sugiere que el pH influyó considerablemente en la disminución de las arqueas acetótrofas, provocando a su vez la disminución de las bacterias metanótrofas al verse disminuida su fuente de carbono (metano), ya que la vía acetótrofa fue la principal dentro del sistema.

---

## CONCLUSIONES

Se obtuvo la fracción líquida de RSO y RSC, posterior a un pre tratamiento mecánico, y con ellas se elaboraron tres mezclas % v/v al 70:30, 50:50 y 30:70, respectivamente. Se realizó la caracterización de las fracciones líquidas de RSO, RSC y las mezclas, y se encontró que la fracción líquida de RSC contiene una mayor concentración de materia orgánica y un menor pH que la fracción líquida de RSO. La fracción líquida de RSC presentó 67.20 gDQO/L y 58.55 gDQO/L de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>, respectivamente y 41.09 g/L y 38.41 g/L de SST y SSV, respectivamente y pH de 3.86. La fracción líquida de RSO tuvo 36.35 gDQO/L y 34.35 gDQO/L de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub>, respectivamente y 25.58 g/L y 21.97 g/L de SST y SSV, respectivamente y pH de 4.61. Fue notoria una tendencia en los valores de los parámetros evaluados y la concentración de RSC presente en las mezclas, de este modo se tiene que, la concentración de DQO<sub>T</sub> y DQO<sub>S</sub> fueron mayores en la mezcla RSO:RSC al 30:70, lo mismo ocurre con los SST y SSV; mientras que, el pH fue menor en la mezcla con mayor concentración de RSC (30:70).

Se caracterizó y monitoreó el desarrollo de la biopelícula adherida al lecho fluidizado inverso (LFI) del Reactor Anaerobio Híbrido (RAH) al arranque y al finalizar cada una de las etapas de operación en modo continuo de RAH. Al arranque, la zona que presentó mayor colonización en el soporte fue la zona inferior, con un valor de 41 %. La Etapa 1, en la cual se empleó como sustrato la fracción líquida de RSO, fue indispensable para el desarrollo de la biopelícula adherida al soporte y aumento de la colonización, pues se observó un aumento del 30 %, 20 % y 3 % en las zonas superior, media e inferior, respectivamente. Posteriormente, al propiciar las perturbaciones del sistema agregando al sustrato la fracción líquida de RSC, se observó una disminución en la colonización del soporte y después una estabilización, propiciada por la adaptación de las poblaciones microbianas presentes en la biopelícula al D-limoneno.

Se operó el Reactor Anaerobio Híbrido en modo continuo durante 145 días, en cuatro etapas de operación y se realizaron ensayos de biodegradabilidad utilizando como sustrato las tres mezclas RSO:RSC al 70:30, 50:50 y 30:70 % v/v. La Etapa 1 fue una etapa de arranque y estabilización, durante esta etapa, el RAH alcanzó la estabilidad, con respecto a la remoción de DQO, en un periodo corto de tiempo (20 días de operación) debido a que el soporte utilizado se encontraba pre colonizado y el sustrato utilizado, fracción líquida de RSO, era de fácil degradación; al finalizar esta etapa, se alcanzaron remociones de 97.9 % y 99.8 % de  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , respectivamente, y una producción de biogás de 5,000 mL/d con un rendimiento de 555 mL biogás/g $DQO_{rem}$  en condiciones estándar de presión y temperatura. Posteriormente, al propiciar las perturbaciones utilizando como sustrato las mezclas de las fracciones líquidas RSO:RSC, se observó una disminución de la remoción de DQO, hasta alcanzar, en la Etapa 4 de operación, valores de 96.2 % y 96.1 % de  $DQO_T$  y  $DQO_S$ , respectivamente, y una producción de biogás de 3,000 mL/d con un rendimiento de 342 mL biogás/g $DQO_{rem}$ . A pesar de la disminución, las remociones de DQO no fueron inferiores al 90 % y la producción de biogás no fue inferior a 3,000 mL/d, lo cual denota que las poblaciones microbianas fueron capaces de adaptarse a las condiciones de inhibición a causa de la presencia de D-limoneno en el sustrato.

Se analizó la composición del inóculo anaerobio especializado, es decir, aquel adaptado durante las cuatro etapas de operación del RAH mediante perturbaciones graduales de condiciones de inhibición por D-limoneno. Se encontró un total de 8,054 OTUs. Los resultados de abundancias relativas revelaron que las especies pertenecientes al dominio Bacteria dominantes en el LF al finalizar la Etapa 4 fueron *Mesotoga infera*, *Desulfobulbus propionicus*, *Atribacter laminatus* y *Syntrophus aciditrophicus*, mientras que las del dominio Arquea fueron *Methanothrix soehngenii* y *Methanobacterium formicicum*. En cuanto a las especies dominantes del dominio Bacteria en el LFI al finalizar la Etapa 4, se tuvieron a *Mesotoga infera*, *Atribacter laminatus*, *Atlantibacter hermannii* y *Syntrophus aciditrophicus*, y las especies del dominio Arquea fueron *Methanothrix soehngenii* y *Methanosarcina mazei*. Cabe

resaltar que las especies dominantes tanto en el LF como en el LFI fueron Gram-negativas. La producción de metano se llevó a cabo mediante la vía acetótrofa facultativa y obligada, así como la vía reductora de CO<sub>2</sub>, sin embargo, los datos de abundancia relativa y resultados de ACP demostraron que la principal vía metabólica para la metanogénesis es la vía acetótrofa. De acuerdo con los resultados del ACP, estas vías metabólicas se vieron favorecidas por el aumento de azúcares debido al incremento de RSC en el sustrato, así como la estabilidad del Factor  $\alpha$ .

## RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo el pre tratamiento mecánico de los RSO poco tiempo después de su disposición como desechos, con el propósito de evitar la proliferación de hongos que puedan provocar una alteración en la composición de bacterias y arqueas presentes en la biopelícula del RAH.

En cuanto al mantenimiento del inóculo anaerobio durante periodos de descanso administrativo, se recomienda por lo menos mantener la recirculación de sustrato para mantener activas a las poblaciones microbianas en la biopelícula.

Es recomendable mantener la duración de las etapas de operación lo más homogéneas posibles, principalmente, aumentar la duración de la última etapa de operación para verificar la estabilidad de todos los parámetros de operación del RAH.

Se recomienda extraer la muestra exacta de soporte con biomasa, esto para evitar que el reactor pierda una gran cantidad de biomasa. También, recalcular en cada muestreo el volumen del soporte para ajustar a su vez el volumen de sustrato alimentado. En este contexto, también se recomienda mantener una velocidad de flujo constante de la recirculación para evitar provocar lavados del soporte y por consiguiente, pérdida de biomasa.

