



**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

---

Casa abierta al tiempo

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ESTUDIO FISIOLÓGICO Y POBLACIONAL DE UN  
PROCESO MICROBIOLÓGICO METANOGENICO CON  
OXÍGENO PARA LA ELIMINACIÓN DE ACETATO DE  
VINILO**

TESIS

Para obtener el grado de:

**Doctor en Biotecnología**

PRESENTA:

**M. en B. Ulises Durán Hinojosa**

DIRECTORA:

**Dra. Florina Ramírez Vives**

MEXICO D.F.

JUNIO 2010

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales del Departamento de Biotecnología y en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

México D.F. a 25 de Junio del 2010

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Estudio Fisiológico y Poblacional de un Proceso Microbiológico  
Metanogénico con Oxígeno para la Eliminación de Acetato de Vinilo”**

Que presentó

**M. en B. Ulises Durán Hinojosa**

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesor: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesora: Dra. Beatriz Rendón Aguilar

H. Jurado:

Presidente: Dr. Jorge Gómez Hernández

Secretario: Dr. Oscar Monroy Herмосillo

Vocal: Dra. Suyén Rodríguez Pérez

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino



Handwritten signatures of the jury members on a lined background. The signatures are written in black ink and are positioned to the right of the corresponding names in the 'H. Jurado' section. The top signature is the most prominent, followed by a larger, more stylized signature, and then two smaller signatures at the bottom.

*"Tu, caballero, quien quiera que seas, que el temeroso lago estas mirando  
Si quieres alcanzar que debajo de estas aguas se encubre [...],  
Arrojate en mitad de su negro y encendido licor;  
Porque si así no lo haces, no serás digno de ver las altas maravillas que en sí encierran..."*

*Porque sin ti no hubiera podido lograr nada de esto,  
Te doy las gracias en nombre de toda la familia Hinojosa Alonso*

## **AGRADECIMIENTOS**

**Mis agradecimientos más sinceros a mí directora de tesis, Dra. Florina Ramírez Vives, por su apoyo incondicional durante más de siete años.**

**Al Dr. Jorge Gómez, por inculcarme siempre un pensamiento crítico y ser parte fundamental en la realización de esta tesis. Al Dr. Oscar Monroy por darse el tiempo para apoyarme y asesorarme. A la Dra. Mónica Meraz por abrirme las puertas del laboratorio de aguas y darme todas facilidades para la realización de esta tesis.**

**A los miembros del jurado por sus pertinentes y acertados comentarios para mejorar esta tesis. En especial, a la Dra. Suyén Rodríguez Pérez y al Dr. Francisco José Fernández Perrino.**

**A toda mi familia por haber creído en mí y apoyarme en cada momento de mi vida, aún aquellos que se encuentran lejos.**

**A Armando, Carmen, Luis, Alberto y Karla (La banda), por su amistad.**

**A todos mis compañeros de la Universidad (Ale, Misa, Juan, Rosalba, Pablo, Enrique, etc....) y del Laboratorio (Tocayo, Huizi, El Pache, Liz, La Monse, Juan, Chucho, Gilberto, etc...).**

---

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>PAG.</b>
	VI
<b>ABSTRACT</b>	VIII
<b>CAPÍTULO I</b>	
PANORAMA GENERAL	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Carbono	5
1.2. Digestión anaerobia	6
1.2.1. Metanogénesis acetoclástica	7
1.2.2. Metanogénesis hidrogenotrófica	8
1.2.3. Cinética de consumo de acetato en <i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i>	9
1.3. Compuestos químicos recalcitrantes	10
1.3.1. Acetato de vinilo	11
1.3.1.1. Propiedades del acetato de vinilo	11
1.3.1.2. Efectos nocivos del uso del acetato de vinilo	12
1.3.2. Eliminación biológica del acetato de vinilo	12
1.3.2.1. Eliminación del acetato de vinilo bajo condiciones aerobias	13
1.3.2.2. Eliminación del acetato de vinilo bajo condiciones metanogénicas	14
1.3.2.3. Posible ruta de eliminación del acetato de vinilo por metanogénesis con oxígeno	15
1.4. Efecto del oxígeno en lodos metanogénicos	16
1.5. Efecto del oxígeno en cultivos axénicos de arqueas metanogénicas	18
1.6. Sistemas anaerobios con bajas concentraciones de oxígeno	19
1.7. Dinámica poblacional de cultivos en continuo	21
2. REFERENCIAS	24
<b>CAPÍTULO II</b>	
1. JUSTIFICACIÓN	33
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo general	34
2.2. Objetivos Particulares	34
3. HIPÓTESIS	35

---

	<b>PAG.</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
1. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE ELIMINACIÓN DEL ACETATO DE VINILO POR LODOS METANOGÉNICOS: INFLUENCIA DEL ACETATO DE VINILO Y DEL ACETATO	39
1.1. Resumen	39
1.2. Antecedentes	40
1.3. Materiales y Métodos	43
1.4. Resultados y Discusión	44
1.5. Conclusiones	51
1.6. Referencias	51
2. METANOGÉNESIS Y MINERALIZACIÓN DEL ACETATO DE VINILO EN LODOS METANOGÉNICOS CON OXÍGENO	55
2.1. Resumen	55
2.2. Antecedentes	56
2.3. Materiales y Métodos	58
2.4. Resultados y Discusión	60
2.5. Conclusiones	69
2.6. Referencias	69
3. ANÁLISIS POBLACIONAL MEDIANTE DGGE DE LAS POBLACIONES ARQUEAS Y BACTERIAS EN DOS REACTORES EN CONTINUO	74
3.1. Resumen	74
3.2. Antecedentes	75
3.3. Materiales y Métodos	76
3.4. Resultados y Discusión	79
3.5. Conclusiones	85
3.6. Referencias	86
4. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	91
4.1. Conclusiones generales	91
4.2. Recomendaciones	92
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO I. Materiales	91
ANEXO II. Métodos analíticos	94
ANEXO III. Análisis de resultados	99
ANEXO IV. Ensayos	101
ANEXO V. Análisis molecular	102

---

---

# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PAG.</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Tabla 1.</b> Comparación fisiológica de los géneros <i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i> en el consumo de acetato.	10
<b>Tabla 2.</b> Propiedades físicas y químicas del acetato de vinilo (Mackay y col., 1995).	12
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de sistemas metanogénicos con bajas concentraciones de oxígeno disuelto (OD) para el tratamiento de compuestos químicos industriales.	20
<b>CAPÍTULO III</b>	
1. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE ELIMINACIÓN DEL ACETATO DE VINILO POR LODOS METANOGENICOS: INFLUENCIA DEL ACETATO DE VINILO Y DEL ACETATO	
<b>Tabla 1.1.</b> Velocidades de carga de carbono para los sustratos alimentados a reactor UASB.	43
<b>Tabla 1.2.</b> Balance de carbono de ensayos con lodos metanogénicos en presencia de diferentes concentraciones de AV.	47
2. METANOGENESIS Y MINERALIZACIÓN DEL ACETATO DE VINILO EN LODOS METANOGENICOS CON OXÍGENO	
<b>Tabla 2.1.</b> Velocidades de carga de carbono de AV (C-AV) y carbono de glucosa (C-G), alimentados a los reactores en continuo.	58
<b>Tabla 2.2.</b> Variables de respuesta: eficiencias de consumo (E), rendimientos de productos (Y), concentración de biomasa (SSV) y velocidades de formación de productos ( $r_p$ ) en reactores.	64
<b>Tabla 2.3.</b> Balance de masa de carbono en cultivos en lote con lodos metanogénicos con 1 mg OD L <sup>-1</sup> , en presencia y ausencia de azida sódica.	65
3. ANÁLISIS POBLACIONAL MEDIANTE DGGE DE LAS POBLACIONES ARQUEAS Y BACTERIAS EN DOS REACTORES EN CONTINUO	
<b>Tabla 3.1.</b> Secuencias de bandas del 16S rDNA de arqueas de dos reactores UASB.	82
<b>Tabla 3.2.</b> Secuencias de bandas del 16S rDNA de bacterias de dos reactores UASB.	85
<b>ANEXOS</b>	
<b>Tabla 1.</b> Composición del medio mineral base.	96
<b>Tabla 2.</b> Solución de elementos traza.	97
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de curva estándar de carbono orgánico total.	99
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de curvas estándar de compuestos volátiles.	100
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de curvas estándar de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .	102
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para PCR, con un volumen final de 50 µL.	107



# ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
<b>CAPITULO I</b>	
<b>Figura 1.</b> Ciclo biogeoquímico del carbono (Post y col., 1990).	6
<b>Figura 2.</b> Ciclo de reducción del CO <sub>2</sub> a CH <sub>4</sub> . (1) formil-MFR deshidrogenasa, (2) formal-MFR: H <sub>4</sub> MPT formiltransferasa, (3) 5,10 metenil- H <sub>4</sub> MPT ciclohidrolasa, (4) coenzima F <sub>420</sub> , (5) y (6) coenzima M y (7) metil-CoM reductasa.	8
<b>Figura 3.</b> Rutas de reducción del acetato a CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> . (1) Acetato quinasa, (2) fosfotransacetilasa en <i>Methanosarcina</i> . (3) acetil-CoA sintetasa en <i>Methanosaeta</i> , (4) anhidrasa carbónica e (5) Hidrogenasa.	9
<b>Figura 4.</b> Ruta aerobia de eliminación del AV por la bacteria V2. (1) Acetato de vinilo esterasa, (2, 3) aldehído deshidrogenasa y (4) alcohol deshidrogenasa (Nieder y col., 1990).	13
<b>Figura 5.</b> Ruta propuesta para la metanogénesis y mineralización del AV con lodos metanogénicos en presencia de oxígeno.	16
<b>Figura 6.</b> Modelo de gránulo formado por la adición de bajas concentraciones de oxígeno disuelto a lodos metanogénicos (Kato y col., 1997).	18
 <b>CAPÍTULO III</b>	
1. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE ELIMINACIÓN DEL ACETATO DE VINILO POR LODOS METANOGÉNICOS: INFLUENCIA DEL ACETATO DE VINILO Y DEL ACETATO	
<b>Figura 1.1.</b> Efecto de la velocidad de carga de AV en la eficiencia de consumo de COT (E <sub>COT</sub> , ◆) y en las velocidades de producción de metano (r <sub>CH<sub>4</sub></sub> , ▲) y acetato (r <sub>Ac</sub> , ○), en el reactor UASB.	47
<b>Figura 1.2.</b> Modelo de ajuste para el consumo de AV bajo condiciones metanogénicas.	48
<b>Figura 1.3.</b> Relación aparente entre las velocidades específicas de formación de metano (q <sub>CH<sub>4</sub></sub> , ●) y de acetato (q <sub>Ac</sub> , △) para diferentes concentraciones de AV.	49
<b>Figura 1.4.</b> Velocidad específica de producción de CH <sub>4</sub> (q <sub>CH<sub>4</sub></sub> ) como una función de la concentración de acetato, con lodo metanogénico del reactor antes (◆) y después (▲) de estar expuesto al AV.	50
2. METANOGÉNESIS Y MINERALIZACIÓN DEL ACETATO DE VINILO EN LODOS METANOGÉNICOS CON OXÍGENO	
<b>Figura 2.1.</b> Perfil de consumo de sustratos: AV y G. Perfil de formación de productos: CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , acetato (Ac) y acetaldehído (AcCHO). En reactores A (a y c) y B (b y d), respectivamente.	62
<b>Figura 2.2.</b> Velocidades de hidrólisis de AV (◇) y velocidades de formación de acetato (▲), CO <sub>2</sub> (×) y CH <sub>4</sub> (●), en cultivos en lote con lodos metanogénicos con 1.0 mg OD L <sup>-1</sup> . En presencia (a) y ausencia (b) de azida sódica.	66
<b>Figura 2.3.</b> Perfil respiratorio de AV con 1.0 mg OD L <sup>-1</sup> . (a, b) <i>B. agri</i> y (c, d) lodos metanogénicos, en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de azida sódica. AV (◇) Ac (▲) CH <sub>4</sub> (●), CO <sub>2</sub> (×) y acetaldehído (+).	67

---

	<b>PAG.</b>
<b>Figura 2.4.</b> Velocidades específicas de consumo de acetato de vinilo ( $q_{AV}$ ) y velocidades específicas de formación de acetato ( $q_{Ac}$ ), metano ( $q_{CH_4}$ ) y dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ). (a) <i>B. agri</i> y (b) lodos metanogénicos.	68
<b>Figura 2.5.</b> Ruta propuesta para la eliminación del AV en lodos metanogénicos, en presencia de oxígeno.	68
<b>3. ANÁLISIS POBLACIONAL MEDIANTE DGGE DE LAS POBLACIONES ARQUEAS Y BACTERIAS EN DOS REACTORES EN CONTINUO</b>	
<b>Figura 3.1.</b> Perfil de 16S rDNA-DGGE de arqueas de lodos de dos reactores UASB (izquierda) y Dendograma de 16S rDNA-DGGE utilizando el coeficiente de similitud de Dice y analizados por UPGMA (derecha).	80
<b>Figura 3.2.</b> Árbol filogenético de las secuencias de arqueas del rDNA 16S a partir de bandas de DGGE. Generado por el método de Neighbor-Joining.	81
<b>Figura 3.3.</b> Perfil de 16S rDNA-DGGE de bacterias de lodos de dos reactores UASB (izquierda) y Dendograma de 16S rDNA-DGGE utilizando el coeficiente de similitud de Dice y analizados por UPGMA (derecha).	83
<b>Figura 3.4.</b> Árbol filogenético de las secuencias del rDNA 16S de bacterias a partir de bandas de DGGE. Generado por el método de Neighbor-Joining.	84
 <b>ANEXOS</b>	
<b>Figura 1.</b> Diagrama de reactores en continuo.	95
<b>Figura 2.</b> Curva estándar de carbono orgánico total.	99
<b>Figura 3.</b> Curvas estándar de compuestos volátiles.	100
<b>Figura 4.</b> Curvas estándar de $CH_4$ y $CO_2$ .	101

---

## RESUMEN

El presente trabajo contribuye al estudio de los proceso de eliminación de acetato de vinilo bajo condiciones metanogénicas y metanogénesis en presencia oxígeno, aportando evidencias del efecto del acetato de vinilo en la metanogénesis; las interacciones entre la respuesta fisiológica dentro de un consorcio metanogénico en presencia de oxígeno y glucosa; así como la estructura molecular de las comunidades microbianas de arqueas y bacterias presentes en ambos cultivos, mediante separación de ADN por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE).

Dos reactores UASB (A y B), en presencia de acetato de vinilo (AV) y glucosa (G), uno operando en condiciones metanogénicas (reactor A) y otro alimentado con  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de oxígeno disuelto (reactor B). El reactor metanogénico mostró que al aumentar 150% en la velocidad de carga de AV, la  $E_{\text{COT}}$  disminuyó un 45%, por acumulación del 48% del carbono como acetato y la  $r_{\text{CH}_4}$  disminuyó un 49%, mostrando un efecto negativo aparentemente ligado con el aumento de la velocidad de carga de AV (2.5 veces). Sin embargo, la eficiencia de consumo de AV fue siempre del 100%, sugiriendo que los efectos negativos no están vinculados con el aumento en la velocidad de carga de AV, sino con la disminución en la velocidad a la que se consume del acetato y la modificación de la ruta metabólica. En el reactor que se alimentó con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , la eficiencia de eliminación se recuperó y el acetato acumulado se consumió, aún con el aumento de la velocidad de carga de AV. Esto debido a que el oxígeno aumentó la capacidad oxidativa de los lodos para metanizar y mineralizar este intermediario.

Mediante ensayos en lote bajo condiciones metanogénicas, se evaluó el papel del AV en el proceso respiratorio metanogénico y el efecto del AV en la metanogénesis acetoclástica. Estos ensayos mostraron una aparente relación entre la disminución en la velocidad específica de formación de  $\text{CH}_4$  y la velocidad específica de formación de acetato, por lo que bajo estas condiciones la formación de  $\text{CH}_4$  a partir de acetato es lenta, debido a la baja velocidad de consumo de este intermediario en el lodo; y que la exposición del lodo al AV, provocó una disminución del 69% en la velocidad máxima de consumo de acetato. Con los ensayos en

presencia de oxígeno, se evaluó el papel que tiene 1 mg OD L<sup>-1</sup> en la eliminación del AV y el proceso respiratorio de eliminación de 34 mg C L<sup>-1</sup> de AV, con un cultivo axénico de *B. agri* (Lara-Mayorga y col., 2010) y lodos metanogénicos. Estos cultivos dieron evidencia de que al estar presente el oxígeno la metanogénesis se vio favorecida y la mineralización de una fracción de AV fue llevada a cabo por una ruta aerobia.

El análisis molecular mediante DGGE de las poblaciones mostró que en las poblaciones de arqueas se lograron identificar dos poblaciones de arqueas metanogénicas acetoclásticas, *Methanosarcina barkeri* que estuvo presente en ambos reactores en todas las condiciones de operación evaluadas, y *Methanosaeta concilli* que desapareció en ambos reactores al aumentar la velocidad de carga de AV. Las poblaciones de bacterias desaparecieron en su mayoría cuando ambos reactores fueron alimentados con AV, y cuando el reactor B fue alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> se observó la aparición de nuevas bandas, identificadas como bacterias aerobias, destacando la presencia de *Brevibacillus agri* que está reportada como una bacteria aerobia que participa en la eliminación del AV en lodos metanogénicos en presencia de oxígeno.

---

## ABSTRACT

This work contribute to the study of the vinyl acetate removal process under methanogenic conditions and methanogenesis in presence of oxygen, showing evidence of the vinyl acetate effect in the methanogenesis, the interactions between the physiological response in a methanogenic consortium in presence of oxygen and glucose, as well as the molecular structure of microbial communities of archaea and bacteria in the continuous cultures by DGGE.

Two UASB reactors (A and B) in presence of vinyl acetate (VA) and glucose (G), one operating in methanogenic conditions (reactor A) and fed with  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  of dissolved oxygen (reactor B). The methanogenic reactor showed that 150% increase in AV loading rate, the  $E_{\text{COT}}$  and  $r_{\text{CH}_4}$  decreased 45 and 49% respectively, because the accumulation of carbon as acetate, showing an apparently negative effect when the AV loading rate increased (2.5 times). However, the VA consumption efficiency was always 100%, suggesting that the negative effect is not related to the increase in VA loading rate, but with the decrease in the acetate consumption rate and the modification of the metabolic pathway. The reactor was fed with  $1 \text{ mg DO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , the removal efficiency recovered and accumulated acetate was consumed, even with a higher VA loading rate. In this reactor the oxygen increased the oxidative capacity of the sludge for the metanization and mineralization of this intermediate.

Batch cultures under methanogenic conditions were utilized for evaluate the VA role in the methanogenesis and the VA effect in acetoclastic methanogenesis. These tests showed an apparent relationship between the decrease in specific methane formation rate and the specific acetate formation rate, because under these conditions the methane formation from acetate is slow, due to the low consumption rate of this intermediate in the sludge that was exposed to VA, and also caused a decrease of 69% in the maximum acetate consumption rate. The batch cultures in presence of oxygen was evaluated the role of  $1 \text{ mg DO L}^{-1}$  in the VA elimination of  $34 \text{ mg C L}^{-1}$  of VA with an axenic culture of *B. agri* (Lara-Mayorga *et al.*, 2010) and methanogenic sludges. These cultures showed evidence that the oxygen stimulated the methanogenesis and the mineralization of a VA fraction by aerobic pathway.

The molecular analysis by DGGE of the communities, showed that populations of archaea were able to identify two populations of acetoclastic methanogenic archaea, *Methanosarcina barkeri* was present in both reactors for all operating conditions tested, and *Methanosaeta concilli* who disappeared in both reactors with the higher VA loading rate. Bacterial populations largely disappeared when both reactors were fed with VA, and when the reactor B was fed with 1 mg DO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> was observed the appearance of new bands, identified as aerobic bacteria, highlighting the presence of *Brevibacillus agri* is reported as an aerobic bacteria involved in the VA elimination in methanogenic sludges in the presence of oxygen.

# CAPITULO I





## **PANORAMA GENERAL**

El desarrollo de la humanidad se ha caracterizado por la búsqueda constante de mejores niveles de vida, normalmente a través de formas de producción industrializadas, sin embargo dichos logros se han visto opacados por el deterioro y los perjuicios graduales que causan al ambiente. El problema de deterioro ambiental ha adquirido en los últimos años gran importancia, no sólo por la conciencia que se ha creado entre la población, sino por la necesidad de resguardar la vida y el entorno humano para las siguientes generaciones. Problemas como la destrucción de la capa de ozono, los cambios climáticos, la lluvia ácida, la pérdida de la biodiversidad, el sobrecalentamiento de la tierra, el destino de los residuos tóxicos, los derrames de petróleo y la escasez de agua no están encerrados en las fronteras de cada país, sino que afectan a todo el planeta y requieren de un marco de acción global.

Los procesos de conservación ambiental por un lado, y la creciente necesidad de modelos de desarrollo acelerados, han sido cuestionamientos opuestos a lo largo del desarrollo de nuestra historia, planteándose un serio dilema entre crecimiento económico y preservación ambiental. Toda esta problemática que se ha planteado no es excluyente para ningún país, y mucho menos para México, en donde los procesos de contaminación son realmente alarmantes, las regulaciones son muy pobres y la conciencia cívica, política y social al parecer son casi, al parecer, inexistentes.

Aunque en nuestro país los procesos de inversión, investigación, capacitación y desarrollo en materia ambiental no se han dado en forma cuantiosa, últimamente se han incrementado. Esto es en parte a la conciencia cívica y empresarial que se ha desarrollado, y en parte a la creciente regulación y exhortación por parte de los gobiernos, no sólo locales sino extranjeros, involucrados en los procesos de globalización e internacionalización. En México, en los últimos años, se han presentado casos y situaciones interesantes en materia de cuidado y protección ambiental. Algunas de estas acciones no sólo coadyuvan a mantener un ambiente sano y equilibrado, sino que en muchos de los casos, han propiciado la obtención de altas ganancias debidas al reciclaje y el tratamiento de desechos.

---

Las aguas residuales industriales representan, sin embargo, uno de los mayores problemas de contaminación. Las cuatro principales industrias contaminantes en México son: celulosa, papel, textil y química, las cuales afectan principalmente a bosques, aire y agua (CONAGUA, 2009).