En este caso, sería recomendable propiciar la perturbación con el 100 % de fracción líquida de RSC y analizar la composición del inóculo, de esta manera se obtendría información más amplia sobre las especies capaces de llevar a cabo la digestión anaerobia de este sustrato complejo. De esta manera, buscar aumentar la biomasa especializada en el tratamiento de estos sustratos complejos y evaluar diferentes perturbaciones en los parámetros operativos (Cva, pH, TRH e incluso temperatura).

---

## ANEXO A PROTOCOLO PARA LA COLECTA Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DESTINADAS A LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

*Duración: Una hora cada sección*

### III. Muestras de biopelículas microbianas adherida a tubos de PVC

1. El uso de guantes de látex es obligatorio y recuerde que la muestra debe mantenerse el mayor tiempo posible hundida en hielo frape o alguna criocaja fría para evitar la degradación del ADN. Antes de iniciar cualquier manipulación limpie la mesa de trabajo con etanol al 70%.
2. **Unos días antes de iniciar la colecta de la muestra** se esteriliza por calor húmedo y presión un mortero con pistilo por cada muestra usando una autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> (121 °C) durante 15 minutos.
3. Al finalizar la esterilización se deja secar el mortero y el pistilo esterilizados, después se colocan ambos en un congelador a -20 °C durante 2 horas como mínimo antes de la colecta de la muestra.
4. Ahora verifique que se tiene suficiente 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 cm<sup>2</sup> de la superficie de la biopelícula usando una espátula esterilizada o un volumen de 1 mL de la biopelícula usando una pipeta de mano con punta esterilizada, también se puede elegir colectar la superficie de uno o más soportes según la disponibilidad de biomasa.** La biomasa microbiana colectada se coloca en un tubo para centrifuga de 50 mL esterilizado usando una espátula esterilizada. *Si la muestra contiene poca biomasa se debe colectar una superficie o volumen mayor de la muestra si es posible.* Posteriormente, agregar 10 mL de de PBS 1X

6. El tubo con la muestra se balancea con otro tubo para centrífuga de 50 mL usado destinado al balanceo, entonces ambos tubos se balancean en una balanza analítica para ser centrifugados durante 12 min a 6,500 rpm (**6,738 g**) en la centrífuga Eppendorf 5810R a temperatura de 4 °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 el sobrenadante del microtubo con la muestra usando una micropipeta de 20 a 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada para remover todo el sobrenadante de la muestra de biopelícula, ya que el sobrenadante suele contener compuestos que contaminan el ADN o ARN a extraer, reduciendo su pureza. Estos compuestos podrían interferir en procedimientos biológico-moleculares posteriores.
9. Ahora, se toma con una espátula esterilizada el botón de la biopelícula del microtubo para colocarlo en el mortero esterilizado y congelado. *El tubo vacío donde estaba la muestra se puede reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.*
10. Después, se agregan 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl en el mortero esterilizado y congelado para macerar la biomasa de la biopelícula usando el pistilo esterilizado hasta obtener una suspensión homogénea.

**NOTA:** *Si la pasta macerada obtenida está muy espesa y no se puede pipetear en los microtubos de 2 mL, entonces se añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M hasta obtener una suspensión líquida fácil de pipetear y repartir en tubos con una micropipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10% usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el rompedor de células Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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**.*

#### **IV. Muestra de biomasa fija a soportes fluidizados**

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

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

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

**NOTA:** *Recuerde que el Tiocianato de guanidina es una sustancia mutagénica usada como 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.*

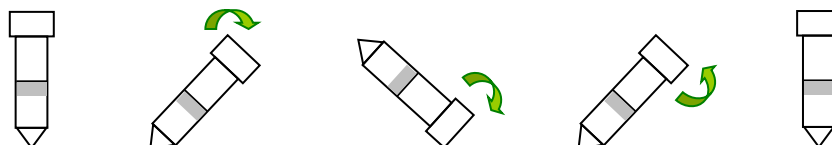
5. En seguida, se sacan el mortero y pistilo esterilizados del congelador a -20 °C y se colocan en la mesa de trabajo sin quitarles el papel que los envuelve.
6. **Inicialmente, se colectan 20 mL de la muestra líquida homogénea** con los soportes colonizados por la biomasa en un tubo para centrifuga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



*contiene poca biomasa se debe coleccionar un volumen mayor de la muestra si es posible.*

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

7. La biomasa microbiana coleccionada se refrigera, evitando que se congele porque se formarían agujas de hielo al interior celular y se perderían células microbianas para la extracción de ADN.
8. Después, se procede a la conservación de las muestras de las muestras usando una solución PBS 1X, tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M y N-Lauroyl sarcosina al 10%.
9. **La conservación de las muestras inicia agregando 30 mL de PBS 1X** en dos tubos para 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, respetando la proporción de PBS 1X.*
10. Después, se realiza un lavado de los soportes colonizados agitando la mezcla suavemente invirtiendo los tubos (bien cerrados) 2 veces tal como se indica en la imagen siguiente.



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

14. Ahora bien, **el líquido que contiene a los soportes colonizados** en ambos tubos de 50 mL se vierte en el mortero esterilizado y congelado. *Los tubos vacíos donde estaban las muestras se pueden reciclar en otros procedimientos físicos y químicos, ya que no contienen residuos peligrosos, pero nunca lo recicle en procedimientos biológico-moleculares destinados a la manipulación de ácidos nucleicos.*
  15. En seguida, se añaden 4 mL de Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 8.0, 0.1 M al mortero con la muestra (líquido que contiene a los soportes colonizados) usando una micropipeta de de 1-5 mL y punta esterilizada. *Al agregar este reactivo al mortero quizás se congele, entonces debe esperar a que se descongele para iniciar el macerado de la muestra.*
  16. Entonces, se procede a macerar la muestra con el pistilo esterilizado para lograr desprender la biomasa de los soportes colonizados hasta observar la presencia de restos de biomasa en la suspensión.
- NOTA:** *Si la pasta macerada obtenida está muy espesa y no se puede pipetear en los microtubos de 2 mL, entonces se añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl a pH 7.5, 0.1 M hasta obtener una suspensión líquida fácil de pipetear y repartir en tubos con una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Si añade más Tiocianato de guanidina 4 M-TrisCl también se debe añadir la cantidad correspondiente de N-Lauroyl sarcosina al 10% para completar la mezcla.*
17. Cuando se observe que hay suficiente biomasa desprendida de los soportes y macerada en una suspensión que tenga fluidez, es decir, no sea muy espesa; entonces, se añaden 900  $\mu$ L de la solución de N-Lauroyl sarcosina al 10% usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Esta suspensión se mezcla suavemente moviéndola con el pistilo para no generar muchas burbujas hasta homogenizarla.
  18. Finalmente, se reparte la suspensión con la biomasa macerada en 7 alícuotas de 500  $\mu$ L en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados para el rompedor de células Bead Bug, usando una micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada, esta punta se corta un poco con tijeras metálicas esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo. *Se debe evitar succionar los soportes con la pipeta, esta manipulación es difícil, pero si hay pocos soportes en la muestra conservada será más fácil su manipulación durante la extracción de ADN o ARN.*
  19. Las alícuotas de la muestra en los microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug se meten al congelador para ser **conservadas a -20 °C** dentro de las cajas criogénicas para almacenar microtubos previamente etiquetadas. Recuerde también etiquetar los tubos tanto en el tapón como en la pared del microtubo con la clave asignada a cada muestra colectada. La biomasa restante se regresa al tubo original y se etiqueta con la nueva clave.
  20. Antes de lavar el mortero y el pistilo contaminados con **Tiocianato de guanidina**, se debe realizarse cuidadosamente una limpieza previa usando un papel para remover la mayor cantidad de residuos en ambos materiales. Todo el papel usado

y contaminado debe ser contenido en un bote para residuos peligrosos. Después, se deben lavar el mortero y el pistilo con fibras exclusivas para estos materiales aun contaminados. *El propósito de esta limpieza es desechar al drenaje y ambiente la menor cantidad de **Tiocianato de guanidina**.*

## **XII. 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

**Duración: 4 HORAS**

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

1. El uso de guantes de látex es obligatorio, antes de iniciar cualquier manipulación limpie la mesa de trabajo con etanol al 70%.
2. Revisar que se tienen disponibles todos los reactivos y materiales a utilizar durante la extracción de ADN, hacer un check-list con la lista del apartado VII de este protocolo.  
Microtubos requeridos por cada muestra a procesar:
  - ✓ 3 microtubos o-ring de 2 mL marca Biologist esterilizados.
  - ✓ 1 microtubo o-ring de 2 mL marca Axygen esterilizado.
  - ✓ 1 microtubo de 1.5 mL marca Axygen esterilizado.
3. Se deben etiquetar con la clave de la muestra a procesar todos los microtubos que serán utilizados durante el procesamiento de la muestra. El etiquetado se realiza sobre el tapón y el costado del microtubo con un plumón de tinta permanente, solo el microtubo destinado al ADN extraído debe tener una etiqueta adherible redonda porque será congelado.
4. Si se tienen todos los reactivos y materiales para realizar la extracción de ADN, entonces se prende el baño maría *Precision* a 70 °C y el baño seco a 37 °C.
5. Cuando el baño maría llegue a 70 °C, se debe sacar la muestra del refrigerador a – 25 °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).
6. En seguida, se coloca la muestra dentro del baño maría *Precision* y se incuba durante 1 hora a 70 °C para iniciar la lisis celular.
7. Después de un minuto de la incubación se debe sacar la muestra para agitarla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a la máxima velocidad con el propósito de mezclar la muestra y el Lauril-sarcosina al 5% añadido con anterioridad. Finalmente, se regresa la muestra al baño maría *Precision* para que finalice el período de incubación.
8. Durante la incubación de la muestra, se muelen todos los hielos de tres recipientes usando el equipo triturador y se coloca el hielo molido en el contenedor de hielo azul.

**Nota:** El rompedor de células debe programarse a un valor de 400 para la velocidad (equivalente a 4,000 rpm, máxima velocidad) y 50 para el tiempo (equivalente a 50 segundos).

9. Después de una hora, se saca el microtubo de la muestra del baño maría Precision y se coloca dentro del hielo molido. Entonces, se prepara el Rompedor de células colocando la pieza de plástico donde se colocan los microtubos con la muestra.

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

10. Ahora, se deben usar los lentes de seguridad para proteger los ojos de las perlas de zirconio, que podrían caer en los ojos. Entonces, se agregan dentro del tubo de la muestra 500  $\mu$ L de las perlas de zirconio (0.1 mm de diámetro) esterilizadas. Si se tienen 2 muestras, se deben pesar los microtubos para seleccionar las parejas que tengan un peso similar para que, al ser añadidas a las muestras, éstas queden balanceadas para su uso posterior en la centrifuga.
11. En seguida, se cierra el microtubo y se coloca dentro del Rompedor de células, colocando la tapa del microtubo presionando el soporte de plástico que ajusta el microtubo al sujetador del rompedor de células y cerrando la compuerta. Recuerde que, si solo es un microtubo, éste se coloca en medio, pero si son dos microtubos, se deben colocar en las esquinas del sujetador para equilibrarlo.
12. Ahora se aprieta el botón start/stop para iniciar el equipo, si durante el funcionamiento algún microtubo se suelta del sujetador, presione el botón start/stop para detener el equipo y vuelva a poner el microtubo en el soporte del sujetador, verificando que la tapa del microtubo presione dicho soporte, cierre la compuerta y reinicie el equipo presionando el botón start/stop.
13. Al finalizar el tiempo se coloca la muestra en el hielo inmediatamente, si el microtubo sale caliente del rompedor de células se deja enfriar durante 2 a 5 minutos dentro del hielo.
14. Mientras se enfría la muestra, se le añaden 15 mg de PVPP (Polivinilpirrolidona) y se agita en el vórtex Genie 2 a una velocidad entre 2000 y 3000 hasta observar que las perlas y la muestra se mezclan adecuadamente, el tiempo no debe superar los 10 segundos. Si es necesario golpee el tubo boca abajo sobre la superficie metálica del vórtex antes de poner el microtubo en agitación.

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

15. Posteriormente, se centrifuga la muestra con el PVPP 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.
16. Al terminar la centrifugación, se recuperan 400  $\mu$ L del sobrenadante que contiene el ADN, usando una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en un microtubo nuevo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado (marca Biologyst), manteniéndolo previamente en el hielo para enfriarlo. Recuerde que el ADN está en el sobrenadante.

17. En seguida, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 2-10 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra, el propósito es agitar homogéneamente la mezcla para recuperar más ADN del sedimento de la muestra con el TENP.

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

18. 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.
19. Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado donde se colectó el primer sobrenadante.
20. Ahora se añaden otra vez 500  $\mu\text{L}$  de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 5-10 segundos en el vórtex GENIE2 según la densidad de la muestra.
21. Después, se centrifuga otra vez la muestra durante 3 min a 12,000 rpm en la centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf), balanceando la centrifuga con el microtubo de balanceo #2 o con otra muestra que se procese simultáneamente.
22. Al terminar la centrifugación, nuevamente se recuperan 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$  y punta con filtro esterilizada. El sobrenadante se colecta en el mismo microtubo donde se ha estado acumulando los dos sobrenadantes, quedando el microtubo con un volumen aproximado a 1200  $\mu\text{L}$ .
23. 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.