El agua es un recurso natural fundamental y resulta indispensable para el desarrollo de la vida, ya que constituye del 50 al 90% de la masa de los organismos vivos (Neil y col., 2006). Es considerado un recurso renovable, sin embargo las actividades humanas han provocado la aparición de factores o agentes que causan su contaminación, como los agentes patógenos, desechos que requieren oxígeno, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas.

La naturaleza a través del ciclo del agua, trabaja para limpiarla, sin embargo no tiene la capacidad suficiente para eliminar todas las sustancias y contaminantes que se vierten en ella. Para evitar las consecuencias del uso del agua contaminada se han ideado mecanismos de control temprano de la contaminación. Existen normas que establecen los rangos permisibles de contaminación y que buscan asegurar que el agua que se utiliza no sea dañina. A pesar del control y prevención que se persigue en muchos países, la contaminación de las industrias ha provocado que la provisión de agua dulce disminuya, que haya un aumento en las enfermedades por aguas contaminadas y que un 20% de todas las especies acuáticas estén extintas o en peligro de desaparecer (Asano, 1996; Rail, 2000).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Carbono

Los compuestos orgánicos son todas aquellas especies químicas que en su composición contienen los elementos carbono e hidrógeno (Frieden, 1972). Aunque la clasificación no es rigurosa, algunos compuestos inorgánicos también están formados por carbono. El carbono y sus compuestos se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza. Todas las plantas y animales vivos están formados de compuestos orgánicos complejos en donde el carbono está combinado con hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y otros elementos.

Mediante el ciclo biogeoquímico del carbono, los compuestos carbonados se intercambian entre biósfera, litósfera, hidrósfera y atmósfera de la tierra (Figura 1). Este ciclo puede ser dividido en dos: el ciclo lento o geológico y el ciclo rápido o biológico. Los conocimientos sobre esta circulación de carbono posibilitan apreciar la intervención humana en el clima y sus efectos sobre el cambio climático. Desde el punto de vista biológico, los eventos claves del ciclo del carbono son la fotosíntesis y la respiración microbiana, como reacciones complementarias. Los procesos mediante los cuales se obtiene energía pueden ser la respiración aerobia o la respiración anaerobia. La respiración aerobia, con el oxígeno como aceptor de electrones, utiliza moléculas de carbono con la finalidad de producir  $\text{CO}_2$ , agua y energía en forma de ATP. La respiración anóxica utiliza diferentes aceptores de electrones como: nitrato, sulfato,  $\text{CO}_2$ , entre otros. con la finalidad de producir compuestos reducidos de nitrógeno, azufre, carbono, etc. y energía en forma de ATP. Ejemplo de esta última es la digestión anaerobia.

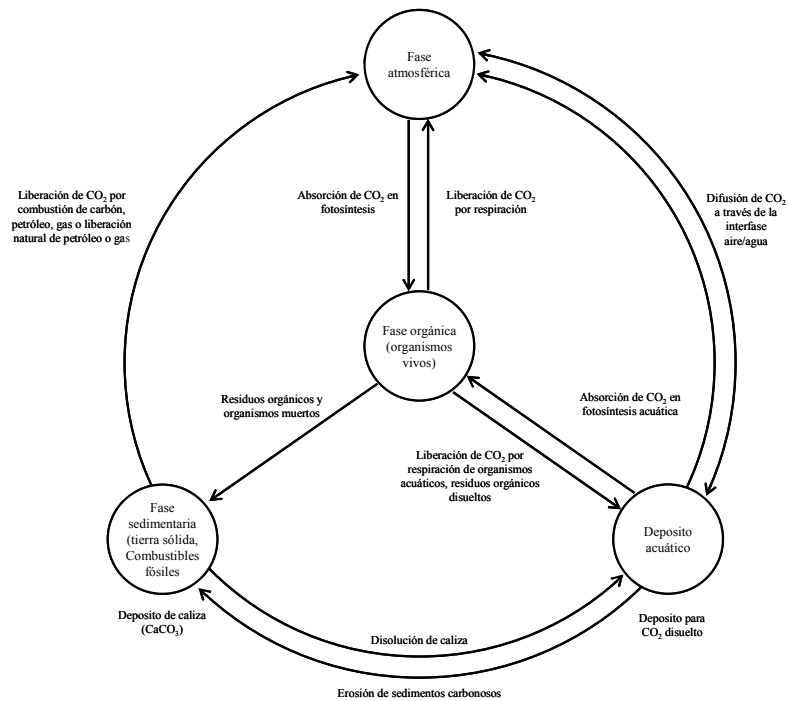


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del carbono (Post y col., 1990).

## 1.2. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso microbiano multietapas mediado por grupos de microorganismos funcionalmente diversos: hidrolíticos, fermentativos, oxidantes de ácidos grasos volátiles (AGV), acetogénicos y metanogénicos. La metanogénesis es la última etapa dentro de la digestión anaerobia y es el proceso anaerobio mediante el cual se obtiene energía a partir de la reducción de carbono. Esta etapa es de gran importancia ecológica, ya que interviene en la conversión química de la materia orgánica en la naturaleza y en el ciclo del carbono.

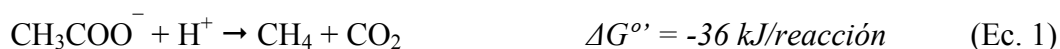
Las arqueas metanogénicas son microorganismos procariontes, que viven en ambientes anaerobios y que obtienen energía mediante la producción de CH<sub>4</sub>, ya que utilizan los equivalentes de electrón para llevar el carbono hasta su estado de oxidación más reducido. Las arqueas metanogénicas son un grupo filogenéticamente heterogéneo en donde el factor común que las une es la producción de gas metano y sus cofactores únicos (Deppenmeier y col., 1996). En dicho grupo la función del proceso metabólico es la obtención de energía en forma de ATP y de moléculas destinadas para la biosíntesis. Generalmente esta reacción se realiza a

partir de acetato o de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrógeno (H<sub>2</sub>), donde el acetato y el CO<sub>2</sub> son los aceptores de electrones que son reducidos hasta CH<sub>4</sub> (Speece, 1996).

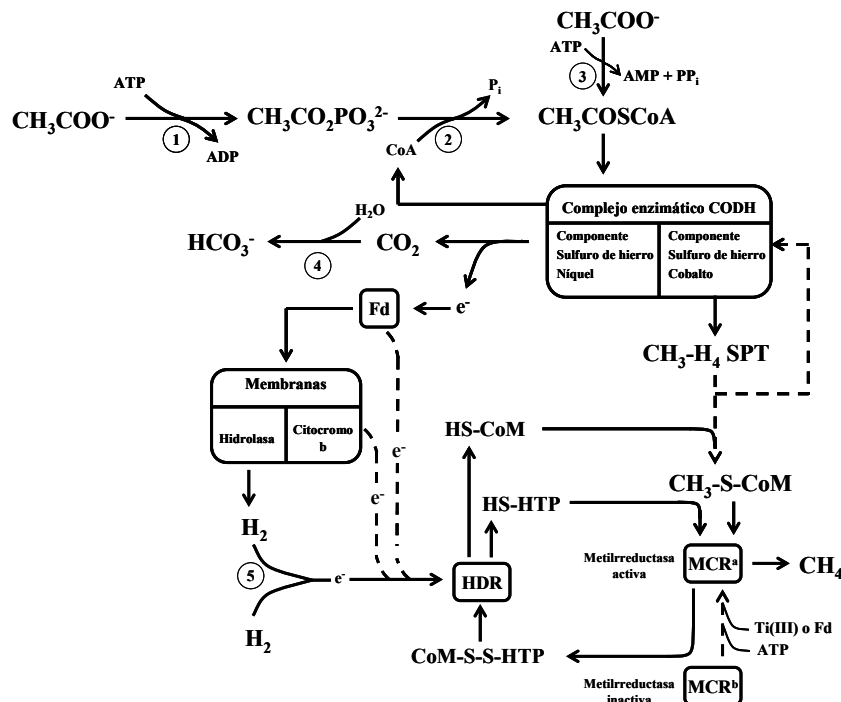
En la metanogénesis, las rutas metabólicas son únicas porque requieren de ciertas enzimas y coenzimas que sólo producen las arqueas metanogénicas (Blaut, 1994, García y col., 2000). Éstas se dividen en dos tipos, el primero contiene a los portadores C1 que transportan los átomos de carbono desde el sustrato inicial hasta el CH<sub>4</sub>; entre éstos encontramos al metanofurano, la tetrahidrometanopterinina y la coenzima M (CoM). El otro tipo son las coenzimas redox que suministran los electrones para la reducción de acetato o CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> y que intervienen en las diferentes etapas de la metanogénesis; el Factor 420 (F<sub>420</sub>), la 7-mercaptoheptanoil-treonina fosfato o coenzima B, el complejo enzimático metil-reductasa y la coenzima F<sub>430</sub> (Rouvière y Wolf, 1968; Parés y Juárez, 1997).

### 1.2.1. Metanogénesis acetoclástica

Cuando el aceptor de electrones es el acetato, la vía mediante la cual se produce CH<sub>4</sub> es la metanogénesis acetoclástica (Ec. 1).



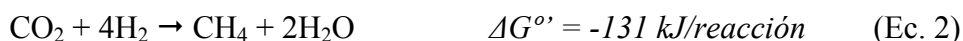
En esta vía, inicialmente el acetato es activado a acetyl-CoA por dos rutas diferentes (Deppenmeier y col., 1996), seguido de un rompimiento de los enlaces carbono-carbono y carbono-sulfuro que es catalizado por el complejo enzimático monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH). Posteriormente, el componente níquel/sulfuro de hierro del complejo, lleva a cabo la oxidación del grupo carbonilo hasta CO<sub>2</sub>, reduciendo una ferredoxina (Fd). Mientras, el grupo metilo es transferido al componente cobalto/sulfuro de hierro y posteriormente a la coenzima M, formando CH<sub>3</sub>-S-CoM que es dimetilado produciendo CH<sub>4</sub>. Este último paso es catalizado por una metil reductasa (MCR) y los electrones utilizados son derivados de átomos de sulfuro de CH<sub>3</sub>-S-CoM y HS-HTP con la formación de CoM-S-S-HTP (Figura 2).



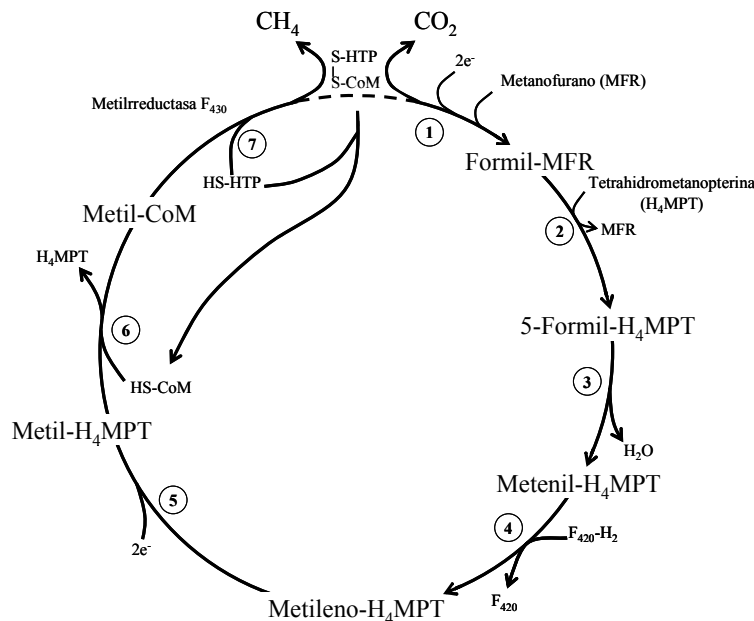
**Figura 2.** Rutas de reducción del acetato a  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . (1) Acetato quinasa, (2) fosfotransacetilasa en *Methanosarcina*. (3) acetil-CoA sintetasa en *Methanosaeta*, (4) anhidrasa carbónica e (5) Hidrogenasa.

### 1.2.2. Metanogénesis hidrogenotrófica

Cuando el aceptor de electrones es el  $\text{CO}_2$ , se requiere al hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ), formiato, metanol, metilaminas, etanol o propanol como donadores de electrones (Ferry, 1992a) y la vía mediante la cual se produce  $\text{CH}_4$  es la metanogénesis hidrogenotrófica (Ec. 2).



La Figura 3 muestra que mediante la metanogénesis hidrogenotrófica, inicialmente se da la activación del  $\text{CO}_2$  a N-formilmetanofurano, que a su vez es transferido a una enzima que contiene metanopterina. Posteriormente este intermediario es deshidratado formando metileno y dando un grupo metilo. Este grupo metilo es transferido de la metanopterina a la CoM, y mediante una última reacción (catalizada por la metil reductasa), el metil-CoM es reducido a  $\text{CH}_4$  (Jones y col., 1987).



**Figura 3.** Ciclo de reducción del  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ . (1) formil-MFR deshidrogenasa, (2) formal-MFR:  $\text{H}_4\text{MPT}$  formiltransferasa, (3) 5,10 metenil-  $\text{H}_4\text{MPT}$  ciclohidrolasa, (4) coenzima  $\text{F}_{420}$ , (5) y (6) coenzima M y (7) metil-CoM reductasa.

Una diferencia notable desde el punto de vista fisiológico, entre estas dos rutas es que la metanogénesis acetoclástica es menos lucrativa en términos energéticos que la metanogénesis hidrogenotrófica, aún cuando ambos procesos respiratorios son desasimilativos. Se ha demostrado que el acetato es utilizado principalmente para la formación de  $\text{CH}_4$  (Ferry, 1992b), mientras que la utilización de compuestos con un solo carbono es una vía más favorable desde el punto de vista energético para la biosíntesis (Thauer, 1998).

### 1.2.3. Cinética de consumo de acetato en *Methanosarcina* y *Methanosaeta*

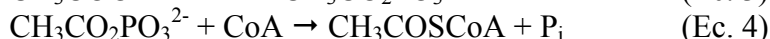
Desde el punto de vista cinético, la velocidad de consumo de acetato en lodos metanogénicos pudiera estar relacionada con el género microbiano presente en el inóculo. Los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* son los más frecuentes consumidores de acetato, sin embargo estos géneros presentan algunas diferencias fisiológicas (Conrad, 1999; Schmidt y Ahring, 1999). Zinder (1993) menciona que las principales diferencias entre estos géneros son la baja afinidad por el acetato del género *Methanosarcina* y la exclusividad en el consumo de acetato por el género *Methanosaeta* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación fisiológica de los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* en el consumo de acetato.

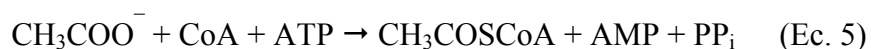
Microorganismo	$K_s$ (mg L <sup>-1</sup> )	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Referencia
<i>Methanosarcina</i> spp.	300	0.03	Grotenhuis y col. (1991)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	460	0.03	Lokshina y col. (2001)
<i>Methanosarcina mazei</i>	216	0.06	Schmidt y Ahring (1999)
<i>Methanosaeta concilii</i>	90	0.02	Schmidt y Ahring (1999)
<i>Methanosaeta soehngenii</i>	42	0.01	Oude Elferink y col. (1998a)
<i>Methanosaeta</i> spp.	72	0.02	Oude Elferink y col. (1998a)

$K_s$ , Constante de afinidad;  $\mu_{max}$ , Velocidad específica de crecimiento

Hay evidencias de que el crecimiento y actividad metabólica del género *Methanosaeta* en lodos metanogénicos se ve favorecido con bajas concentraciones de acetato, mientras que la presencia del género *Methanosarcina* se da con concentraciones altas (Peng y col., 2008). Posiblemente la afinidad por el acetato se debe a que los mecanismos de activación en estos géneros son diferentes (Figura 3). Clarens y Molleta (1990) y Ferry (1992a) mencionan que el género *Methanosarcina* usa las enzimas acetato quinasa y la fosfotransacetilasa para activar el acetato (Ec. 3 y 4).



Sin embargo, Smith e Ingram-Smith (2007) observaron que en el género *Methanosaeta* la activación del acetato es catalizada solo por la acetil-CoA sintetasa (Ec. 5).



### 1.3. Compuestos químicos recalcitrantes

Desde un punto de vista biológico y evolutivo la aparición de nuevos compuestos con una extraordinaria estabilidad, o la movilización a formas bioactivas de los ya existentes, plantea el problema de su integración en los ciclos naturales de regeneración de los elementos, mediados por distintos tipos de microorganismos. La fisiología y el metabolismo microbiano son actualmente herramientas fundamentales de la biotecnología ambiental, ya que las rutas de degradación aerobia y anaerobia de numerosos contaminantes ambientales son conocidas en gran detalle. Esto permite el estudio metabólico con cepas específicas y la creación de nichos ecológicos que permiten la degradación de compuestos químicos recalcitrantes.



Un ejemplo de este tipo de compuestos son los utilizados para la elaboración de resinas poliméricas, entre los que destaca el acetato de vinilo. Estos compuestos se han utilizado indiscriminadamente y sin evaluar los futuros riesgos para la salud y su potencial contaminante.

### 1.3.1. Acetato de vinilo

Es un compuesto químico versátil con una gran importancia económica por la amplia variedad de sus aplicaciones industriales y comerciales. Por ello es considerado uno de los compuestos químicos más utilizado a nivel mundial (3.2 millones de toneladas al año). El monómero de acetato de vinilo (AV,  $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$ ) es utilizado para la fabricación de una amplia variedad de polímeros sintéticos, incluyendo acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, polivinil acetales, copolímeros de etileno y acetato de vinilo, alcohol vinílico de etileno, etc. Estos polímeros son utilizados en la elaboración de productos industriales y de consumo tales como:

- Plásticos
- Lacas
- Elastómeros
- Emulsiones a base de agua (pinturas)
- Acabados y materiales de impregnación
- Pisos de baldosas
- Fibras acrílicas
- Películas
- Diferentes tipos de adhesivos
- Tintas
- Revestimientos de papel
- Vidrios de seguridad
- Pegamentos
- Textiles

El uso exacerbado del acetato de vinilo ha provocando serios problemas de contaminación en suelo, aire y cuerpos de agua naturales (ATSDR, 2008). Debido a su extendido empleo es frecuente su presencia en las aguas residuales, principalmente de la industria de resinas poliméricas.

#### 1.3.1.1. Propiedades del acetato de vinilo

El AV es un éster de vinilo del ácido acético, transparente e incoloro, con un aroma dulce a frutas y sumamente inflamable. El vapor del acetato de vinilo es más denso que el aire, se puede polimerizar fácilmente por el calentamiento suave o bajo la influencia de luz o de

peróxidos y reacciona violentamente con oxidantes fuertes (ATSDR, 2008). La Tabla 2 presenta sus principales propiedades físicas y químicas.

**Tabla 2.** Propiedades físicas y químicas del acetato de vinilo (Mackay y col., 1995).

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Solubilidad en agua	25 g L <sup>-1</sup> @ 20°C
Peso molecular	86.09 g mol <sup>-1</sup>
Temperatura crítica	246 °C
Presión crítica	39 atm
Punto de ebullición	72.7 °C
Punto de fusión	-92.8 °C
Calor de formación	-495 kcal mol <sup>-1</sup>
Gravedad específica	0.934 g mL <sup>-1</sup>
Viscosidad	0.43 cps

### **1.3.1.2. Efectos nocivos del uso del acetato de vinilo**

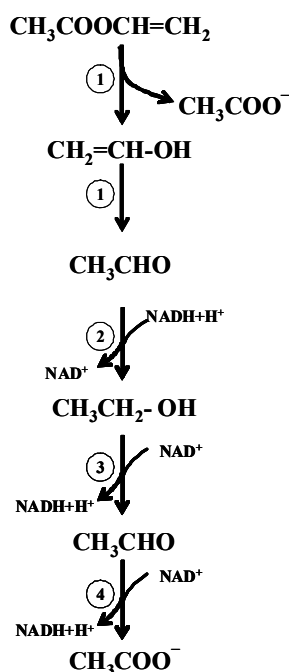
Como ocurre con todas las sustancias químicas, los efectos en la salud asociados a la exposición al AV dependen del nivel de exposición y de la duración. En humanos, los vapores del acetato de vinilo causan irritación en los ojos, enrojecimiento, dolor y quemaduras leves en la piel en contacto directo con la sustancia; además forma ampollas y causa irritación del tracto respiratorio. El umbral de detección del olor está reportado alrededor de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y la concentración por evaporación a 20 °C que resulta ser nociva en el aire es de 21 mg L<sup>-1</sup>. Al ser inhalado provoca tos, jadeo y dolor de garganta; puede afectar a los pulmones, dando lugar a lesiones del tejido. En caso de ingesta se presentan síntomas como somnolencia y dolor de cabeza. Los efectos debidos a la exposición aguda en animales pueden ser la formación de edemas pulmonares y tumores cancerígenos, así como mutaciones genéticas en tracto respiratorio y digestivo (Owen, 1988). Este compuesto se considera altamente tóxico para los organismos acuáticos, ya que en concentraciones mayores a 100 mg L<sup>-1</sup> puede llegar a ser letal (Prager, 1998).

### **1.3.2. Eliminación biológica del acetato de vinilo**

Hay evidencias de que el AV puede ser eliminado biológicamente, ya sea por vía aerobia o vía anaerobia bajo condiciones metanogénicas (Prince y col., 1974; Chou y col., 1979). Aunque se ha reportado que bajo condiciones aerobias la velocidad de eliminación del AV es mayor, sin embargo la alta volatilidad del compuesto hace difícil su eliminación bajo estas condiciones.

### 1.3.2.1. Eliminación del acetato de vinilo bajo condiciones aerobias

Nieder y col. (1990) estudiaron la eliminación microbiológica bajo condiciones aerobias del acetato de vinilo, con tres diferentes inóculos (suelo, lodos y sedimentos), evidenciando que sólo fue posible la hidrólisis a una velocidad de  $550 \text{ mg g}^{-1} \text{ peso seco h}^{-1}$ . Estos mismos autores dieron indicios de la ruta de degradación del acetato de vinilo con un cultivo axénico (bacteria V2) aislado de sedimentos, con AV como única fuente de carbono. En la Figura 4 se muestra que inicialmente el acetato de vinilo es hidrolizado a acetato y alcohol vinílico, éste último es oxidado a acetaldehído, el acetaldehído es posteriormente reducido a etanol, nuevamente el etanol es oxidado a acetaldehído y, finalmente, éste es oxidado a acetato.