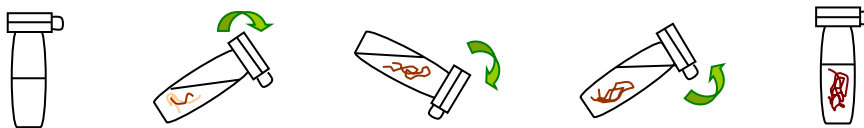
**Nota:** *El propósito es eliminar las partículas suspendidas (impurezas), que serán depositadas en el fondo del microtubo después de la centrifugación.*

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

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

### III. Precipitación del ADN

25. Inicialmente, se añade 1 volumen de isopropanol (2-propanol) equivalente al volumen del líquido contenido en el microtubo de la muestra o 600  $\mu\text{L}$  y se agita suavemente cada microtubo durante 3 minutos sujetando los microtubos con los dedos para voltearlos con movimientos lentos cerca de la superficie del hielo tal como indica en la siguiente figura.



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

26. Después de dicha agitación manual, se dejan reposar los dos microtubos durante 10 min a la temperatura ambiente sobre una gradilla.
27. 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 centrífuga con ambos microtubos y colocando una marca en la parte del microtubo donde se acumulará el sedimento o botón durante la centrifugación para saber donde está el ADN después de la centrifugación. Esto se hace porque es muy difícil observar el botón formado por el ADN, aunque en ocasiones se puede observar ese botón café porque tiene el ADN impurezas como proteínas.
28. Cuando finalice la centrifugación, saque los microtubos de la centrífuga y decante suavemente el sobrenadante de ambos microtubos centrifugados, esos sobrenadantes son desechos y se tiran al bote de residuos no peligrosos. El ADN está en el botón formado en ambos microtubos.
29. Posteriormente, se añade a uno de los microtubos 200  $\mu$ L de agua para PCR con una micropipeta de 200  $\mu$ 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.
30. 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.
31. Cuando se tenga la suspensión de ADN completa, entonces se añaden 10  $\mu$ L de RNAsa a 2.5 mg/mL (concentración final 1 mg/mL) y se agita en el vórtex orbital IKA a 2000 rpm mediante un pulso.
32. Después, se coloca el tubo en el baño seco para ser incubado durante 30 minutos a 37 °C. Recuerde que hay espacios para microtubos de 2.0 y 1.5 mL, asegúrese de colocar el microtubo en el espacio correcto.

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

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

#### **IV. Eliminación de las impurezas del ADN**

34. Cuando el baño maría Precision alcance los 70 °C, añada al microtubo de la muestra 200 µL de Buffer AL (Kit QIAamp) con una micropipeta de 200 µL y punta con filtro esterilizada.

35. Después, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a una velocidad de 2000 y se incuba 10 minutos en el baño maría Precision a 70 °C.

36. 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 mediante un pulso a una velocidad de 2000.

37. 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.*

38. 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.

39. Al finalizar la centrifugación, se debe desechar el microtubo con el filtrado, se coloca la micro-columna dentro de un microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp y se coloca en el hielo.

40. 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.

41. 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.

42. 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.



43. Al finalizar esta centrifugación, se elimina otra vez el microtubo con el filtrado y se coloca la micro-columna dentro de un microtubo nuevo de 1.5 mL esterilizado con la tapa cortada (marca Axygen) previamente usando las tijeras esterilizadas.
44. Ahora, se abre suavemente la micro-columna y se añaden 50  $\mu$ L del Buffer AE del Kit QIAamp usando una micropipeta de 50  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada. Se deben también añadir los 50  $\mu$ L del Buffer AE del Kit QIAamp a la micro-columna del microtubo de balanceo AW2 colocada en otro microtubo de 1.5 mL con la tapa cortada para balancear la centrífuga o a una micro-columna de otra muestra procesada simultáneamente.
45. Después de añadir los 50  $\mu$ 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.
46. 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.
47. Atención con la hidrólisis ácida del ADN en caso de usar agua para PCR en lugar del buffer AE.
48. Al terminar la centrifugación, se desecha la micro-columna y se recupera el filtrado ( $\approx$ 40  $\mu$ L) en un microtubo de 2 mL o-ring con tapa roscada esterilizado (marca Axygen) usando una micropipeta de 200  $\mu$ L y punta con filtro esterilizada.
49. En seguida, el microtubo con la muestra de ADN extraído se coloca en una caja criogénica etiquetada y se guarda en el congelador a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Recuerde etiquetar el microtubo con el ADN extraído antes de colocarlo en el congelador.
50. Ahora, se limpia la mesa de trabajo y cualquier otra superficie utilizada durante la extracción de ADN con etanol al 70%. También se apagan los equipos utilizados, se guardan los materiales usados como gradillas y se vacían los botes para residuos peligrosos y no peligrosos en los botes grandes respectivos.
51. Si quedan 4 o menos microtubos con 500  $\mu$ L perlas de zirconio esterilizadas y/o paquetes de 15 mg de PVPP, reponga todos los microtubos y paquetes utilizados durante sus manipulaciones.

#### V. Visualización del ADN extraído

52. La visualización de ADN extraído se realiza mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 0.7%. El resultado debe indicar una talla del ADN extraído entre 10 y 20 Kb según el marcador de talla Fago lambda/*Hind* III.
53. Al hacer el gel, recuerde usar siempre los guantes de latex para protegerse las manos de cualquier contacto con los colorantes de tinción Sybr-SAFE y Sybr-GOLD, éste último es carcinogénico. **Cuando se visualizan productos de una PCR siempre se debe usar Sybr-SAFE como colorante de tinción**, entonces se preparan 50 mL de solución del gel de agarosa, que es suficiente para un gel chico donde se pueden depositar 1 a 7 muestras y el marcador de talla.

54. El gel se prepara usando un **frasco etiquetado para geles con Sybr-SAFE**, primero se añaden al frasco 50 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) **1X**. Si esta solución no está preparada, se debe hacer una nueva solución diluyendo 100 mL de una solución madre Tris/Borate/EDTA (TBE) **10X** en 900 mL de agua destilada para obtener 1000 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) **1X**.
55. Cuando se hayan añadido los 50 mL de la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) **1X** al frasco, entonces se pesan 0.35 g de agarosa y se añaden al frasco con los 50 mL de la solución TBE **1X**.
56. Ahora, se coloca la suspensión de agarosa al 0.7% en el horno de microondas para ser calentada durante uno o dos minutos hasta lograr disolver la agarosa. Se debe observar el frasco durante su calentamiento para evitar el derrame de la solución si la calienta mucho el frasco.
57. Después, se deja enfriar el frasco con la solución del gel de agarosa al 1.5 % hasta que pueda soportar tocar el frasco con la mano. En seguida, se añade el colorante de tinción **Sybr-SAFE**. Siempre se añaden 10  $\mu\text{L}$  del colorante es Sybr-SAFE por cada 100 mL de la solución del gel de agarosa, pero en este caso **se añaden 5  $\mu\text{L}$  de Sybr-SAFE** porque se preparan 50 mL de la solución del gel de agarosa.

**NOTA:** Si por alguna razón se decide usar el colorante de tinción Sybr-GOLD, siempre se añade 1  $\mu\text{L}$  del colorante Sybr-GOLD por cada 100 mL de la solución del gel de agarosa, pero en este caso se añaden 0.5  $\mu\text{L}$  de Sybr-GOLD porque se preparan 50 mL de la solución del gel de agarosa.

58. Después de agregar el colorante de tinción se agita suavemente el frasco con la mano hasta observar la disolución del colorante en la solución del gel homogéneamente. En la **Tabla 1**, se muestran los reactivos para la preparación de un gel de agarosa (50 mL) usando Sybr-SAFE y Sybr-GOLD.

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

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

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

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

59. Cuando gel de agarosa al 0.7% aún está en estado líquido se coloca la base de acrílico sobre el soporte de plástico para la solidificación de dicho gel. Después, se debe nivelar dicho soporte con la mesa usando la burbuja de nivel, en seguida, se aprieta la base de acrílico con la manija del soporte para el vaciado del gel de agarosa al 0.7%. Finalmente, se coloca el peine de 8 dientes con 0.7 mm de ancho para obtener el número y tamaño de las celdas suficientes destinadas a depositar las muestras y el marcador de talla. La base de acrílico con el gel en estado líquido se deja enfriar durante una hora.
60. Inmediatamente, se coloca una **BOLSA NEGRA** sobre toda la base de acrílico para evitar que la luz degrade el colorante de tinción durante la solidificación del gel, ya que son moléculas fluorescentes sensibles a la luz. Adicionalmente, se debe colocar una caja de unicel que cubre al rompedor de células encima de la base para la solidificación del gel y se apagan las luces del laboratorio. El gel se deja enfriar hasta solidificarse durante aproximadamente 30 minutos con el aire acondicionado prendido.

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

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

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

62. En este momento, se coloca el cuadro de plástico negro debajo de la cámara electroforética en la posición justo debajo del gel para facilitar la deposición de las muestras y el marcador de talla.
63. Después, se añade la solución Tris/Borate/EDTA (TBE) **1X** en la cámara de electroforesis hasta cubrir totalmente el gel y se debe verificar que las celdas no tengan aire atrapado. El nivel máximo de dicha solución está indicado con una línea en la cámara electroforética, pero usualmente superamos este nivel para lograr cubrir el gel con dicha solución sin que se desborde fuera de la cámara electroforética.
64. Ahora, se corta un trozo de plástico parafilm con un tamaño adecuado para colocar sobre su superficie un número de gotas de 4  $\mu\text{L}$  de la solución de deposición (bluejuice) equivalentes al número de las muestras y el marcador de talla. Esto se realiza usando una micropipeta de 1 a 10  $\mu\text{L}$  y **punta sin filtro esterilizada**.

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

65. Después, se pipetea 4  $\mu\text{L}$  de una muestra de ADN extraído usando una micropipeta de 1 a 10  $\mu\text{L}$  y **punta con filtro esterilizada**, esta muestra se mezcla con una de las gotas de la solución de deposición, mezclando ambas sustancias con la misma micropipeta y punta con filtro esterilizada usada para colectar el ADN, la técnica de mezclado consiste en succionar la mezcla y depositarla sobre el parafilm 5 veces para formar la **mezcla ADN-solución de deposición**.
66. En seguida, se deposita la **mezcla ADN-solución de deposición** en la celda del gel destinada a esa muestra, todas las muestras se depositan en el gel de la misma manera, recuerde tomar nota del orden de deposición de las muestras y el marcador de talla dentro del gel en una libreta de trabajo. Si se tienen pocas muestras procure depositarlas en las celdas centrales del gel, ya que a veces la migración del ADN no es en línea recta en las celdas de las orillas del gel.  
**NOTA:** *La solución de deposición aumenta la densidad del ADN, haciéndolo más denso para depositarlo correctamente en la celda del gel sumergido en el electrolito.*
67. El marcador de talla o peso molecular llamado fago lambda/Hind III se coloca al final, la cantidad a depositar son 4  $\mu\text{L}$  y se mezclan con 4  $\mu\text{L}$  de la solución de deposición bluejuice tal como se hizo con las muestras.  
**NOTA:** *En ocasiones, el marcador de talla fago lambda/Hind III viene de fábrica mezclado con la solución de deposición y se ve azul dentro de su microtubo, en ese caso no se mezcla con ninguna solución de depósito.*
68. Cuando se finalice con la deposición de las muestras en el gel, se cierra la cámara de electroforesis y se conectan los cables en la fuente de poder para iniciar la electroforesis. Se debe tener cuidado con dichos cables porque pueden quedar por debajo de la cámara antes de conectarlos y cuando los jale para realizar la conexión podrían voltear la cámara.
69. Ahora, asegúrese que el cable de la fuente de poder está conectado a la corriente y prenda la fuente de poder apretando el botón ubicado en la parte baja del costado derecho. Después, ubique al frente de la fuente de poder un botón del lado izquierdo y apriete para que se ilumine el foco que corresponde a la V (voltaje) y apriete el botón situado del lado derecho (+/-) para subir el voltaje hasta 60 V. Ahora, apriete el botón del lado izquierdo otra vez para que se ilumine el foco que corresponde a la A (amperaje) que debe estar en 400, ese es el valor correcto, no se debe modificar. En seguida, vuelva a apretar el botón del lado izquierdo para que se ilumine el foco que corresponde al reloj y seleccionar el tiempo de la migración, usando el botón situado del lado derecho (+/-) suba el tiempo hasta 50 minutos. Finalmente, apriete el botón de la figura del hombre corriendo para que se ilumine el foco, lo que indica el inicio de la electroforesis, que se evidencia por un burbujeo en la parte baja de los electrodos dentro de la cámara electroforética.
70. Durante los primeros 5 minutos de la migración se debe tener la precaución de verificar que las manchas de los colorantes en cada muestra estén moviéndose en la dirección adecuada porque podría haberse colocado el gel en sentido apuesto, lo que provocaría la pérdida de las muestras al salir por el gel durante los primeros