**Figura 4.** Ruta aerobia de eliminación del AV por la bacteria V2. (1) Acetato de vinilo esterasa, (2, 3) aldehído deshidrogenasa y (4) alcohol deshidrogenasa (Nieder y col., 1990).

Con base en esta ruta, es posible la formación de dos moles de acetato por mol de acetato de vinilo. Las reacciones de hidrólisis y oxidación del acetato de vinilo a acetato (Ec. 6) están acopladas a la reducción de  $\text{NAD}^+$ .



En un tratamiento biológico aerobio *in situ* para la eliminación de 12,000 galones de acetato de vinilo de un suelo contaminado, se observó que es posible la recuperación de etanol y acetato como productos de la hidrólisis del acetato de vinilo. De 22,000 mg kg<sup>-1</sup> de acetato y 3000 mg kg<sup>-1</sup> de acetaldehído que se encontraban al inicio se logró reducirlos a 2.5 mg kg<sup>-1</sup> y 15 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Flathman y col., 1996).

### **1.3.2.2. Eliminación del acetato de vinilo bajo condiciones metanogénicas**

En general se considera que el AV en altas concentraciones es un inhibidor de la metanogénesis. Chou y col. (1979) estudiaron la eliminación del AV bajo condiciones metanogénicas en cultivos en lote, dando evidencias de que en un intervalo de concentraciones de 40 a 1600 mg L<sup>-1</sup> el AV fue consumido al 100% y con una alta velocidad, pero con la más alta concentración (1600 mg L<sup>-1</sup>) éste solo fue hidrolizado formando acetato, acetaldehído y etanol, sin la formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Stuckey y col. (1980) obtuvieron resultados similares al evaluar la eliminación del AV en cultivos en lote y semicontinuos. Los cultivos en lote mostraron que con concentraciones entre 200 y 400 mg L<sup>-1</sup>, no hubo disminución significativa en la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> y se evidenció que por cada mol de AV se produjeron 2.25 moles de CH<sub>4</sub> y 1.75 moles de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, en el bioensayo semicontinuo con 1000 mg L<sup>-1</sup> de AV, hubo una disminución del 50% de la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> y el AV se acumuló como acetato. Nieder y col. (1990) aportaron algunas evidencias del efecto de 1700mg L<sup>-1</sup> de AV en lodos metanogénicos, observando que al ser hidrolizado a acetato a una velocidad de 2 g g<sup>-1</sup> SSV d<sup>-1</sup>, no hubo actividad de las enzimas acetato quinasa y fosfotransacetilasa, dos enzimas clave en la metanogénesis del acetato (Frimmer y Widdel, 1989; Schnürer y col., 1996; Schink, 1997), debido a que la formación de acetato (que es catalizada por la alcohol deshidrogenasa) está asociada con la fosforilación a nivel de sustrato.

Las aguas residuales generadas durante la elaboración de resinas poliméricas que contienen AV, han sido tratadas anteriormente mediante procesos metanogénicos. Sin embargo, los reactores UASB presentaron una disminución de 42% en la velocidad específica de formación de metano al ser alimentados con velocidades de carga de 1250 y 2020 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV (Dangcong y Xingwen, 1994; Araya y col., 1999 y 2000). Durán y col. (2008) evidenciaron

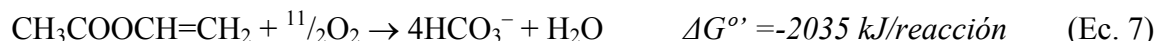
que al aumentar un 35% la velocidad de carga de AV (de 58 a 80 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) las velocidades de producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disminuyeron alrededor del 60%. En cultivos en lote, los mismos autores mostraron que es posible la eliminación de 41 mg L<sup>-1</sup> de AV hasta CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, pero si se utilizan concentraciones superiores, no hay formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

Estos resultados, en general, muestran las limitaciones en el tratamiento de aguas residuales con AV bajo condiciones metanogénicas y sólo sugieren que el AV en altas concentraciones inhibe la metanogénesis. Sin embargo, no se muestran evidencias suficientes sobre el efecto de este compuesto en la metanogénesis, las posibles consecuencias que tendría la afinidad del inóculo por el sustrato y el estudio fisiológico de la ruta mediante la cual se elimina este compuesto.

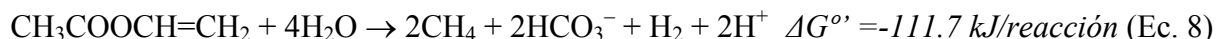
### 1.3.2.3. Posible ruta de eliminación del acetato de vinilo por metanogénesis con oxígeno

El análisis cinético de las reacciones de oxidación aerobia (Ec.7) y metanogénesis (Ec.8), muestran que la primera es más factible y estable, ya que su energía libre de Gibbs es mucho mayor.

Oxidación aerobia del AV:



Metanogénesis del AV:

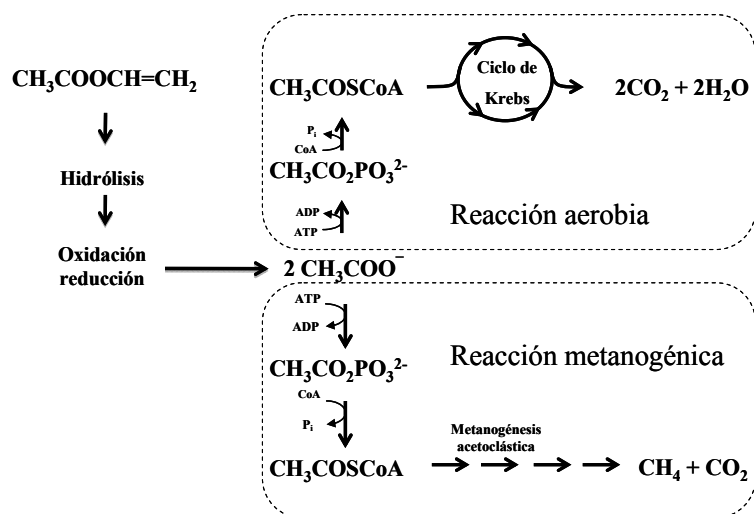


Hay evidencias que sugieren que bajo condiciones aerobias la velocidad de eliminación de AV es diez veces mayor, al compararla con la eliminación bajo condiciones metanogénicas (Nieder y col., 1990). No obstante, la alta volatilidad del compuesto (63% en 24 horas) es la principal limitante para su eliminación bajo estas condiciones. Sin embargo, la adición de bajas concentraciones de oxígeno en sistemas anaerobios puede promover la mineralización y la metanogénesis del AV (Ec. 9) que desde el punto de vista cinético es más estable.

Mineralización y metanogénesis del AV:



La ruta de eliminación de AV en los lodos metanogénicos en presencia de oxígeno (Figura 5), requiere de una hidrólisis inicial del AV y reacciones de oxidación y reducción sucesivas para dar lugar a la formación de dos moléculas de acetato, que pueden ser consumidas vía metanogénesis acetoclástica o pueden ser mineralizadas vía ciclo de Krebs.



**Figura 5.** Ruta propuesta para la metanogénesis y mineralización del AV con lodos metanogénicos en presencia de oxígeno.

#### 1.4. Efecto del oxígeno en lodos metanogénicos

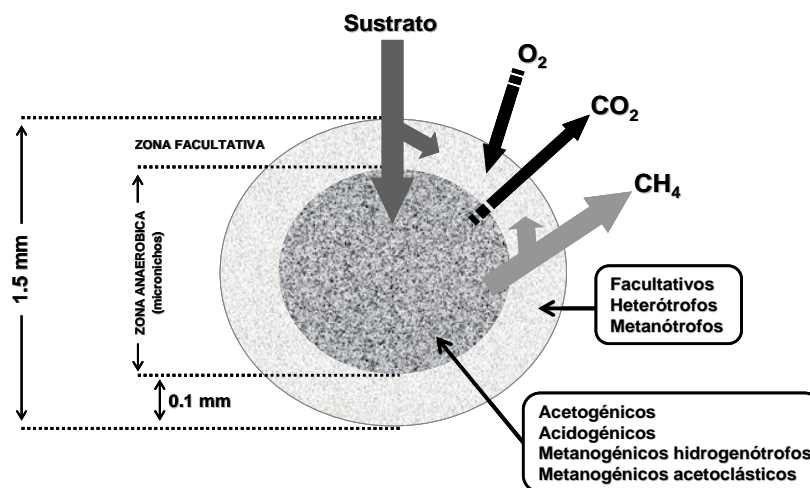
A pesar de las ventajas que se han atribuido a los procesos metanogénicos para el tratamiento de aguas residuales industriales que contienen compuestos tóxicos o recalcitrantes, aún no se ha evaluado a detalle los posibles efectos del oxígeno disuelto sobre el rendimiento y estabilidad de estos sistemas. Se cree que en este tipo de sistemas la producción de  $\text{CH}_4$  se ve inhibida por la presencia de oxígeno, el cual puede estar presente en efluentes con baja concentración. Este efecto puede justificarse porque el oxígeno es presuntamente un compuesto tóxico para las arqueas metanogénicas, que son consideradas anaerobias estrictas, dada la falta de la enzima catalasa (Whitman y col., 1992; Lowe y col., 1993; García y col., 2000). Sin embargo, hay evidencias que sugieren que los gránulos anaerobios dada su estructura pueden tolerar bajas concentraciones de oxígeno disuelto (menores que  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Una posible explicación a tal tolerancia de los lodos metanogénicos podría consistir en que los microorganismos facultativos o aerobios presentes en el gránulo consuman los sustratos con mayor velocidad, generando un alto poder reductor para que posteriormente las arqueas metanogénicas consuman los compuestos intermediarios. Estrada-Vázquez y col. (2003) estudiaron la tolerancia al oxígeno sobre la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> de lodos anaerobios suspendidos, en presencia y ausencia de un sustrato primario (sacarosa). El lodo incubado con 17.5 g L<sup>-1</sup> sacarosa y expuesto a una demanda de oxígeno del 20% (3 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto), mostró una alta resistencia al efecto tóxico del oxígeno y una disminución en la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> del 50%. Cuando el lodo fue incubado sin fuente de carbono bajo las mismas condiciones, la tolerancia al oxígeno disminuyó. Ergüder y Demirer (2005) estudiaron el efecto de dos concentraciones de oxígeno disuelto (0.5 y 3.3 mg L<sup>-1</sup>) en la granulación de lodos metanogénicos en cultivos semicontinuos. Las pruebas se realizaron a una velocidad de carga de 500 mgCOD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> utilizando etanol, glucosa y acetato como sustratos, con 7.6 g L<sup>-1</sup> de sólidos suspendidos de licor mezclado y 3.2 g L<sup>-1</sup> de sólidos suspendidos volátiles de licor mezclado. Los resultados mostraron que con 3.3 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto y utilizando etanol como fuente de carbono, se promovió la formación en el inóculo de gránulos estables y de mayor tamaño (2-2.25 mm), por los procesos simultáneos de consumo de oxígeno y metanogénesis.

Otra posible explicación para la resistencia al oxígeno es que los gránulos son un protector físico frente al oxígeno, debido a los gradientes de difusión en los agregados de la biomasa. Shen y Guiot (1996) estudiaron el efecto de la adición de diferentes concentraciones de O<sub>2</sub> disuelto (de 0.5 a 8.1 mg L<sup>-1</sup>) a lodos de reactores UASB de 1 y 5 L, utilizando un medio con 75% de sacarosa y 25% de acetato como fuentes de carbono. En los primeros 90 días, con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto, no hubo cambios significativos en la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> y se evidenció la formación de biocapas formadas por microorganismos facultativos y aerobios en los gránulos, los cuales posiblemente mineralizaron más de un 30% del carbono.

Kato y col. (1997) estudiaron mediante cultivos en lote el efecto del oxígeno en lodos granulares metanogénicos recolectados de reactores UASB y EGSB. Los resultados obtenidos

revelaron la alta tolerancia al oxígeno en los lodos granulares metanogénicos, ya que la demanda de oxígeno que causó un 50% de disminución en la velocidad específica de formación de  $\text{CH}_4$  fue del 41% (correspondiente a  $6 \text{ mg L}^{-1}$  de oxígeno disuelto). Al evaluar parámetros como el tamaño de gránulo, la velocidad de respiración de las bacterias facultativas, el régimen de agitación y el tipo de sustrato, se evidenció que la velocidad de respiración de las bacterias facultativas fue el mecanismo de tolerancia al oxígeno, posiblemente porque las bacterias facultativas consumen rápidamente el oxígeno disuelto, creando micronichos anaerobios hacia dentro del gránulo que protegen a las arqueas metanogénicas (Figura 6).



**Figura 6.** Modelo de gránulo formado por la adición de bajas concentraciones de oxígeno disuelto a lodos metanogénicos (Kato y col., 1997).

### 1.5. Efecto del oxígeno en cultivos axénicos de arqueas metanogénicas

Fetzer y col. (1993) estudiaron el efecto de la exposición de cultivos axénicos de *Methanosarcina barkeri* y dos nuevas cepas de los géneros *Methanosarcina* y *Methanobacterium* aisladas de campos de arroz con células en suspensión ( $0.27 \text{ mg proteína mL}^{-1}$ ) en presencia de una corriente de aire de  $3.5 \text{ L min}^{-1}$  ( $1.5 \text{ mg de O}_2 \text{ L}^{-1}$ ). Se observó que la velocidad específica de formación de  $\text{CH}_4$  disminuyó un 75% después de 200 días de exposición, pero no afectó la viabilidad celular de estos cultivos. La disminución pudo estar relacionada con un efecto negativo sobre la coenzima  $\text{F}_{420}$ . Tholen y col. (2007) evidenciaron que algunas especies de arqueas metanogénicas del género *Methanobrevibacterium* son



---

capaces de reducir el oxígeno molecular y producir CH<sub>4</sub> simultáneamente. Con la adición de oxígeno a un cultivo de arqueas metanogénicas en suspensión la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> no disminuyó significativamente, ya que la coenzima F<sub>420</sub> fue transformada a factor F<sub>390</sub> con la finalidad de mantener la viabilidad celular y el proceso respiratorio en el cultivo axénico de arqueas metanogénicas (Kiener y col., 1987). Gerritse y Gottschal (1993) trabajaron con cultivos mixtos en lote de una cepa aerobia con dos arqueas metanogénicas *Methanobacterium formicicum* y *Methanosarcina barkeri* en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, se observó que aún bajo estas condiciones estas arqueas son capaces de crecer y participar en el proceso, cuando se encuentran en asociación con bacterias aerobias.

### **1.6. Sistemas anaerobios con bajas concentraciones de oxígeno**

El tratamiento de las aguas residuales municipales e industriales se ha realizado por tratamientos anaerobios (bajo condiciones metanogénicas, sulfatorreductoras o desnitrificantes) o aerobios (lodos activados o lechos bacterianos) o por combinaciones en serie de estos tratamientos (Tezel y col., 2001; Buitrón y col., 2003; Melgoza y col., 2004; Frigon y col., 2009). Sin embargo, en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento biológico de aguas residuales en los últimos años se ha estudiado la posibilidad de acoplar los procesos respiratorios anaerobios y aerobios en un mismo sistema (Gerritse y Gottschal, 1993; John y Schügerl, 1996; Durán y col., 2008). El funcionamiento de estos sistemas se basa en la distribución de agregados microbianos, como biopartículas de lecho fluidizado o gránulos. Los agregados microbianos utilizan al oxígeno y al CO<sub>2</sub> como aceptores de electrones, ya que permiten la actividad metabólica de los ambientes aerobio y anaerobio, por lo que la periferia de los gránulos está conformada por bacterias aerobias o facultativas y en las capas internas de los gránulos se encuentran bacterias anaerobias y arqueas metanogénicas. Algunas de las ventajas de estos sistemas son: a) la eliminación completa de compuestos químicos que requieren diversos aceptores, b) procesos respiratorios desasimilativos con bajo crecimiento de biomasa y c) la inversión y los costos operacionales son reducidos (Shen y Guiot, 1996; Kato y col., 1997).

Un ejemplo de esto son los sistemas metanogénicos con bajas concentraciones de oxígeno, los cuales han ampliado su estudio porque proporcionan resultados favorables en la eliminación de una amplia gama de compuestos químicos. Durán y col. (2008) vieron que los compuestos de resinas poliméricas, entre ellos el AV, pueden ser consumidos a una mayor velocidad en un reactor UASB en presencia de  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de oxígeno disuelto. Sin embargo, existe poca información sobre el papel del oxígeno en el proceso respiratorio. Es necesario entonces, explicar esta interrogante y ampliar los conocimientos sobre estos sistemas, ya que hasta la fecha son pocos los estudios que se han realizado sobre el tema. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de procesos metanogénicos con bajas concentraciones de oxígeno utilizados en la remoción de compuestos químicos industriales que requieren los ambientes aerobio y anaerobio para ser eliminados completamente.

**Tabla 3.** Ejemplos de sistemas metanogénicos con bajas concentraciones de oxígeno disuelto (OD) para el tratamiento de compuestos químicos industriales.

Sistema	Inóculo	Condiciones de operación	Compuesto	Resultados	Referencia
Fermentador Airlift	Biomasa inmovilizada en alginato ( <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Alcaligenes</i> sp)	T = 30 °C OD= 0.15 L min <sup>-1</sup>	4-cloro-2-nitrofenol (43.6 mg L <sup>-1</sup> )	93% de eliminación	Kudlich y col. (1996)
Reactor UASB híbrido	Lodo granular metanogénico	T=35 °C TRH=2 días OD=1.2 y 2.5 L <sub>O2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Pentaclorofenol (5-137 mg L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Mineralización total	Macarie y Guiot (1996)
Reactor UASB	Células inmovilizadas en Quitosano-lignosulfonato	T=30 °C TRH=2.1 días OD=1.6-2.0 L <sub>O2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Aroclor 1242 (10 mg L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	81-84% de eliminación	Tartakovsky y col. (2001)
Filtro de lecho ascendente	Gránulos de bacterias metanotróficas inmovilizadas en quitosano	T=25 °C TRH=17-20 horas OD=4.9 L <sub>O2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Tetracloroetileno (14.3-42.9 mg L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	88% de eficiencia de deoloración	Gerritse y col (1995)
Reactor de lecho empacado	Gránulos y comunidades aerobias inmovilizadas en k-carragenina/gelatina	T=35 °C TRH=1 h OD=3 L <sub>O2</sub> L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	2,4,6-Triclorofenol (101 mg L <sub>R</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Mineralización total	Gardin y col. (2001)
Reactor UASB	Lodos granulares metanogénicos	T=35 °C TRH= 1 y 4 días OD=5 mg L <sup>-1</sup>	Acetamida (3.4-13.4 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	53.3 a 96.2% de eliminación	Guyot y col. (1995)
Reactor UASB y cultivos en lote	Lodos granulares metanogénicos	T=35 °C TRH=1 día OD=0.6-1 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	AV, ácido acrílico, butil acrilato, estireno y metil acrilato (1.5 g DQO/L-d)	73 y 80 % de eliminación de los acrilatos, AV y estireno	Durán y col. (2008)

Cuando se respondan las interrogantes sobre los sistemas metanogénicos en presencia de oxígeno, se podrá aportar información novedosa para el tratamiento de aguas residuales industriales que contengan bajas concentraciones de compuestos tóxicos y recalcitrantes.

### **1.7. Dinámica poblacional de cultivos en continuo**

El uso de herramientas moleculares para el estudio de la dinámica poblacional de cultivos en continuo tiene la finalidad de identificar los cambios poblacionales y entender el papel de los microorganismos en los diversos sistemas. Sin embargo, en ocasiones estas técnicas no aportan las suficientes evidencias para sostener este supuesto y es necesario complementarlas con otras variables de respuesta de carácter fisiológico o metabólico. Los avances en las técnicas moleculares pueden proporcionar herramientas para seguir la estructura y dinámica de una comunidad, así como caracterizar los microorganismos de muestras ambientales y reactores biológicos. No obstante, es necesario seleccionar un método molecular apropiado para el estudio de las comunidades en consorcios microbianos. Algunos de los métodos más utilizados son la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (por sus siglas en inglés, DGGE), hibridación in situ por fluorescencia (por sus siglas en inglés, FISH), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (por sus siglas en inglés, RT-PCR), etc.

La DGGE es una técnica de rastreo molecular, debido a que permite discernir diferencias o composiciones discretas entre moléculas de DNA de complejidad variable; por ejemplo, en fragmentos de DNA del mismo tamaño es posible discernir entre pequeñas variaciones en el contenido de GC de diferentes secuencias. Esta técnica en conjunto con la secuenciación de los fragmentos de DNA, ofrece la posibilidad de analizar los géneros y especies de los microorganismos presentes en comunidades complejas (Chan y col., 2001; Roest y col., 2005). Esta técnica permite la separación de bandas de DNA de igual tamaño (peso molecular) pero que difieren en una sola base en la secuencia del DNA. Por consiguiente, esta técnica es apropiada para obtener secuencias específicas generadas a partir de una mezcla compleja. Idealmente, el perfil electroforético (definido por el número de bandas) reflejará la abundancia relativa de miembros diferentes de una comunidad microbiana (Muyzer y col., 1993; Felske y col., 1997), por lo que es altamente recomendada para determinar la filogenia de los miembros de las comunidades (Ferris y col., 1996; Watanabe y col., 2000).

En la naturaleza, los microorganismos suelen vivir en consorcios vinculados a estructuras como los biofilms, flóculos o gránulos (Costerton y col., 1995). Bajo estas condiciones, los microorganismos se sitúan en un entorno heterogéneo con gradientes de nutrientes y productos de desecho, como consecuencia de procesos de difusión y transporte de masa, por lo que es de esperar que esta heterogeneidad se refleje en la fisiología de las células individuales. Por ejemplo, en los reactores metanogénicos utilizados en el tratamiento de aguas residuales, existe una gran variedad de microorganismos que consumen la materia orgánica (Speece, 1996). Algunos estudios señalan una baja diversidad de especies en ecosistemas abiertos, como resultado de la presión selectiva de donadores de electrones particulares (Tirola y col., 2002), aceptores de electrones (Von Canstein y col., 2002), o inhibidores (Nyman y col., 1999).

En este sentido, parece que la diversidad microbiana de estos sistemas provee un reservorio de cepas con nichos ecológicos complementarios que mejoran la estabilidad y desarrollo de sistemas como los biorreactores, bajo condiciones ambientales cambiantes (Von Canstein y col., 2002), o bien la posibilidad de formar interacciones entre grupos microbianos para aumentar la eficiencia y capacidad metabólica (Fernández y col., 2000). Sin embargo, existen trabajos como el reportado por García-Saucedo y col. (2008) en donde no hubo dependencia alguna entre el proceso respiratorio y la dinámica de las poblaciones.

La caracterización y cuantificación de las poblaciones microbianas en sistemas biológicos es de gran importancia, ya que nos permite entender mejor estos sistemas. La dinámica de las poblaciones nos permite relacionar la estabilidad fisiológica con la composición microbiana, es decir, si un ecosistema funcionalmente estable implica necesariamente una comunidad constante o si una comunidad variable implica variaciones en el patrón respiratorio. Trabajos relacionados con este tema, presentan diferentes escenarios. Fernández y col. (1999) estudiaron mediante DGGE y secuenciación la estructura de las comunidades de arqueas y bacterias en un reactor metanogénico en continuo alimentado con glucosa en estado estacionario, observando que el dominio *Archaea* no varió significativamente y que la variación microbiana fue observada en el dominio *Bacteria*. Al evaluar la respuesta respiratoria se evidenció que el sistema se mantuvo funcionalmente estable, tal vez debido a la

influencia de las variaciones poblacionales del género *Bacteria*. Oude Elferink y col. (1998b) estudiaron las interacciones competitivas y sintróficas entre grupos de microorganismos sulfatorreductores, metanógenos y acetógenos en reactores en continuo. Estos autores evaluaron métodos clásicos de aislamiento de microorganismos y DGGE con secuenciación para caracterizar la composición de los lodos anaerobios, y observaron que la combinación de los métodos de caracterización microbiológica clásicos y los métodos moleculares demostraron ser de gran utilidad para estudiar la dinámica poblacional de los lodos anaerobios en reactores en continuo. Es por esto que las técnicas moleculares para determinación de la dinámica poblacional, como son DGGE y secuenciación (Muyzer y col., 1993; Nielsen y col., 1999), son de gran utilidad para estimar de forma rápida la diversidad microbiana y la composición de una comunidad (Amann y col., 1995).

---

## 2. REFERENCIAS

- Amann, RI; Ludwig, W & Schleifer, KH (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*. 59: 143-169.
- Araya, P; Aroca, G & Chamy, R (1999). Anaerobic treatment of the effluents from an industrial polymers synthesis plant. *Waste Management*. 19: 141-146.
- Araya, P; Chamy, R; Mota, M & Alves, M (2000). Biodegradability and toxicity of styrene in the anaerobic digestion process. *Biotechnology letters*. 22: 1477-1481.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease) (2008). Public Health Statement for Vinyl Acetate. *Encyclopedia of Earth*. Eds. Cutler J. Cleveland. Washington, D.C.
- Blaut, M (1994). Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek*. 66: 187-208.
- Buitrón, G; Melgoza, RM & Jiménez, L (2003). Pharmaceutical wastewater treatment using an anaerobic/aerobic sequencing batch biofilter. *Journal of environmental science and health. Part A. Toxic/Hazardous substances and Environmental Engineering*, 38(10): 2077-2088.
- Chan, OC; Liu, WT & Fang, HH (2001). Study of microbial community of brewery treating granular sludge by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene. *Water science and technology*. 43(1): 77-82.
- Chou, WL; Speece, RE & Siddiqi, RH (1979). Acclimation and degradation of petrochemical wastewater components by methane fermentation. *Biotechnology and bioengineering symposium*. 8: 391-414.
- Clarens, M & Molleta, R (1990). Kinetic studies of acetate fermentation by *Methanosarcina* sp. MST-1. *Applied microbiology and biotechnology*. 33(2): 239-244.
- Comisión Nacional del Agua (2009). Situación del Subsector Agua potable, Alcantarillado y Saneamiento. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2009. México D.F.
- Conrad, R (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS microbiology ecology*. 28:193-202.

- 
- Costerton, JW; Lewandowski, Z; Caldwell, DE; Korber, DR & Lappin-Scott, HM (1995). Microbial biofilms. *Annual reviews of microbiology*. 49:711–745.
- Dangcong, P & Xingwen, Z (1994). Effects of the seed sludge on the performance of UASB reactors for treatment of toxic wastewater. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 60: 171-176.
- Deppenmeier, U; Müller, V & Gottschalk, G (1996). Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Archives of microbiology*. 165:149-163.
- Durán, U; Monroy, O; Gómez, J & Ramírez, F (2008). Biological wastewater treatment for removal resins in UASB reactor: Influence of oxygen. *Water science and technology*. 57(7): 1047-1052.
- Ergüder, TH & Demirer, GN (2005). Granulation of a mixture of suspended anaerobic and aerobic cultures under alternating anaerobic/microaerobic/aerobic conditions: a preliminary study. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80(7): 837-842(6).
- Estrada-Vázquez, C; Macarie, H; Kato, MT; Rodríguez-Vázquez, R; Esparza-García, F & Poggi-Varaldo, HM (2003). The effect of the supplementation with a primary carbon source on the resistance to oxygen exposure of methanogenic sludge. *Water science and technology*. 48(6): 119-124.
- Felske, A; Rheims, H; Woltering, A; Stackebrandt, E & Akkermans, ADL (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in glasslands soils. *Microbiology*. 143: 2983-2989.
- Fernández, A; Huang, S; Seston, S; Xing, J; Hickey, R; Criddle, C & Tiedje, J (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and environmental microbiology*. 65: 3697-3704.
- Fernández, A; Hashsham, S; Dollhopf, S; Raskin, L; Glagoleva, O; Dazzo, F; Hickey, R; Criddle, C & Tiedje, J (2000). Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and environmental microbiology*. 66:4058-4067.
- Ferris, MJ; Muyzer, G & Ward, DM (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and environmental microbiology*. 62: 340-346.
-

- Ferry, JG (1992a). Biochemistry of methanogenesis. Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 27(6): 473-503.
- Ferry, JG (1992b) Methane for acetate. Journal of bacteriology. 174(17): 5489-5495.
- Fetzer, S; Bak, F & Conrad R (1993). Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. FEMS microbiology and ecology. 12: 107-115.
- Flathman, PE; Krupp, BJ; Zottola, P; Trausch, JR; Carson, JH; Yao, R; Laird, GJ; Woodhull, PM; Jerger, DE & Lear, PR (1996). In-situ biological treatment of vinyl acetate contained soil: an emergency response action. Remediation. 6(2): 57-79.
- Frieden, E (1972). The Chemical Elements of Life. Scientific American. Pps. 52-60.
- Frigon, JC; Breton, J; Bruneau, T; Moletta, R & Guiot SR (2009). The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. Bioresource technology. 100(18): 4156-4163.
- Frimmer, U & Widdel, F (1989). Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria: Growth experiments and enzymatic studies. Archives of microbiology. 152: 479-483.
- García, JL; Patel, BKC & Ollivier B (2000). Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. Anaerobe. 6: 205-226.
- García-Saucedo, C; Fernández, FJ; Buitrón, G; Cuervo-López, FM & Gómez, J (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. Journal of chemical technology and biotechnology. 83 (12): 1648-1657.
- Gardin, H; Lebeault, JM & Paus, A (2001). Degradation of 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) by co-immobilization of anaerobic and aerobic microbial communities in an upflow reactor under air-limited conditions. Applied microbiology and biotechnology. 56: 524–530.
- Gerritse, J & Gottschal, JC (1993). Two-membered mixed cultures of methanogenic and aerobic bacteria in O<sub>2</sub>-limited chemostats. Journal of general microbiology. 139: 1853-1860.
- Gerritse, J; Renard, V; Gottschal, JC & Visser, J (1995). Complete degradation of tetrachloroethene by combining anaerobic dechlorinating and aerobic methanotrophic enrichment cultures. Applied microbiology and biotechnology. 43:920-928
- Grotenhuis, JTC; Smit, LM; Plugge, CM; Yuansheng, X; Van Lammeren, AAM; Stams, AJM & Zehnder, AJB (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge



- adapted to different substrates. *Applied and environmental microbiology*. 57(7): 1942-1949.
- Guyot, JP; Ferrer, H & Ramírez, F (1995). Methane production from acetamide in an upflow anaerobic sludge-blanket reactor based on a synergistic association between an aerobic rod and methanogens. *Applied microbiology and biotechnology*. 43: 1107-1111.
- John, G & Schiigerl, K (1996). Aerobic/anaerobic mixed cultures in stirred tank and gaslift loop reactors. *Journal of biotechnology*. 50: 115-122.
- Jones, WJ; Nagle, DP & Whitman, WB (1987). Methanogens and the diversity of the Archaeobacteria. *Microbiological reviews*. 51(1): 135-177.
- Kato, MT; Field, JA & Lettinga, G (1997). Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Brazilian journal of chemical engineering*. 14(4): 1-15.
- Kiener, A; König, H; Winter, J & Leisinger, T (1987) Purification and use of *Methanobacterium wolfei* pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of bacteriology*. 169: 1010–1016.
- Kudlich, M; Bishop, PL; Knackmuss, HJ & Stolz, A (1996). Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture. *Applied microbiology and biotechnology*. 46: 597-603.
- Lokshina, LY; Vavilin, VA; Kettunen, RH; Rintala, JA; Holliger, C & Nozhevnikova, AN (2001). Evaluation of kinetic coefficients using integrated Monod and Haldane models for low-temperature acetoclastic methanogenesis. *Water research*. 35(12): 2913–2922.
- Lowe, S; Jain, MK; & Zeikus, JG (1993). Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. *Microbial reviews*. 57(2): 451-509.
- Macarie, H & Guiot, S (1996). Pentachlorophenol degradation using a simultaneous anaerobic-aerobic process: a new technology for wastewater treatment. In: *Frontiers of biotechnology and bioengineering*. E. Galindo (ed.), México. Pps.: 317-324.
- Mackay, D; Shiu, WY & Ma, KC (1995). *Illustrated Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals: Oxygen, nitrogen, and sulfur containing compounds*. Vol. 4. Ed. CRC Press. Pp. 617-618.

- Melgoza, RM; Cruz, A & Buitrón, G (2004). Anaerobic/aerobic treatment of colorants present in textile effluents. *Water science and technology*. 50(2): 149-155.
- Muyzer, G; De Waal, EC & Uitterlinden, AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*. 59: 695-700.
- Neil, CA; Williamson, B & Heyden, RJ (2006). *Biology: Exploring life*. Pearson Prentice Hall Eds. Boston, Massachusetts.
- Nieder, M; Sunarko, B & Meyer, O (1990) Degradation of vinyl acetate by soil, sewage, sludge, and the newly isolated aerobic bacterium V2. *Applied and environmental microbiology*. 56(10): 3023-3028.
- Nielsen, AT; Liu, WT; Filipe, C; Grady, L; Molin, JRS & Stahl, DA (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied and environmental microbiology*. 65: 1251-1258.
- Nyman, JA (1999). Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial population in fresh marsh soils. *Microbiology and ecology*. 37: 152-162.
- Oude Elferink, SJWH; Luppens, SBI; Marcelis, CLM & Stams, AJM (1998a). Kinetics of acetate oxidation by two sulfate reducers isolated from anaerobic granular sludge. *Applied and environmental microbiology*. 64(6): 2301–2303.
- Oude Elferink, SJWH; Van Lis, R; Heilig, HGJ; Akkermans, ADL & Stams, AJM (1998b). Detection and quantification of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Biodegradation* 9: 169–177.
- Owen, PE (1988). Vinyl acetate: 104 week inhalation combined chronic toxicity and carcinogenicity study in the rat and mouse. Report prepared by Hazleton Laboratories Europe Ltd., Harrogate, England for the society of the plastics industry, Inc., NY. Report No.: 5547-51/15.
- Parés, FP & Juaréz, GA (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. 1ª edición. Ed. Reverté. Barcelona. Pp: 253-268.
- Peng, J; Lu, Z; Rui, J & Lu, Y (2008). Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and environmental microbiology*. 74(9): 2894-2901.

- 
- Post, WM; Peng, T-H; Emanuel, WR; King, AW; Dale, VH & DeAngelis, DL (1990) The global carbon cycle. *American scientist*. 78: 310-326.
- Prager, JC (1998) *Environmental contaminant reference databook*. Volume 2. Ed. John Wiley & Sons. E.E.U.U. Pps., 581-593.
- Prince, KS; Waggy, GT & Conway, RA (1974). Brine shrimp bioassays and seawater BOD of petrochemicals. *Journal of water pollution control federation*. 46: 63-77.
- Rail, CD (2000). *GROUNDWATER CONTAMINATION: Contamination, sources and hydrology*. 1a. edición. Ed. CRC Press. Florida, EE.UU. Pps. 13-34.
- Roest, C; Heilig, GHJ; Smidt, H; de Vos, WM; Stams, AJM & Akkermans, ADL (2005). Community analysis of a full-scale anaerobic bioreactor treating paper mill wastewater. *Systematic and applied microbiology*. 28(2): 175-185.
- Rouvière, PE & Wolf, RS (1988). Novel Biochemistry of methanogenesis. *Journal of biological chemistry*. 263(17): 7013-7916.
- Schink, B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and molecular biology reviews*. 61(2): 262-280.
- Schmidt, JE & Ahring, BK (1999) Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Applied and environmental microbiology*. 65(3): 1050-1054.
- Schnürer, A; Schink, B & Svensson, H (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International journal of systematic bacteriology*. 46(4): 1145-1152.
- Shen, CF & Guiot, SR (1996). Long-term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules. *Biotechnology and bioengineering*. 49: 611-620.
- Smith, KS & Ingram-Smith, C (2007). *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends in microbiology*. 15(4): 150-155.
- Speece, RE (1996). *ANAEROBIC BIOTECHNOLOGY: For industrial wastewaters*. 1ª edición. Ed. J.M. Speece. E.E.U.U. Pps. 190-197, 274-285.
- Stuckey, D; Owen, W & McCarty, PL (1980). Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays. *Journal water pollution control federation*. 52(4): 720-729.
-

- Tartakovsky, B; Michotte, A; Cadieux, J-CA; Lau, PCK; Hawari, J & Guiot, SR (2001). Degradation of Aroclor 1242 in a single-stage coupled anaerobic/aerobic bioreactor. *Water research*. 35(18): 4323-4330.
- Tezel, U; Guven, E; Ergüder TH; & Demirer GN (2001). Sequential (anaerobic/aerobic) biological treatment of Dalaman SEKA pulp and paper industry effluent. *Waste management*. 21(8): 717-724.
- Thauer, RK (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*. 144: 2377-2406.
- Tholen, A; Pester, M & Brune, A (2007). Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS microbiology and ecology*. 62: 303-312.
- Tirola, MA; Männistö, MK; Puhakka, JA & Kulomaa, MS (2002). Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MTI, a dominant polychlorophenol degrading strain in a ground-water bioremediation system. *Applied and environmental microbiology*. 68: 173-180.
- Von Canstein, H, Kelly, S, Li, Y, Wagner-Döbler, I (2002). Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. *Applied and environmental microbiology*. 68: 2829-2837.
- Watanabe, K; Kodama, Y; Syutsubo, K & Harayama, S (2000). Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and environmental microbiology*. 66: 4803-4809.
- Whitman, WB; Bowen, TL & Boone, DR (1992). The methanogenic bacteria. Pps. 739-745. In: *The prokaryotes*, Vol. 1. Springer-Verlag. New York.
- Zinder, SH (1993). *Methanogenesis: Physiological ecology of methanogens*. Ed. Chapman & Hall. NY. Pps.: 128-206.

# CAPITULO II



## 1. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado del acetato de vinilo ha generado problemas para la salud y contaminación ambiental. Las aguas residuales contaminadas por acetato de vinilo han sido tratadas por sistemas biológicos anaerobios bajo condiciones metanogénicas, sin embargo hay reportes de las bajas eficiencias de eliminación e inestabilidad de estos sistemas, sin que se aporten evidencias del efecto de este compuesto sobre el proceso respiratorio metanogénico.

Se ha observado que es posible la eliminación de una amplia gama de compuestos químicos recalcitrantes, adicionando bajas concentraciones de oxígeno a reactores metanogénicos. Existen reportes que evidencian la eliminación de compuestos de resinas poliméricas, entre ellos el acetato de vinilo, en sistemas metanogénicos con oxígeno, pero no se ha caracterizado cuantitativamente el comportamiento metabólico utilizando las variables de respuesta adecuadas para entender el papel del oxígeno, y tampoco se ha estudiado la dinámica de las poblaciones microbianas participantes.

En consecuencia, en el presente trabajo se realizó un estudio de ciencia básica, utilizando el acetato de vinilo como una molécula modelo aparentemente tóxica, para entender el efecto de este compuesto sobre la fisiología del proceso respiratorio metanogénico, el papel que juegan del oxígeno y la glucosa en la eliminación del acetato de vinilo y la dinámica de las poblaciones microbianas participantes. La finalidad del trabajo es ampliar el conocimiento del proceso de eliminación del acetato de vinilo bajo estas condiciones, y aportar evidencias que permitan la implementación de los sistemas anaerobios con bajas concentraciones de oxígeno como una nueva alternativa para la eliminación de compuestos químicos recalcitrantes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Estudiar la fisiología y la dinámica poblacional del proceso metanogénico en presencia de oxígeno para la eliminación de acetato de vinilo.

### **2.2. Objetivos particulares**

1. Evaluar y analizar el efecto del acetato de vinilo en la metanogénesis.
2. Evaluar y analizar el efecto del oxígeno en el proceso respiratorio metanogénico.
3. Evaluar y analizar el efecto de la glucosa en la eliminación de acetato de vinilo.
4. Evaluar y analizar la dinámica de las poblaciones microbianas participantes en la eliminación del acetato de vinilo.



### 3. HIPOTESIS

**Hipótesis 1:** El acetato de vinilo inhibe la metanogénesis acetoclástica.

**Hipótesis 2:** La adición de oxígeno a un consorcio microbiano metanogénico favorece la metanogénesis y mineralización del acetato de vinilo.

**Hipótesis 3:** La glucosa favorece la metanogénesis y mineralización del acetato de vinilo.

**Hipótesis 4:** El acetato de vinilo y el oxígeno modifican las poblaciones presentes en los lodos.



# CAPITULO III



# 1. ESTUDIO FISIOLÓGICO DE ELIMINACIÓN DEL ACETATO DE VINILO POR LODOS METANOGÉNICOS: INFLUENCIA DEL ACETATO DE VINILO Y DEL ACETATO

## 1.1. Resumen

En este trabajo se estudió la eliminación de acetato de vinilo (AV) en un cultivo en continuo, y se evaluó mediante cultivos en lote el efecto del AV sobre la metanogénesis y el consumo de acetato (Ac). El ensayo en continuo se realizó con un reactor de flujo ascendente de lecho de lodos anaerobios (UASB, por sus siglas en inglés) de 1.5L que fue operado a una temperatura de  $30\pm 2$  °C, con un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día, una concentración inicial de inóculo de 33.5 g sólidos suspendidos volátiles (SSV) L<sup>-1</sup>, una relación carbono/nitrógeno de 50 y una alimentación con una mezcla de carbono de AV (C-AV) y carbono de glucosa (C-G) a dos velocidades de carga: 34 mg C-AV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (100 mg DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) + 338 mg C-G L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (900 mg DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (A<sub>V1</sub>), y 85 mg C-AV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (250 mg DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) + 281 mg C-G L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (750 mg DQO L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (A<sub>V2</sub>). Los ensayos en lote se realizaron con botellas serológicas de 60 mL, a una temperatura de  $30\pm 2$  °C, una relación carbono orgánico total (COT)/SSV de 2 y con los SSV del reactor UASB en régimen estacionario como inóculo. Mediante estos cultivos se evaluaron diferentes concentraciones de AV (de 0 a 341 mg C-AV L<sup>-1</sup>) y de acetato (de 0 a 200 mg C-Ac L<sup>-1</sup>). Las variables de respuesta evaluadas fueron: eficiencia de consumo del COT (E<sub>COT</sub>), rendimientos (Y), velocidades volumétricas de consumo (r<sub>S</sub>), producción (r<sub>P</sub>) y las velocidades específicas de consumo de AV (q<sub>AV</sub>) y de formación de acetato (q<sub>Ac</sub>) y metano (q<sub>CH4</sub>).

Los resultados del reactor UASB mostraron que al cambiar de A<sub>V1</sub> a A<sub>V2</sub>, un aumento de 150% en la velocidad de carga de AV, modificó el comportamiento del lodo. La E<sub>COT</sub> disminuyó un 45%, por acumulación del 48% de acetato y la r<sub>CH4</sub> disminuyó un 49%. Los resultados negativos aparentemente están ligados al aumento de la velocidad de carga de AV (2.5 veces). Sin embargo, la eficiencia de consumo de AV fue siempre del 100%. Esto sugiere que los efectos negativos no estuvieron vinculados con el aumento en la velocidad de carga de

AV, sino con la disminución en la capacidad metanogénica relacionada con el consumo del acetato y la modificación de la ruta metabólica.

En los ensayos en lote se evaluó el papel del AV en el proceso respiratorio metanogénico durante 98 horas en el intervalo de 0 a 341 mg C L<sup>-1</sup>. Se evidenció una aparente relación entre la disminución en la velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub> y la velocidad específica de formación de acetato, por lo que bajo estas condiciones la formación de CH<sub>4</sub> a partir de acetato es lenta, debido a la baja afinidad del lodo metanogénico por el acetato. Se evaluó también la metanogénesis en función de la concentración del acetato, utilizando como inóculo el lodo del reactor UASB en régimen estacionario, cuando fue alimentado con glucosa y después de estar expuesto al AV. De esta forma se evidenció que la velocidad específica de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ ), como una función de la concentración de acetato tuvo un perfil de Monod en ambos ensayos. Sin embargo, la velocidad máxima de consumo de acetato ( $q_{Ac,max}$ ) disminuyó un 69% y la  $K_S$  aumentó un 15%, después de exponer los lodos del reactor al AV. Estos resultados confirman que el AV provocó la disminución de la velocidad de consumo pero no modificó la ruta de consumo del acetato.