- 15 minutos de la electroforesis. La cámara tiene una flecha verde en la parte superior de los costados para verificar el sentido de la migración.
71. **Mientras se realiza la electroforesis**, se verifica la conexión entre el equipo fotodocumentador y la computadora a través del programa *ImageLab*. Si usted ha visualizado antes algún gel de agarosa con su computadora personal, entonces puede continuar con el protocolo. Sin embargo, si usted nunca ha visualizado un gel de agarosa con su computadora personal entonces se debe verificar dicha conexión como se indica a continuación.
  72. Si es la primera vez que se visualiza un gel de agarosa se debe instalar en la computadora personal el **programa Image Lab Software** usando el disco de instalación o descargando dicho programa de la página web de BIORAD. Después de instalar en su computadora personal dicho programa, entonces se debe conectar la computadora al fotodocumentador mediante el cable USB y prender el fotodocumentador usando el botón verde ubicado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo. En seguida, se abre el Image Lab Software, que indicará una serie de pasos para calibrarlo por primera y única vez. Durante este proceso el programa solicitará que se coloque en el fotodocumentador la charola UV color Morado (si se tiene, tenga cuidado con esa charola porque el vidrio está flojo), después otra charola que no se tiene y debe dar click en skip, en seguida solicitará la charola azul (si se tiene) y finalmente, se solicitará otra charola que no se tiene y debe dar click en skip. Eso concluirá la calibración y se podrá iniciar el protocolo para visualizar el gel de agarosa.
  73. Cuando la migración electroforética haya finalizado al haber transcurrido los 50 minutos, se apaga la fuente de poder, se desconectan los cables unidos a la fuente de poder para quitar la tapa de la cámara de electroforesis y se coloca a un lado de dicha cámara.

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

74. La visualización del ADN extraído se realiza en el Fotodocumentador de geles BIORAD usando el programa Image Lab Software. Al inicio se prende la computadora personal y se conecta al equipo Fotodocumentador de geles mediante el cable USB, después, se prende dicho equipo presionando el botón verde situado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo Fotodocumentador.
75. Ahora se debe prender el equipo fotodocumentador de geles mediante un botón verde situado en el costado derecho y parte baja casi al frente del equipo. Esperar a que se prenda el botón verde indicando Ready ubicado al frente del equipo. Si ya ha usado el equipo fotodocumentador, se debe conectar la computadora al fotodocumentador mediante el cable USB y prender la computadora para lograr la conexión correcta con el fotodocumentador.
76. Después, se retira el gel de la celda de electroforesis, inclinándolo sobre la cámara para escurrir el líquido que contiene y evitando con los dedos que se resbale el gel por los costados.

77. El gel escurrido se deposita en la bandeja Azul del fotodocumentador de geles empujándolo con los dedos para que caiga en medio de dicha bandeja, cuidando que el gel no se rompa al manipularlo y evitando rayar la bandeja con el caster o base de acrílico donde se cuaja el gel.
  78. Se debe tratar de centrar el gel en el área de visualización y orientarlo de manera que los pozos coincidan la parte superior de la bandeja usando los dedos. También se debe procurar que no queden burbujas de aire entre el gel y la bandeja presionando el gel con cuidado para no romperlo hasta que las burbujas de aire sean removidas. Nunca haga algo que raye la bandeja.
  79. En seguida, se abre la puerta frontal del fotodocumentador y se coloca la bandeja con el gel en la ranura correspondiente, empujándola lentamente hasta que tope con el fondo. Entonces, se cierra la puerta frontal.
  80. En la computadora se inicia el software “ImageLab”, que está conectado al fotodocumentador y en la sección de “Protocol” seleccionar “New”. Después, en “Gel imaging” hacer click en Application>Select. Aquí seleccionar “Nucleic Acid Gels” y después seleccionar el colorante intercalante que se utilizó para la electroforesis (SYBR Safe o SYBR Gold).
  81. En “Image Exposure” seleccionar “Intense Bands”. Hacer click en “Lane and Band Detection” en el menú de la izquierda y seleccionar “Custom”, verificar que diga “50” en el cuadro de diálogo. Después, hacer click en el botón “Run Protocol” y esperar a que termine.
  82. Al aparecer la imagen se deben utilizar las herramientas de la barra izquierda “Lane and Band Tools” para ajustar la imagen, los tonos y luminosidad de la foto. La herramienta “Annotation Tools” se debe utilizar para agregar texto a la imagen, indicando la identidad de las muestras, es decir, sus claves; así como el marcador de talla utilizado y el peso de cada banda del marcador.
- NOTA:** *El tamaño del ADN extraído debe ser cercano a las 20,000 pb aproximadamente. Además, debe haber una sola banda, ya que de lo contrario significa que el ADN se ha degradado durante la extracción.*
83. Cuando la imagen esté lista, hacer click en “File” en la barra superior, después en “Export” y seleccionar “Export for Publication”. En la ventana que se abre verificar que la opción “Entire Image” esté seleccionada, y hacer click en “Export”. Aquí se selecciona la carpeta donde se vaya a guardar la imagen, así como el formato de imagen en que se desee guardar (jpg, tif y pdf); poniendo como título las claves de las muestras analizadas, fecha e iniciales de quien procesa esas muestras (ejemplo: V1-V9 21-03-19 RSC). El archivo creado también se guarda en una memoria USB exclusiva del laboratorio para copiarlo en una computadora personal.
  84. Finalmente, se cierra el archivo y el programa ImageLab, se apaga la computadora y el equipo fotodocumentador.
  85. Después, se abre la compuerta del fotodocumentador para sacar la bandeja azul con el gel y usando las manos con los guantes de latex sin polvo se toma el gel y

se deposita en el bote de los residuos no peligrosos si se usó SYBR-SAFE o se deposita en el bote de los residuos peligrosos si se usó SYBR-GOLD.

86. En seguida, se toma con cuidado la bandeja azul y se coloca sobre la tarja para enjuagarla con agua destilada y posteriormente secarla con el papel blanco aplicándolo para absorber el agua sin tallar la superficie brillante. Finalmente, se guarda la bandeja Azul en su caja con mucho cuidado.
87. La solución de TBE de la cámara electroforética se deposita en el frasco etiquetado "TBE 1X ADN solo carga" y dicha cámara se coloca sobre la tarja para enjuagarla con agua destilada y en seguida, secarla con el papel blanco aplicándolo para absorber el agua sin tallar la superficie. Finalmente, se dejar la cámara de electroforesis sobre la charola azul.

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

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

94. Al finalizar la lectura, se vuelve a editar otra muestra y se procede a enjuagar y secar la cubeta para la siguiente lectura tal como se indicó en los pasos anteriores hasta finalizar con todas las muestras.
95. Cuando se ha finalizado con el análisis de las muestras, se debe apretar la tecla **NEXT** para iniciar el procesamiento de los datos (Processing results). Ahí podrá verificar que los resultados de las mediciones de las muestras están guardados usando las fechas para abajo y arriba.
96. Después, se aprieta otra vez la tecla NEXT para pasar a la pestaña **Export**, eligiendo todos los parámetros mediante las flechas del tablero del equipo y se guarda el archivo en el disco duro poniendo como título las claves de las muestras analizadas, ADN, fecha e iniciales de quien procesa esas muestras (ejemplo: V1-V9 ADN 21-03-19 RSC).
97. En seguida, se da click en la tecla **FINISH**, se verifica que el archivo este guardado y se apaga el equipo. Recuerde enjuagar y secar la cubeta G1.0 mm con mucho cuidado para guardarla en su estuche.