En este resumen se presentan de forma general los principales aportes del estudio de eliminación del acetato de vinilo bajo condiciones metanogénicas, a continuación se presentan mayores detalles sobre los antecedentes, la metodología y la discusión de los resultados obtenidos.

## **1.2. Antecedentes**

El AV es un compuesto químico volátil utilizado a gran escala en la fabricación de adhesivos, textiles, emulsiones y resinas para pinturas, por lo que su uso ha provocado serios problemas de contaminación en suelos, aire y cuerpos de agua naturales. En concentraciones mayores a 60 mg C L<sup>-1</sup> puede llegar a ser letal para varios organismos (Prager, 1998; ATSDR, 2008). Debido a su extendido empleo es frecuente su presencia en las aguas residuales, principalmente las de la industria de resinas poliméricas. Estas aguas ya han sido tratadas previamente mediante procesos metanogénicos; así se ha observado en reactores UASB que la

alimentación entre 63 y 102 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV provocan una disminución del 42% en la velocidad específica de producción de metano (Dangcong y Xingwen, 1994; Araya y col., 1999 y 2000). Durán y col. (2008) evidenciaron que al aumentar de 32 a 44 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> la velocidad de carga de AV, las velocidades de producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disminuyeron alrededor del 60%. En cultivos en lote, los mismos autores mostraron que sólo con concentraciones menores a 23 mg C L<sup>-1</sup> fue posible la eliminación del AV hasta CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Chou y col. (1979) y Stuckey y col. (1980), realizaron estudios sobre la eliminación del AV en el intervalo desde 22 a 893 mg C L<sup>-1</sup> bajo condiciones metanogénicas en cultivos en lote, y observaron que es posible el consumo del 100%, aunque con las altas concentraciones utilizadas hubo acumulación de acetato y acetaldehído, sin formación significativa de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Todos estos resultados sugieren que el consumo del AV bajo condiciones metanogénicas se ve afectado negativamente a altas concentraciones del compuesto.

Nieder y col. (1990) dieron indicios de la ruta de eliminación del AV bajo condiciones metanogénicas, sugiriendo que inicialmente ocurre una hidrólisis del AV dando lugar a la formación de alcohol vinílico y acetato (Ec.1), el alcohol vinílico es oxidado posteriormente a acetaldehído (Ec.2). Hay evidencias de que la presencia de bajas concentraciones de acetaldehído inducen la acumulación de acetato e inhiben la metanogénesis acetoclástica (Dwyer y Tiedje, 1983 y 1986). El acetaldehído puede ser posteriormente oxidado a acetato (Ec.3). La reacción de oxidación de acetaldehído a acetato es catalizada por la acetaldéhidooxidasa y está acoplada a la reducción de NAD<sup>+</sup>, sin embargo esta reacción no está asociada con la fosforilación a nivel de sustrato. Se ha observado que cuando esta reacción sucede no hay actividad de las enzimas acetato quinasa y fosfotransacetilasa, dos enzimas clave en la metanogénesis acetoclástica (Frimmer y Widdel, 1989; Schnürer y col., 1996; Schink, 1997). Finalmente, el acetato es consumido por las bacterias metanogénicas (Ec.4). La velocidad de consumo de acetato bajo condiciones metanogénicas está relacionada con el género microbiano presente en el inóculo. Los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* son los más frecuentes consumidores de acetato, sin embargo estos géneros tienen diferentes constantes de afinidad (K<sub>S</sub>) por este sustrato, siendo mayor para el segundo (Conrad, 1999;

Schmidt y Ahring, 1999). Las ecuaciones siguientes muestran las reacciones estequiométricas y la energía libre estándar ( $\Delta G^{\circ}$ ) para la metanización de AV:



La fermentación de la glucosa provee un mayor flujo de electrones (Chidthaisong & Conrad, 2000), siendo un efector positivo en la metanogénesis de compuestos químicos recalcitrantes. Hendriksen y col. (1991), Garibay-Orijel y col. (2005) y Duran y col. (2008) observaron que la glucosa puede funcionar como donador o aceptor de electrones para lograr la metanogénesis de compuestos recalcitrantes como acrilatos, estireno, acetato de vinilo, triclorofenol y pentaclorofenol. Sin embargo, faltan evidencias que ayuden a entender mejor el papel de la glucosa en la metanogénesis de este tipo de compuestos. En la ecuación 5 se muestra la reacción estequiométrica para la metanogénesis de la glucosa en consorcios microbianos.



El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la velocidad de carga de AV sobre el proceso metanogénico en presencia de glucosa en un reactor UASB en régimen estacionario; así como evaluar el efecto de la concentración inicial de AV en el proceso metanogénico y la determinación de los parámetros cinéticos para la metanogénesis del acetato, mediante cultivos en lote. Para evaluar ambos cultivos se midieron los cambios a través de eficiencias de consumo, velocidades específicas y volumétricas de consumo y de producción. La finalidad del trabajo fue aportar evidencias que permitan entender el proceso metanogénico en presencia del acetato de vinilo.



### 1.3. Materiales y Métodos

#### 1.3.1. Métodos

La cuantificación de los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el inóculo, se realizaron de acuerdo con APHA (2005). Se cuantificó la producción de biogás usando columnas con solución salina saturada ( $300 \text{ g NaCl L}^{-1}$ ) con pH de 2. El carbono orgánico total (COT) fue cuantificado utilizando un analizador de carbono total (TOC-5000 Shimadzu). Se cuantificaron AV, Ac y AcCHO mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (FID) empleando una columna AT-1000 ( $0.53\text{mm} \times 1.2\text{mm} \times 10\text{m}$ ), con temperaturas de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  para el horno,  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  para el inyector y  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  para el detector, y con nitrógeno como gas acarreador a un flujo de  $6.6 \text{ mL min}^{-1}$ . Se cuantificó la composición del biogás ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ) por cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (TCD) empleando una columna de Carbosphere 80/100, con temperaturas de  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  para la columna,  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  para el detector,  $170 \text{ }^\circ\text{C}$  para el inyector y utilizando helio a un flujo de  $25 \text{ mL min}^{-1}$  (Durán y col., 2008).

#### 1.3.2. Cultivo en continuo

Se utilizó un reactor UASB de 1.5 L de volumen útil, inoculado con 0.5 L de un lodo procedente de un digestor anaerobio que trataba aguas residuales de resinas poliméricas (Duran y col., 2008). El reactor UASB fue operado a una temperatura de  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día, una concentración inicial de inóculo de  $33.5 \text{ g SSV L}^{-1}$  y una relación C/N de 50. La alimentación del reactor consistió del siguiente medio basal ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.703;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.028;  $\text{KCl}$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.111;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 y  $\text{NaCl}$ , 0.297. El medio basal fue inicialmente mezclado con glucosa para tener una velocidad de carga de  $375 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Posteriormente, los reactores fueron alimentados con AV (C-AV) más glucosa (C-G), a dos diferentes velocidades de carga (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Velocidades de carga de carbono para los sustratos alimentados a reactor UASB.

Compuesto	$A_{V1} \text{ (mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$	Carbono (%)	$A_{V2} \text{ (mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$	Carbono (%)
C-AV	34	9.1	85	23.2
C-G	338	90.9	281	76.8
Total	372	100	366	100

*C-AV, Carbono de acetato de vinilo; C-G, Carbono de glucosa;*

*A<sub>V1</sub>, Primera velocidad de carga con AV; A<sub>V2</sub>: Segunda velocidad de carga con AV*

### 1.3.3. Ensayos en lote

Se realizaron dos ensayos en lote por duplicado, en botellas serológicas de 60 mL con 40 mL de medio de cultivo, a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C y una relación COT/SSV de 2. Los SSV para inocular las botellas fueron tomados del reactor UASB en régimen estacionario. La composición del medio basal utilizado en los ensayos en lote fue similar al utilizado para la alimentación de reactor UASB. Mediante estos ensayos se evaluaron:

- a) La eliminación de diferentes concentraciones de AV ( $\text{mg C-AV L}^{-1}$ ): 0(control), 34, 85, 170, 255 y 341. En la prueba control con 0  $\text{mg C-AV L}^{-1}$  se utilizó glucosa a una concentración de  $375 \text{ mg C L}^{-1}$ .
- b) La metanogénesis del acetato ( $\text{mg C-Ac L}^{-1}$ ): 0(control), 15, 30, 60, 90, 150 y 200. Utilizado lodos del reactor UASB antes y después de haber estado expuestos al AV.

### 1.3.4. Variables de respuesta

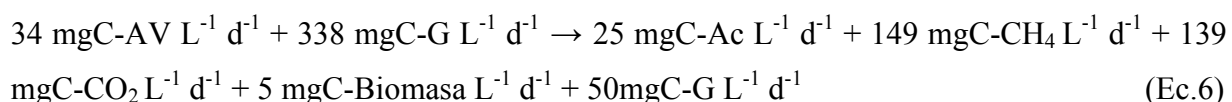
El reactor en continuo y los cultivos en lote fueron evaluados mediante el cálculo de variables de respuesta tales como: eficiencia de eliminación del COT ( $E_{\text{COT}} (\%) = [\text{mg COT consumido} / \text{mg}^{-1} \text{ COT alimentado}] * 100$ ), rendimientos de productos ( $Y_{\text{P/S}} = \text{mg carbono de producto formado} / \text{mg}^{-1} \text{ carbono de sustrato consumido}$ ), velocidades volumétricas de consumo de sustratos ( $r_{\text{S}} = \text{mg carbono de sustrato consumido} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), velocidades volumétricas de formación de productos ( $r_{\text{P}} = \text{mg carbono de producto formado} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Para los cultivos en lote se determinaron las velocidades específicas de consumo de acetato ( $q_{\text{Ac}} = \text{g C-Ac g}^{-1} \text{ SSV} \text{ d}^{-1}$ ) y de formación de metano ( $q_{\text{CH}_4} = \text{g C-CH}_4 \text{ formado g}^{-1} \text{ SSV} \text{ d}^{-1}$ ).

## 1.4. Resultados y Discusión

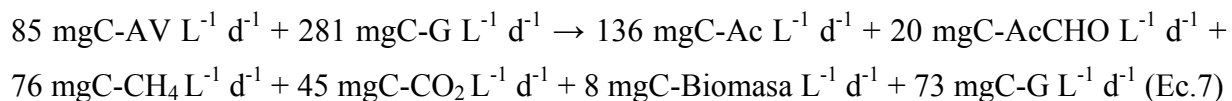
### 1.4.1. Cultivo en continuo

El reactor UASB fue inicialmente alimentado con glucosa a una velocidad de carga de  $375 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Bajo estas condiciones, la eficiencia de remoción de la glucosa fue de  $98 \pm 4\%$ , con una velocidad de consumo de  $374 \pm 11 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , una velocidad de formación de  $\text{CH}_4$  de  $184 \pm 6 \text{ mg C-CH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y rendimientos de 0.50 para  $\text{CH}_4$  y 0.48 para  $\text{CO}_2$ . Estos resultados

muestran que el lodo del reactor inicialmente se encontraba en condiciones metabólicas adecuadas y se alcanzaron valores similares a los estequiométricos para la metanogénesis de la glucosa (de acuerdo con la Ecuación 5). Con base en las condiciones descritas anteriormente, se modificó la alimentación del reactor UASB a una mezcla de glucosa y AV ( $A_{V1}$ , Tabla 1.1). Durante los primeros 40 días de operación bajo estas condiciones, el reactor mostró variaciones significativas en la eliminación de carbono y la producción de  $CH_4$  (coeficientes de variación del 23 y el 33%, respectivamente). Después de este período, se alcanzó el régimen estacionario con coeficientes de variación del 6%. Bajo estas condiciones, el balance de carbono fue el siguiente:



Con  $A_{V1}$ , el 91% del carbono consumido fue eliminado como  $CH_4$  y  $CO_2$  con rendimientos para Ac,  $CH_4$  y  $CO_2$  de 0.08, 0.47 y 0.44, respectivamente, lo que indica que el proceso respiratorio fue claramente metanogénico. Sin embargo, al modificar las velocidades de carga a  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $281 \text{ mg C-G L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $A_{V2}$ , Tabla 1.1), el metabolismo del lodo cambió, como se muestra en el siguiente balance de carbono:

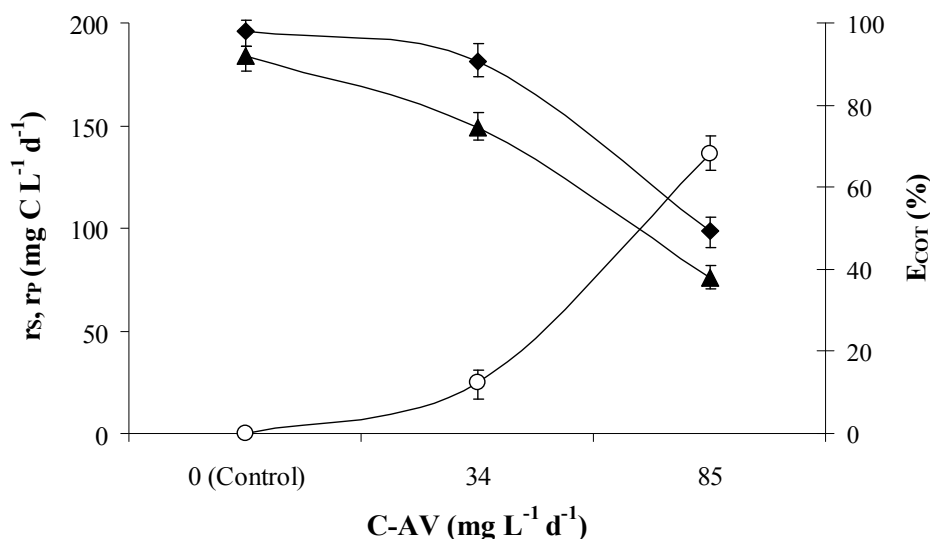


Cuando se modificaron las velocidades de carga, particularmente por el incremento de un 150% en la carga de AV, se observó una disminución de 53 y 68% en la producción de  $CH_4$  y  $CO_2$  respectivamente, debido al aumento en la acumulación de acetato y a la aparición de acetaldehído (Ver Ecuación 7 y Figura 1.1). El efecto negativo sobre la metanogénesis está aparentemente relacionado con el aumento en la velocidad de carga de AV (2.5 veces mayor), sin embargo la eficiencia de consumo de AV fue siempre del 100%. Esto evidenciaría que la disminución de la metanogénesis no está relacionada con el incremento en la velocidad de

carga de AV, como ha sido reportado en otros trabajos (Stuckey y col., 1980; Nieder y col., 1990), sino con la acumulación de acetato.

Con  $A_{V1}$  y  $A_{V2}$ , se observó una acumulación de acetato en el reactor UASB, pero la velocidad de producción de acetato aumentó casi 6 veces con la segunda velocidad de carga alimentada. Nieder y col. (1990) proponen que la ruta metabólica para el consumo del AV puede modificarse con la concentración de sustrato, lo que podría explicar que un cambio de  $A_{V1}$  a  $A_{V2}$  causara un aumento significativo en la velocidad de hidrólisis del AV, pero con una lenta metanogénesis del acetato. Sin embargo, bajo estas condiciones no es posible atribuir la disminución en la producción de metano a un efecto inhibitor del acetato, ya que la velocidad de acumulación de este intermediario es inferior a  $1200 \text{ mg C-Ac L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , concentración que ha sido reportada como inhibitoria para la metanogénesis (Ferry, 1992). Esto sugeriría que la metanogénesis posiblemente disminuyó debido a una baja afinidad de los lodos metanogénicos por este compuesto.

Al comparar la eficiencia de consumo del COT y las velocidades de formación de acetato y  $\text{CH}_4$  en el reactor, al ser alimentado con glucosa y en presencia de AV (Figura 1.1), se observó que al ser alimentado con glucosa se obtuvieron los valores más altos para la  $E_{\text{COT}}$  y  $r_{\text{CH}_4}$ . Con  $A_{V1}$  estas variables disminuyeron un 8 y un 19% respectivamente, y la  $r_{\text{Ac}}$  fue baja, debido que el  $\text{CH}_4$  producido fue por el consumo de las dos fuentes de carbono (AV y glucosa). Sin embargo, con  $A_{V2}$  la  $E_{\text{COT}}$  y la  $r_{\text{CH}_4}$  disminuyeron un 57 y un 54%, respectivamente y la  $r_{\text{Ac}}$  aumentó significativamente, por lo que bajo estas condiciones hubo una disminución significativa en el consumo de acetato y la principal fuente de producción de  $\text{CH}_4$  fue la glucosa. Estos resultados evidenciarían que todo el AV se hidrolizó sin que la glucosa ayudara a mejorar su consumo, y muestran que el AV (en las concentraciones probadas) no fue tóxico o inhibitor de la metanogénesis, por lo que fue necesario realizar ensayos en lote para evaluar el proceso respiratorio de eliminación del AV y las posibles causas de la acumulación del acetato.



**Figura 1.1.** Efecto de la velocidad de carga de AV en la eficiencia de consumo de COT ( $E_{COT}$ , ◆) y en las velocidades de producción de metano ( $r_{CH_4}$ , ▲) y acetato ( $r_{Ac}$ , ○), en el reactor UASB.

## 1.4.2. Ensayos en lote

### 1.4.2.1. Efecto del AV sobre la metanogénesis

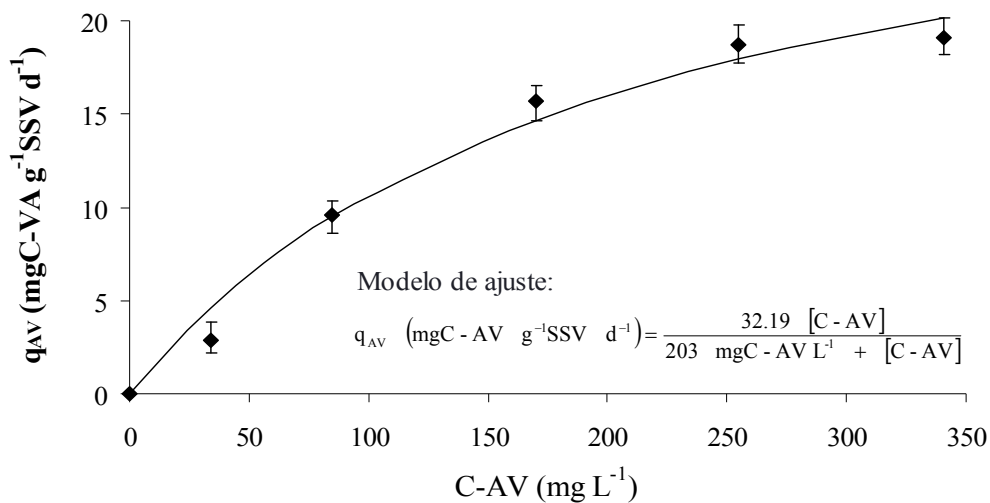
Para evaluar el papel del AV en el proceso respiratorio metanogénico se probaron diferentes concentraciones (de 34 a 341 mg C L<sup>-1</sup>). En la Tabla 2 se muestra que con 34 mg C-AV L<sup>-1</sup>, se obtuvo la mayor eficiencia de eliminación en forma de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (79%), con rendimientos de 0.49 y 0.29, respectivamente. Sin embargo a partir de 85 mg C-AV L<sup>-1</sup> las eficiencias disminuyeron de un 30 hasta 100% y los rendimientos para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disminuyeron significativamente. Esto fue debido a una creciente acumulación de acetato, que representó el 100% a la máxima concentración de AV ensayada (341 mg C-AV L<sup>-1</sup>). En todas las concentraciones probadas, la eficiencia de hidrólisis del AV fue siempre del 100%.

**Tabla 1.2.** Balance de carbono de ensayos con lodos metanogénicos en presencia de diferentes concentraciones de AV.

Carbono inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Carbono final (mg L <sup>-1</sup> )			
	C-Ac	C-AcCHO	C-CH <sub>4</sub>	C-CO <sub>2</sub>
34.1±0.8	4.1±0.7	2.2±0.4	15.2±2.5	8.9±1.2
85.1±2.1	50.5±3.0	2.9±0.6	14.7±4.3	8.1±2.5
169.9±4.2	133.8±6.2	4.1±0.8	9.6±3.9	5.5±2.2
254.9±3.8	218.2±7.6	3.7±0.7	4.9±1.0	2.8±6.6
341.0±3.2	307.2±5.1	ND	ND	ND

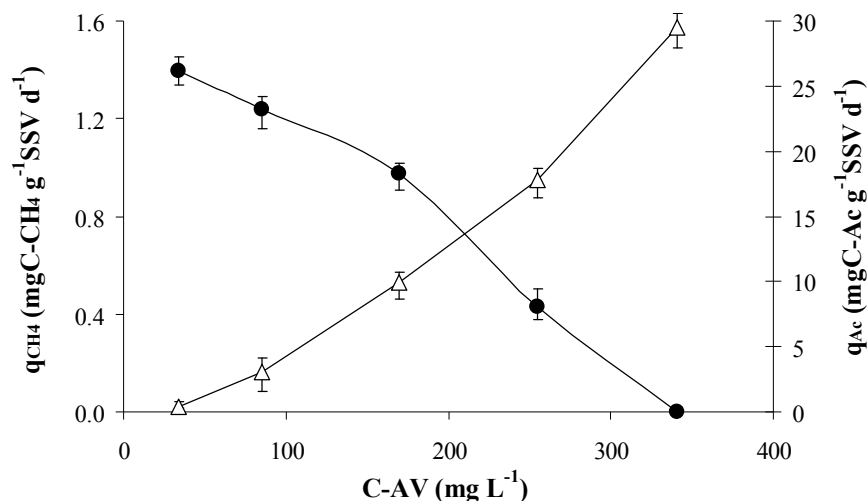
*C-AV*, Carbono de acetato de vinilo; *C-AcCHO*, Carbono de acetaldehído; *C-Ac*, Carbono de acetato; *C-CH<sub>4</sub>*, Carbono de metano; *C-CO<sub>2</sub>*, Carbono de dióxido de carbono; *ND*, no detectado

La Figura 1.2 muestra la velocidad específica de consumo de AV como una función de la concentración del mismo. Se puede observar que el consumo de AV tiene un comportamiento de Monod, con una velocidad específica máxima ( $q_{AVmax}$ ) de  $32.19 \text{ mg C-AV g}^{-1} \text{ SSV d}^{-1}$  y una constante de afinidad ( $K_S$ ) de  $203 \text{ mg C-AV L}^{-1}$ , mostrando que bajo estas condiciones no se presenta un fenómeno de inhibición en el consumo del AV. Estos resultados concuerdan con los observados en el reactor UASB con  $A_{V2}$ , e indican que las altas concentraciones de AV modifican el metabolismo en el lodo, provocando la caída en la producción de  $\text{CH}_4$  debido a un efecto negativo en el consumo del acetato. Estos resultados difieren de lo reportado por Stuckey y col. (1980), quienes mencionan que a concentraciones mayores a  $100 \text{ mg C-AV L}^{-1}$  se inhiben la metanogénesis, atribuyendo este efecto al AV.



**Figura 1.2.** Modelo de ajuste para el consumo de AV bajo condiciones metanogénicas.

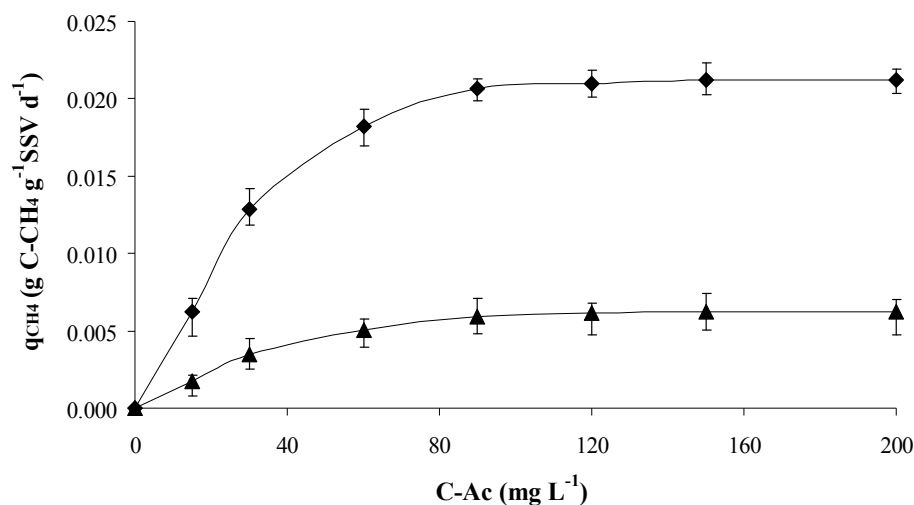
La Figura 1.3 muestra que al incrementarse la concentración de AV la velocidad específica de formación de  $\text{CH}_4$  ( $q_{\text{CH}_4}$ ) disminuye significativamente, provocando un aumento en la velocidad específica de formación de acetato ( $q_{\text{Ac}}$ ). La  $q_{\text{CH}_4}$  no disminuyó debido a las concentraciones de AV, sino que la formación de  $\text{CH}_4$  a partir de acetato es lenta, probablemente por la baja afinidad del lodo metanogénico por el acetato. Hay evidencias de que lodos metanogénicos con arqueas del género *Methanosarcina* presentan valores de  $K_S$  para el acetato altos, en comparación con lodos que contienen preferentemente arqueas del género *Methanosaeta* (Wu y col., 1995; Schmidt & Ahring, 1999).



**Figura 1.3.** Relación aparente entre las velocidades específicas de formación de metano ( $q_{CH_4}$ , ●) y de acetato ( $q_{Ac}$ , △) para diferentes concentraciones de AV.

#### 1.4.2.2. Efecto de la concentración de acetato en la velocidad de producción de CH<sub>4</sub>

Para evaluar el efecto del acetato en la metanogénesis de los lodos del reactor UASB se probaron diferentes concentraciones de acetato (de 0 a 200 mg C-Ac L<sup>-1</sup>), utilizando los lodos del reactor UASB en régimen estacionario cuando fue alimentado con glucosa y después de estar expuesto al AV. Cuando los ensayos se realizaron con el lodo del reactor alimentado con 375 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de glucosa, la eficiencia de consumo de Ac fue siempre del 100%, independientemente de la concentración de Ac probada. Mientras que al utilizar el lodo del reactor después de la exposición a 85 mg C-AV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (A<sub>V2</sub>), se obtuvo un consumo del 100% sólo para las concentraciones de Ac entre 15 y 30 mg C-Ac L<sup>-1</sup>. A partir de 60 mg C-Ac L<sup>-1</sup> la eficiencia de consumo disminuyó hasta un 24% y la  $q_{CH_4}$  del lodo del reactor disminuyó entre 70 y 90% después de que el lodo estuvo expuesto al AV (Figura 1.4). Sin embargo, los rendimientos de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se mantuvieron siempre en  $0.49 \pm 0.04$  y  $0.51 \pm 0.05$ , respectivamente. Estos resultados muestran evidencia de que la exposición del lodo al AV no modificó la ruta de consumo del acetato.



**Figura 1.4.** Velocidad específica de producción de CH<sub>4</sub> ( $q_{CH_4}$ ) como una función de la concentración de acetato, con lodo metanogénico del reactor antes (◆) y después (▲) de estar expuesto al AV.

La velocidad específica de consumo de acetato ( $q_{Ac}$ ), como una función de la concentración de acetato tuvo un perfil de Monod en ambos ensayos, obteniendo ajustes con los resultados del lodo antes y después de estar expuesto al AV (con coeficientes de correlación de 0.978 y 0.985, respectivamente). Las ecuaciones 8 y 9 muestran que la velocidad máxima de consumo de acetato ( $q_{Acmax}$ ) disminuyó un 69% y la  $K_S$  aumentó un 15%, después de exponer los lodos del reactor al AV. Estos resultados confirman que el AV provocó la disminución de la velocidad de consumo, pero no modificó significativamente la afinidad por el acetato. Al comparar nuestros valores de  $K_S$  con los 35.8 mg C-Ac L<sup>-1</sup> reportados por Schmidt & Ahring (1999) para el lodo de un reactor bajo condiciones de operación similares, se observó que no hay diferencias significativas en la afinidad por el acetato para ambos ensayos, sugiriendo que la exposición del lodo al AV durante 350 días afectó a la velocidad a la que se consume el acetato. Estos resultados aportan mayores evidencias de que posiblemente las poblaciones de arqueas acetoclásticas, como el género *Methanosarcina* estén presentes en los lodos y hayan sido las responsables del consumo del acetato, ya que algunos autores señalan que este género es el responsable del consumo de acetato en lodos con bajas velocidades de formación de CH<sub>4</sub> (Wu y col., 1995; Díaz y col., 2006).



Perfil de Monod para el consumo de acetato con el lodo antes de ser alimentado con AV:

$$q_{Ac} \left( \text{mgC-Ac g}^{-1}\text{SSV d}^{-1} \right) = \frac{0.051 [C-Ac]}{32.3 \text{ mgC-Ac L}^{-1} + [C-Ac]} \quad (\text{Ec.8})$$

Perfil de Monod para el consumo de acetato con el lodo expuesto al AV:

$$q_{Ac} \left( \text{mgC-Ac g}^{-1}\text{SSV d}^{-1} \right) = \frac{0.016 [C-Ac]}{38.2 \text{ mgC-Ac L}^{-1} + [C-Ac]} \quad (\text{Ec.9})$$

### 1.5. Conclusiones

En el reactor UASB, hubo una disminución del 53% en la metanogénesis cuando la velocidad de carga se modificó de  $A_{V1}$  a  $A_{V2}$ , y la velocidad de producción de  $\text{CH}_4$  disminuyó un 49%. Con  $A_{V1}$  los principales productos fueron  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , pero con  $A_{V2}$  la producción de acetato fue mayor. El metabolismo de los lodos cambió significativamente cuando las velocidades de carga se modificaron, sin embargo la eficiencia de consumo del AV fue siempre del 100%, indicando que el efecto negativo no está asociado con este sustrato, sino con sus intermediarios. La disminución en la capacidad metanogénica parece estar relacionada con la forma en la que se consume el acetato y con la modificación en la ruta metabólica de consumo del AV. Para los cultivos en lote con diferentes concentraciones de AV, se observó que bajo condiciones metanogénicas no se presentó un efecto inhibitorio por el AV, sin embargo con altas concentraciones fue hidrolizado pero se acumuló como acetato. El estudio cinético con diferentes concentraciones de acetato mostró que el largo periodo de exposición del lodo al AV no modificó la ruta de consumo del acetato. Sin embargo, la velocidad máxima de consumo de acetato ( $q_{Acmax}$ ) disminuyó un 69%, sugiriendo que la exposición del lodo al AV durante 350 días afectó a la velocidad a la que se consume el acetato y parece estar relacionada con la diversidad de las poblaciones microbianas presentes en el lodo.

### 1.6. Referencias

APHA, AWWA and WPCF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. American public health association. Washington, DC.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease) (2008). Public health statement for vinyl acetate. Encyclopedia of earth. Eds. Cutler J. Cleveland. Washington, D.C.
- Araya, P; Aroca, G & Chamy, R (1999). Anaerobic treatment of the effluents from an industrial polymers synthesis plant. Waste Management. 19: 141-146.
- Araya, P; Chamy, R; Mota, M & Alves, M (2000). Biodegradability and toxicity of styrene in the anaerobic digestion process. Biotechnology letters. 22: 1477-1481.
- Chidthaisong, A & Conrad, R (2000). Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulfate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. FEMS microbiology ecology. 31: 73-86.
- Chow, WL; Speece, RE & Siddiqi, RH (1979). Acclimation and degradation of petrochemical wastewater components by methane fermentation. Biotechnology and bioengineering symposium. 8:391-414.
- Conrad, R (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. FEMS microbiology ecology. 28: 193-202.
- Dangcong, P & Xingwen, Z (1994). Effects of the seed sludge on the performance of UASB reactors for treatment of toxic wastewater. Journal of chemical technology and biotechnology. 60: 171-176.
- Díaz, EE; Stams, AJM; Amils, R & Sanz, JL (2006). Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. Applied and environmental microbiology. 72(7): 4942-4949.
- Durán, U; Monroy, O; Gómez, J & Ramírez, F (2008). Biological wastewater treatment for removal resins in UASB reactor: Influence of oxygen. Water science and technology. 57(7): 1047-1052.
- Dwyer, DF & Tiedje, JM (1983). Degradation of Ethylene Glycol and Polyethylene Glycols by Methanogenic Consortia. Applied and environmental microbiology. 46(1): 185-190.

- Dwyer, DF & Tiedje, JM (1986). Metabolism of polyethylene glycol by two anaerobic bacteria, *Desulfovibrio desulfuricans* and a *Bacteroides* sp. Applied and environmental microbiology. 52(4): 852-856.
- Ferry, JG (1992). Methane for acetate. Journal of bacteriology. 174(17): 5489-5495.
- Frimmer, U & Widdel, F (1989). Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria: Growth experiments and enzymatic studies. Archives of microbiology. 152: 479-483.
- Garibay-Orijel, C; Ríos-Leal, E; García-Mena, J & Poggi-Varaldo, HM (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. Journal of chemical technology and biotechnology. 80: 1180-1187.
- Hendriksen, HV; Larsen, S & Ahring, BK (1991). Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate. Water science and technology. 24: 431-436.
- Nieder, M; Sunarko, B & Meyer, O (1990). Degradation of vinyl acetate by soil, sewage, sludge, and the newly isolated aerobic bacterium V2. Applied and environmental microbiology. 56(10): 3023-3028.
- Prager, JC (1998). Environmental contaminant reference databook. Volume 2. Ed. John Wiley & Sons. E.E.U.U. Pps.: 581-593.
- Schink, B (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiology and molecular biology reviews. 61(2): 262-280.
- Schmidt, JE & Ahring, BK (1999) Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. Applied and environmental microbiology. 65(3): 1050-1054.
- Schnürer, A; Schink, B & Svensson, H (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. International journal of systematic bacteriology. 46(4): 1145-1152.
- Stuckey, D; Owen, W & McCarty, PL (1980). Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays. Journal water pollution control federation. 52(4): 720-729.

- Widdel, F (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Applied and environmental microbiology*. 51(5): 1056-1062.
- Wu, MM; Criddle, C & Hickey, R (1995). Mass transfer and temperature effects on substrate utilization by brewery granules. *Biotechnology and bioengineering*. 46: 465-475.
- Wu, W; Thiele, JH; Jain, MK & Zeikus, G (1993). Metabolic properties and kinetics of methanogenic granules. *Applied microbiology and biotechnology*. 39: 804-811.

---

## 2. EFECTO DEL OXIGENO DISUELTO EN LA METANOGENESIS Y MINERALIZACIÓN DEL ACETATO DE VINILO EN LODOS METANOGENICOS

### 2.1. Resumen

En este estudio se evaluaron el efecto del oxígeno disuelto (OD) sobre la metanogénesis del acetato de vinilo (AV) en cultivos en continuo. Se realizaron ensayos en lote con un cultivo axénico de *Brevibacillus agri* (Lara-Mayorga y col., 2010) y lodos metanogénicos de un reactor alimentado con OD, para evaluar el efecto del OD y la ruta de eliminación de AV. Se utilizaron dos reactores (A y B) alimentados con una mezcla de carbono de AV (C-AV) y carbono de glucosa (C-G). El reactor A bajo condiciones metanogénicas se alimentó con dos velocidades de carga de la mezcla de AV y glucosa ( $A_{V1}$  y  $A_{V2}$ ) y el reactor B, inicialmente bajo condiciones metanogénicas, se alimentó con dos velocidades de carga de la misma mezcla ( $B_{V1}$  y  $B_{V2}$ ) y posteriormente alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $B_{V3}$ ). Los ensayos en lote con los lodos metanogénicos se realizaron en presencia de  $1 \text{ mg OD L}^{-1}$  y con concentraciones variables de AV ( $\text{mg C L}^{-1}$ ): 34, 68, 136, 205, 273 y 341. En otros ensayos en lote se evaluó el proceso respiratorio de eliminación de  $34 \text{ mg C L}^{-1}$  de AV, con un cultivo axénico de *B. agri* (Lara-Mayorga y col., 2010) y lodos metanogénicos; alimentados con  $1 \text{ mg OD L}^{-1}$ , en presencia y ausencia de  $30 \mu\text{M}$  de azida sódica.

En ambos reactores fue posible la metanogénesis de  $34 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ). Al operar el reactor A con  $A_{V2}$ , la eficiencia de eliminación y los SSV disminuyeron significativamente, debido a que el AV solo fue hidrolizado acumulándose como acetato y acetaldehído. Debido a que la velocidad de consumo de acetato se vio afectada negativamente, hubo una modificación significativa del metabolismo de los lodos bajo estas condiciones. El reactor B tuvo un comportamiento similar al observado en el reactor A, cuando operó con  $B_{V1}$  y  $B_{V2}$ , sin embargo después de la adición de  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  la eficiencia de eliminación se recuperó y el acetato acumulado se consumió, debido a que el oxígeno aumentó la capacidad oxidativa de los lodos para metanizar y mineralizar este intermediario. Se concluye que bajo condiciones metanogénicas el aumento en la velocidad de carga de AV afectó a la

metanogénesis acetoclástica, mientras que en presencia de OD el acetato acumulado fue mineralizado y metanizado. Los cultivos en lote mostraron que en presencia de OD la metanogénesis no se vio afectada significativamente y la mineralización de una fracción de AV fue llevada a cabo por la participación de microorganismos aerobios como *B. agri*.

En este resumen se presenta de forma general los principales aportes del estudio del efecto del oxígeno disuelto en la metanogénesis del acetato de vinilo, para mayores detalles sobre la metodología y discusión de los resultados obtenidos sobre este tema.

## 2.2. Antecedentes

El acetato de vinilo ( $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$ ) es un compuesto xenobiótico utilizado en la elaboración de suspensiones, emulsiones y resinas poliméricas utilizadas para la fabricación de adhesivos, textiles, revestimientos para papel y pinturas (Daniels, 1983). Sin embargo, el uso desmedido de este compuesto ha provocando serios problemas de contaminación en suelos, aire y cuerpos de agua naturales (ATSDR, 2008). Existen evidencias de que es nocivo para la salud (Suzarte y col., 2004), e incluso en concentraciones mayores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  es letal para la vida acuática (Prager, 1998). Es muy frecuente la presencia de AV en aguas residuales industriales, principalmente las generadas en la industria de las resinas poliméricas, las cuales ya previamente han sido tratadas bajo condiciones metanogénicas por algunos autores (Dangcong y Xingwen, 1994; Araya y col., 1999 y 2000). Sin embargo, la metanogénesis del AV en reactores UASB sólo es posible con velocidades de carga menores a  $60 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , y con velocidades de carga mayores se presenta una disminución del 42% en la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ) y la acumulación de intermediarios tales como el acetato (Durán y col., 2008). El acetato es uno de los principales intermediarios formados por la hidrólisis del AV (Nieder y col., 1990), por lo que algunos autores sugieren que el AV inhibe el consumo de este intermediario bajo condiciones metanogénicas (Stuckey y col., 1980), pero no hay evidencias claras de la forma en que se lleva a cabo esta inhibición. En lodos anaerobios el acetato puede ser consumido por *Methanosarcina*, *Methanosaeta* o por ambas arqueas metanogénicas (Conrad, 1999; Schmidt & Ahring, 1999), sin embargo la velocidad a la que se consume el acetato podría estar relacionada con tres factores: a) el género microbiano presente en los

---

lodos (Ince y col., 2003), b) los mecanismos de activación del acetato los cuales difieren para estos dos géneros (Ferry, 1992; Thauer, 1998), o c) la actividad metabólica que es una función de la concentración de acetato (Peng y col., 2008).

Hay evidencias de que bajo condiciones aerobias la velocidad de eliminación de AV es 10 veces mayor, al compararla con la eliminación bajo condiciones metanogénicas (Nieder y col., 1990); sin embargo, la toxicidad y volatilidad del compuesto (63% en 24 horas) es la principal limitante para su eliminación bajo estas condiciones. Se ha reportado que el OD en concentraciones menores a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  no es tóxico para los lodos metanogénicos (Shen & Guiot, 1995; Ergüder & Demirer, 2005), y algunos autores sugieren que es un efector positivo en la eliminación diversos compuestos químicos recalcitrantes (Guyot y col., 1995; Macarie y col., 2002) por la coexistencia y actividad metabólica de microorganismos aerobios y anaerobios (Kato y col., 1997; Stephenson y col., 1999; Durán y col., 2008). Sin embargo, las evidencias sobre el efecto del oxígeno en los lodos son escasas y no muy claras.

Debido a las limitaciones en el tratamiento de aguas residuales industriales, ya sea bajo condiciones metanogénicas (Castilla y col., 2005) o metanogénesis con OD (Guiot y col., 1993; Corona-Cruz y col., 1999), algunos autores han adicionado donadores de electrones como la glucosa para aumentar la velocidad de eliminación de compuestos químicos recalcitrantes (Hendriksen y col., 1991; Wu y col., 1993; Garibay-Orijel y col., 2005; Duran y col., 2008) y como mecanismo de tolerancia de los lodos metanogénicos al oxígeno (Zitomer & Shrout, 1998; Estrada-Vázquez y col., 2003). No obstante, hasta el momento no se sabe cuál es el papel de la glucosa en el proceso respiratorio de eliminación de estos compuestos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la metanogénesis y mineralización del AV como una molécula modelo, mediante cultivos en continuo, y el efecto del oxígeno en la ruta de eliminación del acetato de vinilo (mediante ensayos en lote con lodos del reactor B en estado estacionario y un cultivo axénico de *B. agri* aislado a partir de estos lodos). La finalidad del trabajo fue entender mejor el papel que juega el oxígeno disuelto en la metanogénesis del acetato de vinilo.

## 2.3. Materiales y Métodos

### 2.3.1. Medio de cultivo

La alimentación de los reactores en continuo y los ensayos en lote se realizaron con el siguiente medio basal ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.703;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.028;  $\text{KCl}$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.111;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 y  $\text{NaCl}$ , 0.297.

### 2.3.2. Cultivos en continuo

Se utilizaron dos reactores UASB de 1.5 L de volumen útil. Se inocularon con 0.5 L ( $33.5 \text{ g}$  sólidos suspendidos volátiles  $\text{L}^{-1}$ ) de lodos procedentes de un digestor anaerobio que trataba aguas residuales de resinas poliméricas (Duran y col., 2008). Los reactores UASB operaron a una temperatura de  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día y una relación C/N de 50. El medio basal fue inicialmente mezclado con glucosa para tener una velocidad de carga de  $375 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Posteriormente, ambos reactores fueron alimentados con una mezcla de carbono de AV (C-AV) y carbono de glucosa (C-G), a dos diferentes velocidades de carga. El reactor A fue utilizado como un control que operó bajo condiciones metanogénicas durante todo el experimento, y el reactor B después de operar 408 días bajo condiciones metanogénicas, fue alimentado con aire puro a un flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  para obtener una concentración de  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en el lodo (Ver Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Velocidades de carga de carbono de AV (C-AV) y carbono de glucosa (C-G), alimentados a los reactores en continuo.

Etapa	OD ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	C-AV ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )	C-G ( $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )
<i>Reactor A (control)</i>			
$A_{V1}$	0	34	338
$A_{V2}$	0	85	281
<i>Reactor B</i>			
$B_{V1}$	0	34	338
$B_{V2}$	0	85	281
$B_{V3}$	1.0	85	281

$A_V$ , Velocidades de carga para el reactor A, que opero bajo condiciones metanogénicas

$B_V$ , Velocidades de carga del reactor B, que fue alimentado con oxígeno en la ultima etapa



### 2.3.3. Ensayos en lote

Los cultivos en lote se realizaron por duplicado en botellas serológicas de 60 mL, con 40 mL de medio de cultivo, a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C, una concentración de inóculo de 33.4 g SSV L<sup>-1</sup> y una relación carbono orgánico total (COT)/SSV de 2. Los lodos para inocular las botellas fueron tomados del reactor B en régimen estacionario cuando era alimentado con 1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de OD (B<sub>V3</sub>). Con los ensayos en lote se evaluaron:

- a) El efecto del oxígeno en la metanogénesis del AV, empleando los lodos metanogénicos alimentados con 1 mg L<sup>-1</sup> de OD y concentraciones variables de AV (mg C L<sup>-1</sup>): 34, 68, 136, 205, 273 y 341. Los ensayos se hicieron en presencia y ausencia de azida sódica (30 μM) como agente inhibidor de la respiración aerobia.
- b) Cinética del proceso respiratorio de eliminación de AV con un cultivo axénico de *B. agri* (Lara-Mayorga y col., 2010) y lodos metanogénicos. Los cultivos fueron alimentados con 1 mg OD L<sup>-1</sup> y 34 mg C L<sup>-1</sup> de AV, en presencia y ausencia de 30 μM de azida sódica.