### **VIII. Referencias**

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



---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abanades, S., Abbaspour, H., Ahmadi, A., Das, B., Ehyael, M. A., Esmailion, F. y Bani-Hani, E. H. 2022. A critical review of biogas production and usage with legislations framework across the globe. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **19**:3377-3400.

Akunna, J. C. 2019. Anaerobic waste-wastewater treatment and biogas plants: a practical handbook. Taylor y Francis Group, LLC.

Alvarado-Lassman, A., Méndez-Contreras, J. M., Martínez-Sibaja, A., Rosas-Mendoza, E. S. y Vallejo-Cantú, N. A. 2017. Biogas production from the mechanically pretreated, liquid fraction of sorted organic municipal solid wastes. *Environmental Technology.* **38**(11):1342-1350.

APHA. 2017. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 23<sup>th</sup> ed. American Water Works Association y Water Environment Federation. Washington, D.C.

Anjum, M., Khalid, A., Qadeer, S. y Miandad, R. 2017. Synergistic effect of co-digestion to enhance anaerobic degradation of catering waste and orange peel for biogas production. *Waste Management & Research.* **35**(9):967-977.

Atlas, R. M. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación, S. A. Madrid, España.

Bialek, K., Cysneiros, D. y O'Flaherty, V. 2014. Hydrolysis, acidification and methanogenesis during low-temperature anaerobic digestion of dilute dairy wastewater in an inverted fluidised bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **98**:8737-8750.

Boers, S. A., Jansen, R. y Hays, J. P. 2019. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical

microbiological diagnostic laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **38**(6):1059-1070.

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 two-stage up-flow anaerobic sludge blanket reactor treating coffee processing wastewater at high organic loading rate. *Bioresource Technology*. **268**:158-168.

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

Buffière, P., Pierre, B. J. y Moletta, R. 2000. The inverse turbulent bed: A novel bioreactor for anaerobic treatment. *Water Research*. **34**(2):673-677.

Campbell, M. K. y Farrell, S. O. 2015. Biochemistry. 8 ed. Cengage Learning. Stamford, USA.

Chatterjee, B., & Mazumder, D. 2019. Role of stage-separation in the ubiquitous development of Anaerobic Digestion of Organic Fraction of Municipal Solid Waste: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **104**:439-469.

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

Domínguez-Hernández, E. 2016. Diseño e implementación de un reactor de lecho semifluidizado inverso para el tratamiento anaerobio de un efluente de la industria cítrica. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Escamilla-García, P. E., Tavera-Cortés, M. E., Sandoval-Gómez, R. J., Salinas-Callejas, E. y Alvarado-Raya, H. E. 2016. Economic feasibility analysis for electrical generation from biogas in waste disposal sites in Mexico City. *Applied Economics*.

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

González-Paz, J. R. 2015. Tratamiento anaerobio del efluente proveniente del proceso de una industria citrícola en un reactor híbrido. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Gutiérrez, J. P. 2018. Situación actual y escenarios para el desarrollo del biogás en México hacia 2024 y 2030. Red Mexicana de Bioenergía A.C. y Red Temática de bioenergía de CONACYT. Morelia, México.

Han, Y., Sun, Z. y Chen, W. 2020. Antimicrobial susceptibility and antibacterial mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes*. *Molecules*. **25**(30).

Hania, W. B., Postec, A., Aullo, T., Ranchou-Peyruse, A., Erauso, G., Brochier-Armanet, C., Fardeau, M.L. 2013. *Mesotoga infera* sp. nov., a novel mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **63**(8):3003-3008.

Hashemi, S., Hashemi, S. E., Lien, K. M. y Lamb, J. J. 2021. Molecular microbial community analysis as an analysis tool for optimal biogas production. *Microorganisms*. **9**:1162.

Horan, N., Yaser, A. Z., Wid, N. 2018. Anaerobic digestion processes. Springer, Singapore.

IRENA. 2022. Renewable Energy Statistics 2022. [www.irena.org](http://www.irena.org) (consultada septiembre, 2022).

Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R. y McInerney, M. J. 1999. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology*. **171**:107-114.

Juárez-García, I. A. 2022. Análisis de la dinámica de poblaciones microbianas en reactores de biopelícula anaerobia para la producción de biogás. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Juárez-García, I., Snell-Castro, R., Méndez-Contreras, J., Vallejo-Cantú, N., Alvarado-Lassman, A. y Rosas-Mendoza, E. 2022. Performance of an anaerobic biofilm reactor through the application of different operational conditions. *Renewable Energy, Biomass & Sustainability*. **4**(1):14-22.

Katayama, T., Nobu, M. K., Kusada, H., Xian-Ying, M., Hosogi, N., Uematsu, K., Kamagata, Y. 2020. Isolation of a member of the candidate phylum 'Atribacteria' reveals a unique cell membrane structure. *Nature Communications*. **11**(6381).

Lino, T., Mori, K. y Suzuki, K.I. 2010. *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and emended descriptions of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**:2563-2566.

López-Vázquez, C., Buitrón-Méndez, G., García, H. A., y Cervantes-Carrillo, F. J. 2017. Tratamiento biológico de aguas residuales: principios, modelación y diseño. IWA Publishing.

Luis-Garcez, A. L. 2015. Codigestión de residuos sólidos de la industria citrícola en un digester anaerobio a nivel piloto. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Maestrojuán, G. M. y Boone, D. R. 1991. Characterization of *Methanosarcina bakeri* MS and 227, *Methanosarcina mazei* S-6, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761. International Journal of Systematic Bacteriology. **41**(2):267-274.

Martín, M. A., Siles, J. A., Chica, A. F. y Martín, A. 2010. Biomethanization of orange peel waste. Bioresource Technology. **101**(23):8993-8999.

Mudzanani, K., van Heerden, E., Mbhele, R. y Daramola, M. 2021. Enhancement of biogas production via co-digestion of wastewater treatment sewage sludge and brewery spent grain: physicochemical characterization and microbial community. Sustainability. **13**(8225).

Navarro, A. R., Lopez, Z., Salguero, J. y Maldonado, M. C. 2013. Anaerobic treatment of residual lemon pulp in digesters with semi-continuous feed. Water Science & Technology. **67**(3):514-520.