### 2.3.4. Métodos analíticos

La cuantificación de sólidos suspendidos totales (SST) y SSV, biomasa por peso seco y la producción de biogás por desplazamiento de una solución salina saturada (300 g NaCl L<sup>-1</sup>) a pH de 2, se realizaron de acuerdo con APHA (2005). El carbono orgánico total (TOC) se determinó con un analizador de carbono total (TOC-5000, Shimadzu). Se cuantificó el consumo de acetato de vinilo, la formación de acetato, acetaldehído y etanol mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama empleando una columna AT-1000 (0.53mm x 1.2mm x 10m), operando a temperaturas de 120°C para columna, 130°C para el inyector y 150°C para el detector, con nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 6.6 mL min<sup>-1</sup>. Se cuantificó la composición del biogás (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) por cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (TCD) empleando una columna de Carbosphere 80/100, operando a temperaturas de 140°C para la columna, 190°C para el detector, 170°C para el inyector y utilizando helio a un flujo de 25 mL min<sup>-1</sup> (Durán y col., 2008).

### 2.3.5. Variables de respuesta

El reactor en continuo y los cultivos en lote fueron evaluados mediante el cálculo de las siguientes variables de respuesta: eficiencia de eliminación ( $E(\%) = [\text{mg C-sustrato consumido} / \text{mg C-sustrato alimentado}] * 100$ ), rendimientos de productos ( $Y_{p/s} = \text{mg C-producto formado} / \text{mg C-sustrato consumido}$ ), velocidades volumétricas de consumo de sustratos ( $r_s = \text{mg C-sustrato consumido} / \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), velocidades volumétricas de formación de productos ( $r_p = \text{mg C-producto formado} / \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), velocidades específicas de consumo de sustrato ( $q_s = \text{g C-sustrato consumido} / \text{g}^{-1} \text{SSV} \text{d}^{-1}$ ) y la velocidad específica de formación de  $\text{CH}_4$  ( $q_{\text{CH}_4} = \text{g C-CH}_4 \text{ formado} / \text{g}^{-1} \text{SSV} \text{d}^{-1}$ ).

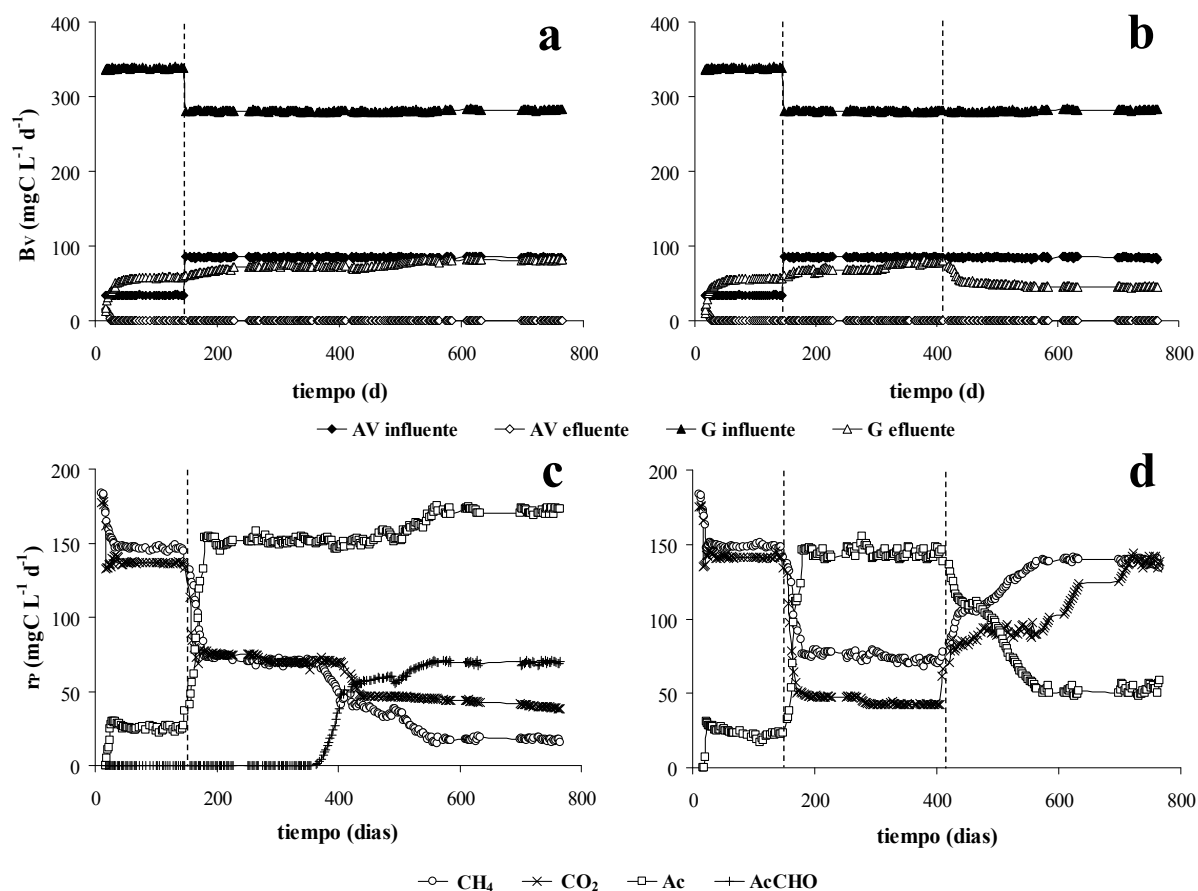
## 2.4. Resultados y Discusión

### 2.4.1. Cultivos en continuo

Los primeros 17 días de operación, los reactores UASB fueron alimentados con glucosa a una velocidad de carga de  $375 \text{ mg C L}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Con ambos reactores en régimen estacionario, la eficiencia de eliminación del carbono fue de  $98 \pm 4\%$ , con una velocidad de formación de  $\text{CH}_4$  de  $184 \pm 6 \text{ mg C L}^{-1} \text{d}^{-1}$  y rendimientos de  $0.50 \pm 0.03$  para  $\text{CH}_4$  y  $0.48 \pm 0.04$  para  $\text{CO}_2$ . Por lo que bajo estas condiciones los lodos de ambos reactores se encontraban metabólicamente estables y se alcanzaron los valores estequiométricos para la metanogénesis de la glucosa (Thauer, 1998). Durante 389 días, ambos reactores operaron bajo condiciones metanogénicas con dos velocidades de carga de la mezcla de AV y glucosa, y los 360 días restantes el reactor A se mantuvo bajo condiciones metanogénicas y el reactor B fue alimentado con  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$  de OD (Tabla 2.1). Bajo estas condiciones de operación ambos reactores fueron evaluados en régimen estacionario, con coeficientes de variación menores a 10% en las principales variables de respuesta.

Con la mezcla inicial de AV y glucosa ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ), ambos reactores presentaron un consumo de AV y glucosa altos ( $30.7 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{d}^{-1}$  y  $287.6 \text{ mg C-G L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectivamente) y se formaron  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  como principales productos (Figuras 2.1c y d). Al modificar la velocidad de carga en el reactor A ( $A_{V2}$ ) el consumo de glucosa disminuyó y no hubo producción significativa de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , debido a que  $158 \text{ mg C L}^{-1} \text{d}^{-1}$  se acumularon como acetato (Ac) y

60 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> como acetaldehído (AcCHO). En este reactor, el aumento en la velocidad de carga de AV provocó la disminución del consumo de Ac y AcCHO, modificando significativamente el metabolismo de los lodos. Durán y col. (2008) al trabajar con resinas poliméricas que contenían 45±5 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV en un reactor UASB, mostraron que la velocidad de consumo del acetato de vinilo fue muy lenta bajo condiciones metanogénicas. Cuando el reactor B operó bajo condiciones metanogénicas y con B<sub>V2</sub>, tuvo un comportamiento similar al reactor A. Sin embargo, después de ser alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> en estado estacionario (B<sub>V3</sub>), tuvo una recuperación del 11% en el consumo de glucosa (Figura 2.1b), la acumulación de Ac disminuyó un 59% y no hubo formación de AcCHO (Figura 2.1d). El carbono alimentado fue metanizado y mineralizado, con un mayor aumento en la producción de CO<sub>2</sub> lo que sugiere que la adición de oxígeno tuvo un efecto positivo en la mineralización del carbono. Shen & Guiot (1995) y Kato y col. (1997) obtuvieron resultados similares en el consumo de sustratos fácilmente asimilables como acetato, glucosa y sacarosa por lodos metanogénicos, donde se logró aumentar significativamente la velocidad de consumo y la eficiencia de eliminación después de adicionar concentraciones de OD menores a 2 mg L<sup>-1</sup>. Stephenson y col. (1999) mencionan que la participación de microorganismos aerobios o facultativos en el proceso respiratorio mantienen un ambiente reducido para una mejor actividad de las arqueas metanogénicas, logrando la metanización y mineralización del carbono consumido.



**Figura 2.1.** Perfil de consumo de sustratos: AV y G. Perfil de formación de productos:  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , acetato (Ac) y acetaldehído (AcCHO). En reactores A (a y c) y B (b y d), respectivamente.

Al operar ambos reactores bajo condiciones metanogénicas y con la velocidad de carga inicial ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ), el  $91 \pm 4\%$  del carbono fue eliminado como  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, en el reactor A el aumento de la velocidad de carga a  $A_{V2}$  provocó una disminución del 69% en la eliminación del carbono, las velocidades de formación para  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  cayeron 71 y 70% respectivamente, y los rendimientos de los productos se modificaron (Tabla 2.2). Bajo estas mismas condiciones y con  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , el AV solamente fue hidrolizado a acetato y acetaldehído. Estos resultados son similares a los reportados por Nieder y col. (1990) quienes probaron que al utilizar lodos metanogénicos como inóculo, el AV en concentraciones mayores a  $100 \text{ mg C L}^{-1}$  sólo es hidrolizado, produciendo acetato y acetaldehído. Además, hubo una reducción en los SSV con respecto a los  $33.5 \text{ g SSV L}^{-1}$  inoculados inicialmente (Tabla 2.2), lo que sugiere un efecto selectivo del AV sobre las poblaciones de

microorganismos que participan en el proceso respiratorio. Dado que hay una relación entre la concentración de inóculo y la actividad metabólica de los microorganismos presentes en lodos granulares anaerobios (Díaz y col., 2006), el consumo de acetato podría depender de los géneros de bacterias metanogénicas presentes, ya que la afinidad por el acetato (relacionada con el valor de  $K_S$ ) es menor cuando las bacterias metanogénicas acetoclásticas presentes son del género *Methanosaeta* y aumenta cuando el género *Methanosarcina* está presente (Ferry, 1992). En estos términos, los resultados muestran que con las dos velocidades de carga estudiadas la eficiencia de consumo del AV fue siempre del 100%, pero el aumento en la velocidad de carga ( $B_{V2}$ ) afectó al consumo de acetato, provocando una disminución en la velocidad a la que se consume.

El reactor B tuvo un comportamiento similar al reactor A cuando operó con  $B_{V1}$  y  $B_{V2}$ , pero cuando fue alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  se observó un aumento de 12% en la eficiencia de consumo de glucosa, las velocidades de formación de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  aumentaron 45 y 33%, respectivamente. Bajo estas condiciones la acumulación de acetato disminuyó y la producción de  $\text{CO}_2$  aumentó (Tabla 2.2). Por lo tanto, la adición de oxígeno aumentó la capacidad oxidativa de los lodos para metanizar y mineralizar el acetato acumulado. Algunos trabajos han evidenciado un aumento en la eficiencia de consumo y cambios en la composición del biogás en reactores metanogénicos alimentados con bajas velocidades de carga de oxígeno, posiblemente por la participación de bacterias aerobias o facultativas en el proceso respiratorio (Kato y col., 1997; Zitomer & Shrouf, 1998; Estrada-Vázquez y col., 2003). En este reactor los SSV no presentaron cambios significativos (Tabla 2.2), probablemente porque la adición de  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  disminuyó el efecto del AV sobre los microorganismos y promovió el crecimiento y participación de microorganismos facultativos o aerobios en el metabolismo. Existen evidencias que sugieren que la tolerancia al oxígeno de lodos metanogénicos se debe a que los microorganismos aerobios presentes en el lodo actúan como un mecanismo de tolerancia al oxígeno (Shen & Guiot, 1996; Kato y col., 1997). Ergüder & Demirer (2005) comprobaron que después de adicionar bajas concentraciones de OD a lodos metanogénicos hubo un aumento de los SSV y la formación de gránulos estables con mineralización y metanogénesis simultáneas.

**Tabla 2.2.** Variables de respuesta: eficiencias de consumo (E), rendimientos de productos (Y), concentración de biomasa (SSV) y velocidades de formación de productos ( $r_p$ ) en reactores.

Variable	Reactor A (control)		Reactor B		
	AV1	AV2	BV1 <sup>(a)</sup>	BV2 <sup>(b)</sup>	BV3
<b>E (%)</b>					
E <sub>COT</sub>	89.7±2.2	27.9±6.2	91.4±2.9	42.5±4.4	83.0±5.2
E <sub>AV</sub>	99.5±2.1	100.0±1.0	98.9±1.7	100±1.6	100±2.2
E <sub>GLU</sub>	85.0±4.3	75.2±5.5	85.3±3.2	74.2±4.1	84.7±6.4
<b>Y (mg producto formado mg<sup>-1</sup> de sustrato consumido)</b>					
Y <sub>CH4</sub>	0.47±0.02	0.14±0.03	0.47±0.05	0.21±0.06	0.42±0.03
Y <sub>CO2</sub>	0.43±0.04	0.14±0.01	0.44±0.04	0.18±0.04	0.41±0.07
Y <sub>Ac</sub>	0.08±0.03	0.52±0.07	0.07±0.01	0.48±0.05	0.17±0.01
Y <sub>AcCHO</sub>	ND	0.20±0.02	ND	0.07±0.02	ND
<b>VSS (g L<sup>-1</sup>)</b>					
	28.8±2.3	12.8±1.9	29.5±3.4	25.8±2.5	25.2±3.3
<b>r<sub>p</sub> (mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>					
r <sub>CH4</sub>	148.2±3.8	42.9±5.6	149.6±3.2	76.1±5.0	138.9±11.1
r <sub>CO2</sub>	136.8±1.6	41.7±4.6	141.5±1.4	45.1±3.4	136.9±8.9
r <sub>Ac</sub>	26.0±6.8	158.2±9.3	23.9±7.0	136.0±3.7	55.6±8.0
r <sub>AcCHO</sub>	ND	60.3±5.3	ND	19.8±2.5	ND

<sup>(a), (b)</sup> En estas etapas el reactor operó bajo condiciones metanogénicas; ND, no detectado

## 2.4.2. Ensayos en lote

### 2.4.2.1. Papel del oxígeno sobre la metanogénesis del AV

Para entender el papel del oxígeno en la eliminación del AV bajo condiciones metanogénicas, se utilizó azida sódica que ha sido reportada como un inhibidor del ciclo de Krebs (Ginestet y col., 1998). El balance de masa de carbono de los ensayos con azida mostró que con 34 y 68 mg C L<sup>-1</sup> el AV fue metanizado y sólo una pequeña fracción del carbono inicial se acumuló como acetato. Pero, a partir de 136 mg C-AV L<sup>-1</sup> la mayoría del carbono se acumuló como Ac y la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> disminuyeron hasta ser el Ac el único producto formado en la concentración más alta de AV (Ver Tabla 2.3). Sin embargo, en los ensayos sin azida con concentraciones de 34 a 136 mg C-AV L<sup>-1</sup>, no hubo acumulación de Ac y todo el carbono se metanizó y mineralizó. A partir de 205 mg C-AV L<sup>-1</sup> hubo acumulación de Ac, pero la metanogénesis y mineralización del AV fue mayor que en las pruebas con azida, lo que indica que el oxígeno modificó el metabolismo del AV en los lodos y promovió la eliminación del AV como CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> aún en altas concentraciones. Estos resultados sugieren que el acetato formado por la hidrólisis del AV bajo condiciones metanogénicas fue eliminado por dos rutas distintas: metanogénesis acetoclástica y ciclo de Krebs cuando el oxígeno estuvo presente.

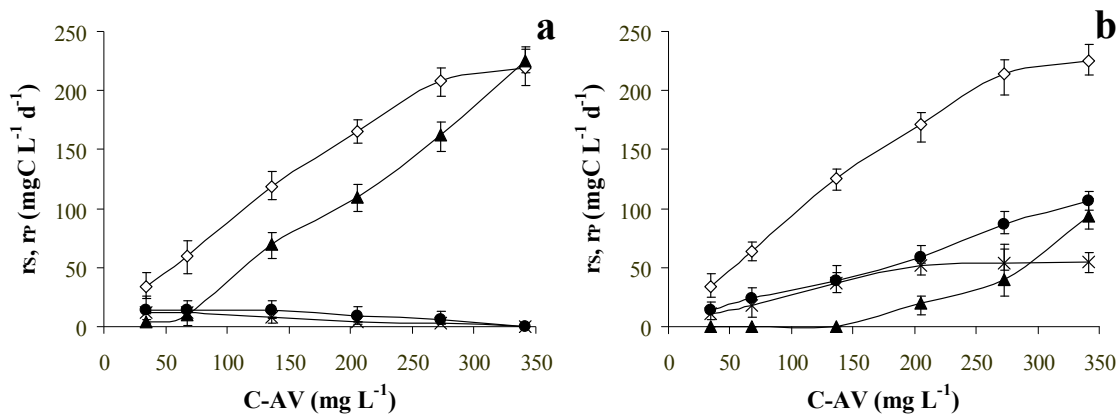
Esto concuerda con lo reportado por Nieder y col. (1990), quienes estudiaron la eliminación del AV con un cultivo axénico aerobio y propusieron que el acetato formado por la hidrólisis del AV es asimilado por el ciclo de Krebs.

**Tabla 2.3.** Balance de masa de carbono en cultivos en lote con lodos metanogénicos con 1 mg OD L<sup>-1</sup>, en presencia y ausencia de azida sódica.

Carbono inicial (mg L <sup>-1</sup> ) C-AV*	Carbono final (mg L <sup>-1</sup> )			
	C-Ac	C-AcCHO	C-CO <sub>2</sub>	C-CH <sub>4</sub>
<b>Lodos metanogénicos con 1 mg OD L<sup>-1</sup> + azida sódica</b>				
34.1±2.1	5.4±2.0	ND	11.2±3.6	14.1±8.3
68.2±3.0	21.4±4.1	ND	16.9±2.7	23.0±3.2
136.3±4.0	84.7±4.3	5.7±1.3	11.0±7.4	21.6±6.2
204.5±3.6	149.1±5.3	7.8±3.3	9.3±5.2	18.2±4.3
272.6±5.5	226.5±5.1	5.8±2.3	4.5±3.1	8.9±2.1
340.8±7.1	307.6±6.2	ND	ND	ND
<b>Lodos metanogénicos con 1 mg OD L<sup>-1</sup></b>				
34.1±2.1	ND	ND	13.5±2.6	16.8±3.0
67.3±1.9	ND	ND	27.8±4.3	33.7±4.4
135.9±4.0	ND	ND	55.0±5.3	67.5±8.5
204.8±6.3	20.1±3.2	ND	73.0±3.3	91.3±8.3
272.1±8.3	44.0±6.4	ND	88.3±7.4	113.3±9.2
340.4±6.2	102.4±8.3	ND	86.4±4.7	117.7±14.4

\*9.7% del AV inicial se volatilizó; ND, no detectado

Las velocidades de consumo de AV ( $r_{AV}$ ) fueron similares en ambos ensayos, sugiriendo que bajo condiciones metanogénicas y en presencia de oxígeno la hidrólisis del AV es independiente del oxígeno disuelto (Figura 2.2). Los lodos en presencia de azida tuvieron una alta velocidad de formación de acetato ( $r_{Ac}$ ) y las velocidades de formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> no fueron significativas. Los resultados de estos ensayos muestran que debido a la presencia de azida sódica, los lodos presentaron un perfil respiratorio similar al observado bajo condiciones metanogénicas. En los lodos en presencia de 1 mg OD L<sup>-1</sup>, las velocidades de formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> aumentaron proporcionalmente con la concentración de AV. Estos resultados sugieren que la adición de OD a los lodos diversificó las poblaciones microbianas, aumentando las aerobias como *B. agri* (Lara-Mayorga y col., 2010) y favoreciendo la mineralización de una fracción del AV. Existen reportes sobre el aislamiento de bacterias aerobias estrictas y facultativas a partir de lodos anaerobios (Assih y col., 2002; Ouattara y col., 2003; Rapheal y col., 2003), que participan en el metabolismo cuando los lodos son alimentados con bajas concentraciones de OD.