Parra-Orobio, B., Torres-Lozada, P., Marmolejo-Rebellón, L., Cárdenas-Cleves, L., Vásquez-Franco, C., Torres-López, W. y Ordoñez-Andrade, J. 2015. Efecto de la relación sustrato-inóculo sobre el potencial bioquímico de metano de biorresiduos de origen municipal. Ingeniería Investigación y Tecnología. **16**(4):515-526.

Parra-Ortiz, D. L., Botero-Londoño, M. A. y Botero-Londoño, J. 2019. Biomasa residual pecuaria: revisión sobre la digestión anaerobia como método de producción de energía y otros subproductos. Revista UIS Ingenierías. **18**(1):149-160.

Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. y Segata, N. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. Nature Biotechnology. **35**(9):833-844.

Rawoof, S. A., Kumar, P. S., Vo, D.V. N. y Subramanian, S. 2020. Sequential production of hydrogen and methane by anaerobic digestion of organic wastes: a review. *Environmental Chemistry Letters*. **19**(2):1043-1063.

Reis-Filho, J. 2009. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research*, **11**(3).

Reyes-Rosas, S. 2019. Influencia del D-limoneno como inhibidor del proceso de digestión anaerobia para producir un bioenergético. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Ripley, L., Boyle, W. y Converse, J. 1986. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*. **58**(5):406-411.

Rodríguez-Gómez, R., Renman, G., Moreno, L. y Liu, L. 2014. A model to describe the performance of the UASB reactor. *Biodegradation*. **25**:239-251.

Rosas-Mendoza, E. 2018. Digestión anaerobia de efluentes de la industria citrícola. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

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 Technologies and Environmental Policy*. **20**(7):1387-1397.

Rosas-Mendoza, E. S., Palacios-Ríos, J. H., Méndez-Contreras, J. M., Vallejo-Cantú, N. A. y Alvarado-Lassman, A. 2020. Designing a supply chain for the generation of bioenergy from the anaerobic digestion of citrus effluents. En: García-Alcaraz, J., Sánchez-Ramírez, C., Avelar-Sosa, L., Alor-Hernández, G. (eds) Techniques, tools and methodologies applied to global supply chain ecosystems. Springer, Cham.

Ruiz, B., y Flotats, X. 2014. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste management*. **34**(11):2063-2079.

SAGARPA. 2016. Planeación agrícola nacional. Cítricos: limón, naranja y toronja mexicanos. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257073/PotencialC\\_tricos-parte\\_uno.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257073/PotencialC_tricos-parte_uno.pdf) (consultada marzo, 2022).

Sanz, J. L. y Köchling, T. 2019. Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **18**:635-680.

Satari, B., y Karimi, K. 2018. Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation & Recycling*. **129**:153-167.

SEDUE. 1992. NMX-AA-15-1985. Protección al ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Muestreo - Método de cuarteo.

SEMARNAT. 2019. Informe de la situación del medio ambiente en México. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/index.html> (consultada marzo, 2022).

SENER. 2021. Balance Nacional de Energía 2020. <https://www.gob.mx/sener/documentos/balance-nacional-de-energía-2019> (consultada septiembre, 2022).

Serrano, A., Siles-López, J. Á., Chica, A. F., Martín, M., Karouach, F., Mesfioui, A. y Bari, H. E. 2014. Mesophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge and orange peel waste. *Environmental Technology*. **35**(7):898-906.

Sharpton, T. J. 2014. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science*. **5**:1-14.

Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F. y Hajibabaei, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*. **21**(8):1794-1805.

Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Schmidt, J. E. y Ahring, B. K. 2003. Anaerobic granular sludge and biofilm reactors. En Ahring, B. K., Angelidaki, I., Dolfig, J., EUegaard, L., Gavala, H., Haagensen, F., Stamatelatos, K. (eds) Biomethanation II. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Springer, Berlín.

Sun, J. (2007). D-limonene: safety and clinical applications. *Alternative medicine review*, **12**(3).

Tikhonova, E. N., Suleimanov, R. Z., Miroshnikov, K., Oshkin, I. Y., Belova, S. E., Danilova, O. V., Dedysh, S. N. 2023. *Methylomonas rapida* sp. nov., a novel species of fast-growing, carotenoid-producing obligate methanotrophs with high biotechnological potential. *Systematic and Applied Microbiology*. **46**(2).

Touzel, J. P., Prensier, G., Roustan, J. L., Thomas, I., Dubourguier, H. C. y Albagnac, G. 1988. Description of a new strain of *Methanothrix soehngenii* and rejection of *Methanothrix concilii* as a synonym of *Methanothrix soehngenii*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **38**(1):30-36.

USDA. 2021. Foreign Agricultural Service. Citrus annual report. [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Citrus %20Annual\\_Mexico %20City\\_Mexico\\_12-15-2021.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Citrus%20Annual_Mexico%20City_Mexico_12-15-2021.pdf) (consultada marzo, 2022).

USDA. 2022. Citrus: world markets and trade. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (consultada marzo, 2022).



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

Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E. y Perez-Alvarez, J. 2010. Physicochemical characterization of the orange juice waste waster of a citrus by-product. *Journal of Food Processing and Preservation*. **35**(2):264-271.

Wan, S., Sun, L., Sun, J., y Luo, W. 2013. Biogas production and microbial community change during the co-digestion of food waste with chinese silver grass in a single-stage anaerobic reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **18**:1022-1030.

Wang, N. X., Lu, X. Y., Tsang, Y. F., Mao, Y., Tsang, C. W., y Yueng, V. A. 2018. A comprehensive review of anaerobic digestion of organic solid wastes in relation to microbial community and enhancement process. *Journal of the Science of Food and Angriculture*.

Widdel, F. y Pfenning, N. 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Archives of Microbiology*. **131**: 360-365.

Zamri, M., Hasmady, S., Akhiar, A., Ideris, F., Shamsuddin, A., Mofijur, M. y Mahlia, T. 2021. A comprehensive review on anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **137**.

Zema, D. A., Fòlino, A., Zappia, G., Calabrò, P. S., Tamburino, V., y Zimbone, S. M. 2018. Anaerobic digestion of orange peel in a semi-continuous pilot plant: An environmentally sound way of citrus waste management in agro-ecosystems. *Science of the Total Environment*, **630**:401-408.

Zhang, W., Liu, D., Xiong, C. y Nie, Q. 2022. Peel essential oil composition and antibacterial activities of *Citrus x sinensis* L. Osbeck 'Tarocco' and *Citrus reticulata* Blanco. *Horticulturae*, **8**(9):793.

Zhao, S., Chen, W., Luo, W., Fang, H., Lv, H., Liu, R. y Niu, Q. 2021. Anaerobic co-digestion of chicken manure and cardboard waste: Focusing on methane production, microbial community analysis and energy evaluation. *Bioresource Technology*, **321**(124429).

Ziganshin, A. M., Liebetrau, J., Pröter, J. y Kleinsteuber, S. 2013. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**:5161-5174.