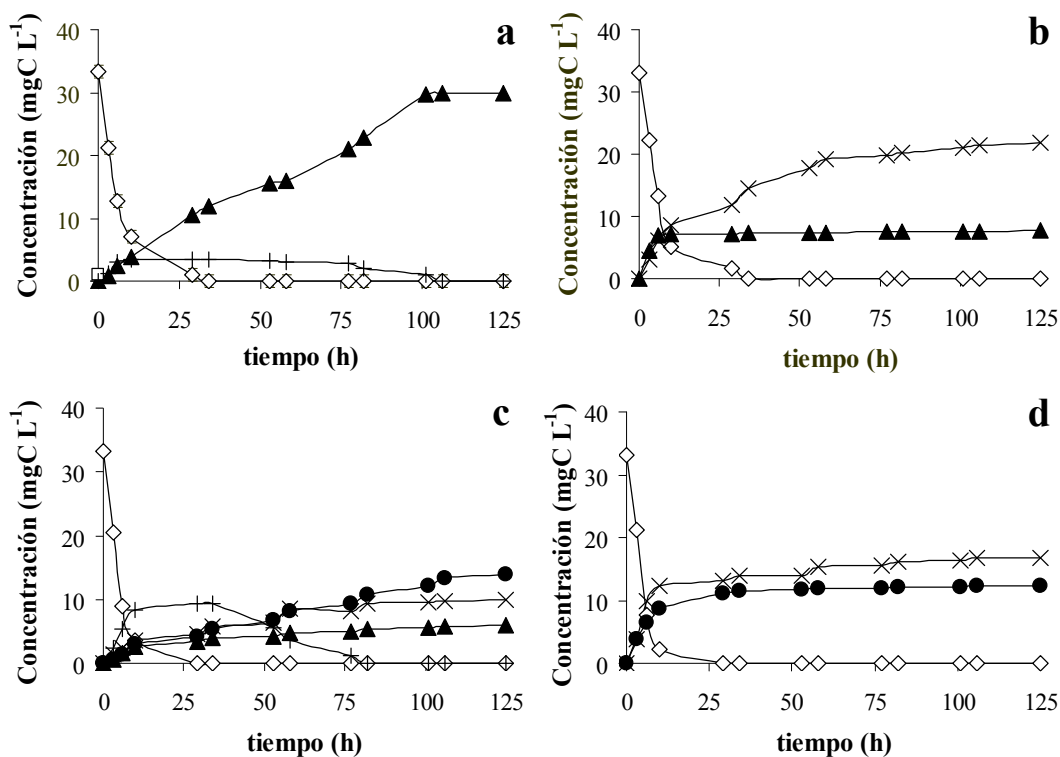


**Figura 2.2.** Velocidades de hidrólisis de AV ( $\diamond$ ) y velocidades de formación de acetato ( $\blacktriangle$ ),  $\text{CO}_2$  ( $\times$ ) y  $\text{CH}_4$  ( $\bullet$ ), en cultivos en lote. Utilizando lodos metanogénicos con  $1.0 \text{ mg OD L}^{-1}$ , en presencia (a) y ausencia (b) de azida sódica.

#### 2.4.2.2. Proceso respiratorio de eliminación de AV con un cultivo axénico de *Brevibacillus agri* y lodos metanogénicos

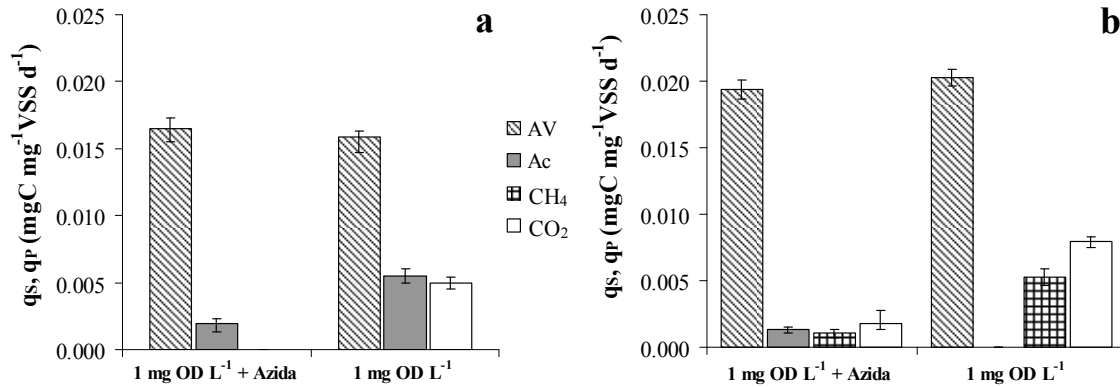
Se realizó un estudio comparativo del proceso respiratorio de eliminación de AV, con lodos metanogénicos y con *B. agri* aislado a partir de estos lodos (Lara-Mayorga y col., 2010). Los ensayos del cultivo axénico con azida, muestran que el AV se acumuló como acetato, debido a la presencia del inhibidor del ciclo de Krebs (Fig. 2.3a). En los lodos con azida hubo metanogénesis del AV, aunque una fracción del acetato no fue consumido (Fig. 2.3c). Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos en presencia de OD y sin inhibidor, el metabolismo se modificó. En el cultivo axénico el 80% del AV fue mineralizado, debido a que la concentración de OD era menor a la estequiométrica para la completa mineralización del AV (Fig. 2.3b). Con el lodo metanogénico hubo un 100% de eliminación de AV, porque una fracción del acetato fue mineralizado por el cultivo axénico y otra parte fue convertida en  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  por las arqueas metanogénicas (Fig. 2.3d). Esto evidenciaría que *Brevibacillus agri* participa en la eliminación del AV en estos lodos, como ya ha sido mencionado anteriormente por Lara-Mayorga y col. (2010).





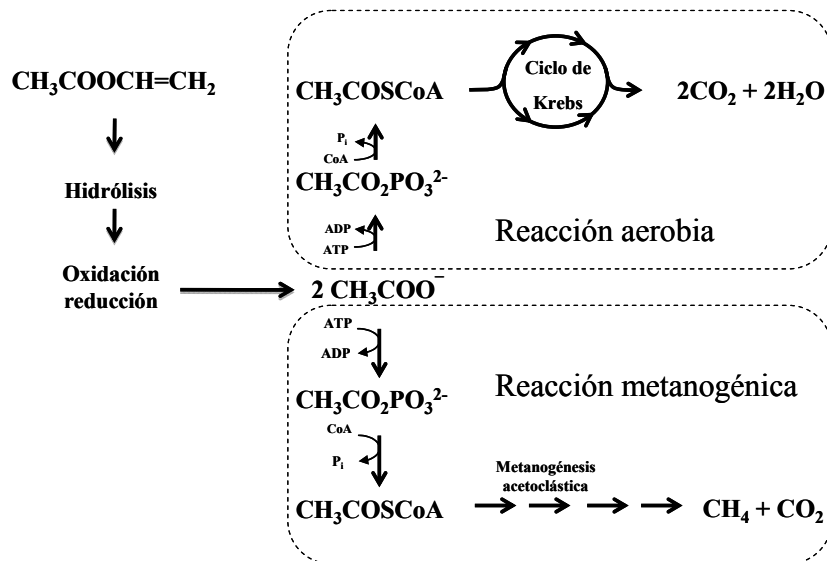
**Figura 2.3.** Perfil respiratorio de AV con 1.0 mg OD L<sup>-1</sup>. (a, b) *B. agri* y (c, d) lodos metanogénicos, en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de azida sódica. AV (◇) Ac (▲) CH<sub>4</sub> (●), CO<sub>2</sub> (×) y acetaldehído (+).

Las velocidades específicas de consumo de AV fueron mayores en un 19% en los ensayos realizados con el lodo metanogénico (Figura 2.4b), pero las velocidades en presencia y ausencia de azida no presentaron diferencias significativas, evidenciado que la azida y el OD no afectaron la velocidad a la que se consume el AV. En los ensayos con azida la velocidad específica de formación de acetato ( $q_{Ac}$ ) fue mayor para el cultivo axénico (Figura 2.4a), debido a que en el lodo las velocidades específicas de formación de CH<sub>4</sub> ( $q_{CH_4}$ ) y CO<sub>2</sub> ( $q_{CO_2}$ ) fueron muy similares a ésta. En los ensayos sin azida y con 1 mg L<sup>-1</sup> de OD del cultivo axénico la  $q_{Ac}$  y  $q_{CO_2}$  fueron similares, indicando que la velocidad a la que se forma acetato es la misma a la que se mineraliza, aunque una parte del acetato no se haya consumido. En el lodo metanogénico, las  $q_{CH_4}$  y  $q_{CO_2}$  aumentaron 78 y 77% respectivamente, con una mayor velocidad de producción de CO<sub>2</sub>. Esto estaría reflejando la actividad aerobia en los lodos, debida a la presencia de oxígeno.



**Figura 2.4.** Velocidades específicas de consumo de acetato de vinilo ( $q_{AV}$ ) y velocidades específicas de formación de acetato ( $q_{Ac}$ ), metano ( $q_{CH_4}$ ) y dióxido de carbono ( $q_{CO_2}$ ). (a) *B. agri* y (b) lodos metanogénicos.

Mediante estas evidencias se propone la siguiente ruta de eliminación de AV con los lodos metanogénicos alimentados con oxígeno (Figura 2.5), que surge del balance de masa de ambos ensayos. En presencia de azida la fracción de acetato acumulada fue por la inhibición de la entrada de este compuesto en el ciclo de Krebs y en ausencia de azida el oxígeno no afectó significativamente a la metanogénesis, por lo que el AV se elimina completamente.



**Figura 2.5.** Ruta propuesta para la eliminación del AV en lodos metanogénicos en presencia de oxígeno.

## 2.5. Conclusiones

En ambos reactores fue posible la metanogénesis de  $34 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ). Al operar el reactor A con  $A_{V2}$ , la eficiencia de eliminación y los SSV disminuyeron significativamente, debido a que el AV sólo fue hidrolizado acumulándose como acetato y acetaldehído. Cuando el reactor B operó con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $B_{V3}$ ), la eficiencia de eliminación se recuperó, los SSV permanecieron sin cambios y la acumulación de acetato disminuyó un 41%. Se concluye que bajo condiciones metanogénicas el aumento en la velocidad de carga afectó la metanogénesis acetoclástica, mientras que en presencia de OD el acetato acumulado fue mineralizado y metanizado. Los cultivos en lote mostraron que en presencia de OD la metanogénesis no se vio afectada significativamente y la mineralización de una fracción de AV fue llevada a cabo por la participación de microorganismos aerobios como *B. agri*.

## 2.6. Referencias

- APHA, AWWA and WPCF (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st edition. American public health association. Washington, DC.
- Araya, P; Aroca, G & Chamy, R (1999). Anaerobic treatment of the effluents from an industrial polymers synthesis plant. Waste management. 19: 141-146.
- Araya, P; Chamy, R Mota; M & Alves, M (2000). Biodegradability and toxicity of styrene in the anaerobic digestion process. Biotechnology letters. 22: 1477-1481.
- Assih, EA; Ouattara, AS; Thierry, S; Cayol, J-L; Labat, M & Macarie, H (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. International journal systematic evolution microbiology. 52: 559-568.
- Castilla P; Leyva, A; García, U; Monroy, O & Meraz, M (2005). Treatment of a low concentration industrial chemicals mixture in an UASB reactor. Water science and technology. 52(1-2): 385-390.

- Conrad, R (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS microbiology ecology*. 28:193-202.
- Dangcong, P & Xingwen, Z (1994). Effects of the seed sludge on the performance of UASB reactors for treatment of toxic wastewater. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 60: 171-176.
- Daniels, W (1983). Vinyl acetate monomer, in, Mark, H.F., Othmer, D.F., Overberger, C.G., Seaborg, G.T & Grayson, N. (Eds.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 3rd Ed., Vol. 23, New York, John Wiley & Sons, pp. 817-847
- Díaz, EE; Stams, AJM; Amils, R & Sanz, JL (2006). Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and environmental microbiology*. 72(7): 4942-4949.
- Durán, U; Monroy, O; Gómez, J & Ramírez, F (2008). Biological wastewater treatment for removal resins in UASB reactor: Influence of oxygen. *Water science and technology*. 57(7): 1047-1052.
- Eichler, B & Schink, B (1985). Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Archives of microbiology*. 143: 60-66.
- Ergüder, TH & Demirer, GN (2005). Granulation of a mixture of suspended anaerobic and aerobic cultures under alternating anaerobic/microaerobic/aerobic conditions: a preliminary study. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80(7): 837-842(6).
- Estrada-Vázquez, C; Macarie, H; Kato, MT; Rodríguez-Vázquez, R; Esparza-García, F & Poggi-Varaldo, HM (2003). The effect of the supplementation with a primary carbon source on the resistance to oxygen exposure of methanogenic sludge. *Water science and technology*. 48(6): 119-124.
- Ferry, JG (1992). Methane for acetate. *Journal of bacteriology*. 174(17): 5489-5495.

- Garibay-Orijel, C; Ríos-Leal, E; García-Mena, J & Poggi-Varaldo, HM (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80: 1180-1187.
- Ginestet, P; Audic, J-M; Urbain, V & Block, J-C (1998). Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and environmental microbiology*. 64(6): 2266–2268.
- Guiot, SR; Frigon, JC; Darrah, B; Landry, MF & Macarie, H (1993). Aerobic and anaerobic synchronous treatment of toxic wastewater. In proc. of the 7th forum for applied biotechnology. 29 September-1 October 1993. Gent, Belgium. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 58(4a): 1761-1769.
- Guyot, JP; Ferrer, H & Ramírez, F (1995). Methane production from acetamide in an upflow anaerobic sludge-blanket reactor based on a synergistic association between an aerobic rod and methanogens. *Applied microbiology and biotechnology*. 43: 1107-1111.
- Ince, BK; Ince, O & Ayman ON (2003). Changes in acetoclasticmethanogenic activity and microbial composition in an upflow anaerobic filter. *Water, air and soil pollution*. 144: 301-315.
- Kato, MT; Field, JA & Lettinga, G (1997). Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Brazilian journal of chemical engineering*. 14(4): 1-15.
- Lara-Mayorga, I; Durán-Hinojosa, U; Arana-Cuenca, A; Monroy-Hermosillo, O & Ramírez-Vives, F (2009). Vinyl acetate degradation by *Brevibacillus agri* isolated from a slightly aerated methanogenic reactor. *Environmental technology*. 31(1): 1-6.
- Macarie, H; Ahring, BK; Rinderknecht-Seijas, N & Poggi-Varaldo, HM (2002). A review on bioreactors with simultaneous electron acceptors for removal of recalcitrant and toxic compounds. 5th IWA chemical industry group conference. O. Thomas, J.R. Degorce-Dumas, B. Roig (Eds.). Nimes, Francia, 13-14/11/02, pp. 149-156.

- Mosquera-Corralla, A; de Kreukb, MK; Heijnenb, JJ & van Loosdrechtb, MCM (2005). Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water research*. 39: 2676–2686.
- Nieder, M; Sunarko, B & Meyer, O (1990). Degradation of vinyl acetate by soil, sewage, sludge, and the newly isolated aerobic bacterium V2. *Applied and environmental microbiology*. 56(10): 3023-3028.
- Ouattara, AS; Assih, EA; Thierry, S; Cayol, J-L; Labat, M; Monroy, O & Macarie, H (2003). *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. *International journal of systematic evolution and microbiology*. 53: 1247-1251.
- Peng, J; Lu, Z; Rui, J & Lu, Y (2008). Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and environmental microbiology*. 74(9): 2894-2901.
- Phuea, J-N & Shiloach, J (2005). Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic engineering*. 7(5-6): 353-363.
- Prager, JC (1998). *Environmental contaminant reference databook*, first ed. John Wiley & Sons. E.E.U.U.
- Rapheal, SV; Swaminathan, KR; & Lalitha K (2003). Metabolic characteristics of an aerobe isolated from a methylotrophic methanogenic enrichment culture. *Journal of bioscience*. 28(2): 235-242.
- Schink, B (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and molecular biology reviews*. 61(2): 262-280.
- Schmidt, JE & Ahring, BK (1999). Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Applied and environmental microbiology*. 65(3): 1050-1054.

- Schnürer, A; Schink, B & Svensson, H (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. International journal of systematic bacteriology. 46(4): 1145-1152.
- Shen, CF & Guiot, SR (1996). Long-term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules. Biotechnology & bioengineering. 49: 611-620.
- Stephenson RJ; Patoine, A; Guiot, SR (1999). Effects of oxygenation and upflow liquid velocity on a coupled anaerobic/aerobic reactor system. Water research. 33(12): 2855-2863.
- Stuckey, D; Owen, W & McCarty, PL (1980). Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays. Journal of water pollution (control federal). 52(4): 720-729.
- Suzarte, A; González, A & Arias, A (2004). Toxicidad del acetato de vinilo (monómero). CENIC ciencias biológicas. 35(1): 2004.
- Thauer, RK (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. Microbiology. 144: 2377-2406.
- Widdel, F (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Applied microbiology and biotechnology. 51(5): 1056-1062.
- Wu, W; Bhatnagar, L & Zeikus, G (1993). Performance of anaerobic granules for degradation of pentachlorophenol. Applied and environmental microbiology. 59(2): 389-397.
- Zitomer, DH & Shrout, JD (1998). Feasibility and benefits of the methanogenesis under oxygen-limited conditions. Waste management. 18: 107-116.

---

### 3. ANÁLISIS POBLACIONAL DE ARQUEAS Y BACTERIAS MEDIANTE DGGE DE DOS REACTORES EN CONTINUO UTILIZADOS EN LA ELIMINACIÓN DEL ACETATO DE VINILO

#### 3.1. Resumen

Esta parte del trabajo describe el análisis molecular mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) de las poblaciones de bacterias y arqueas presentes en los lodos de dos reactores UASB (A y B), en presencia de acetato de vinilo (AV) y glucosa (G), en condiciones metanogénicas (reactor A) y con 1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto (OD) (reactor B). Se utilizaron muestras de 5 g, por triplicado, del lodo de los reactores en régimen estacionario. Para llevar a cabo este análisis las muestras de lodo se tomaron en las diferentes etapas de operación: antes de inocular los reactores (t<sub>0</sub>), cuando estuvieron operando con 34 mg C-AV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (A<sub>V1</sub> y B<sub>V1</sub>), con 85 mg C-AV L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (A<sub>V2</sub> y B<sub>V2</sub>) y una última muestra del reactor B después de ser alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (B<sub>V3</sub>). El análisis se realizó mediante la extracción de DNA y PCR de las regiones V2-V3 de los genes de arqueas y V6-V8 de genes bacterianos del rDNA 16S, para posteriormente ser separadas por DGGE y secuenciadas.

El perfil de las bandas del 16S rDNA DGGE de arqueas no mostró cambios significativos y se lograron identificar dos poblaciones de arqueas metanogénicas acetoclásticas, *Methanosarcina barkeri* que estuvo presente en ambos reactores en todas las condiciones de operación evaluadas, y *Methanosaeta concilli* que tiende a desaparecer a partir de que los reactores fueron alimentados con 85 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV. El perfil de bandas de 16S rDNA DGGE del dominio bacteria mostró la desaparición de una gran mayoría de las bandas que correspondían a bacterias anaerobias estrictas, cuando ambos reactores fueron alimentados con 34 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV. Sin embargo, cuando el reactor B fue alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> se observó la aparición de nuevas bandas, algunas de ellas identificadas como bacterias aerobias. Destaca la presencia de *Brevibacillus agri*, que está reportada como una bacteria aerobia y que fue aislada a partir de estos lodos metanogénicos.



En este resumen se presentan de forma general los principales aportes del estudio molecular de las poblaciones de arqueas y bacterias de dos reactores UASB. A continuación se presentan mayores detalles sobre la metodología y discusión de los resultados obtenidos.

### **3.2. Antecedentes**

Como se ha mencionado, el monómero de AV ( $\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$ ) es un compuesto químico versátil con una gran importancia económica. Se utilizan aproximadamente 3.2 millones de toneladas al año de este compuesto en la fabricación de polímeros sintéticos y resinas poliméricas, utilizados en la elaboración de plásticos, lacas, adhesivos, tintas, emulsiones a base de agua (pinturas), fibras acrílicas, pegamentos y textiles (Daniels, 1983). Sin embargo, el AV ha sido utilizado hasta la fecha sin evaluar los futuros riesgos para la salud y su potencial de contaminación, por lo que es frecuente su presencia en las aguas residuales provocando serios problemas de contaminación en suelo, aire y cuerpos de agua naturales (ATSDR, 2008).

Algunos autores han realizado el tratamiento de aguas residuales con AV bajo condiciones metanogénicas (Dangcong y Xingwen, 1994; Araya y col., 1999 y 2000). Hay evidencias de que concentraciones de AV mayores a  $85 \text{ mg C L}^{-1}$  inhiben la metanogénesis (Stuckey y col., 1980). No obstante, hasta el momento no existen reportes de la forma en que el AV inhibe a la metanogénesis, aunque posiblemente se deba a un efecto selectivo del compuesto sobre las poblaciones microbianas presentes en los lodos. Por otro lado, hay evidencias que sugieren que el OD en concentraciones menores a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  no es tóxico o inhibitorio para los lodos metanogénicos (Shen & Guiot, 1995; Ergüder & Demirer 2005), y podría ser un efector positivo en la eliminación del AV (Durán y col., 2008) por la actividad metabólica de microorganismos aerobios y anaerobios en un mismo reactor (Kato y col., 1997; Stephenson y col., 1999; Macarie y col., 2002).

Muchos microorganismos presentes en lodos granulares no son cultivables o son difíciles de cultivar por métodos tradicionales de microbiología (Atlas y col., 1992). Hay evidencias de que en la caracterización de la composición microbiológica de los lodos anaerobios los

---

métodos clásicos son muy lentos (Briones y Raskin, 2003) y pueden resultar poco útiles para identificar a las poblaciones presentes en sistemas complejos (Felske y col., 1997). Los métodos moleculares, por el contrario, son de gran utilidad para estimar de forma rápida la diversidad microbiana y la composición en estos sistemas (Amann y col., 1995). Actualmente la DGGE-secuenciación ha sido una de las herramientas más útiles para estudiar la dinámica poblacional (Muyzer y col., 1993 y 1996) y para identificar los microorganismos presentes en estos sistemas (Casserly y Erijman, 2003; Nielsen y col., 2004). En los estudios de perfiles de bandas de DGGE, las similitudes entre los patrones de bandas por presencia/ausencia, se pueden expresar como un porcentaje de similitud mediante los coeficientes de Jaccard (Díez y col., 2001) o Dice (Van der Gucht y col., 2001).

Son escasos los estudios sobre el efecto selectivo del AV en las poblaciones microbianas presentes en lodos metanogénicos, en presencia y ausencia de oxígeno disuelto. De tal forma, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la dinámica de las poblaciones de arqueas y bacterias por medio de DGGE-secuenciación de los lodos de dos reactores UASB alimentados con AV y glucosa, bajo condiciones metanogénicas y en presencia de  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . En consecuencia, el objetivo del trabajo fue entender el efecto del AV sobre las poblaciones presentes bajo condiciones metanogénicas y el papel que juega el oxígeno en la dinámica de éstas.

### **3.3. Materiales y Métodos**

#### **3.3.1. Muestreo de reactores en continuo**

Para el estudio molecular, se tomaron por triplicado 5 g de lodo de dos reactores UASB que operaron bajo condiciones diferentes, en régimen estacionario. Las muestras de lodo de ambos reactores se tomaron antes de inocular los reactores ( $t_0$ ), cuando fueron alimentados con  $34 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ), cuando estuvieron operando con  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $A_{V2}$  y  $B_{V2}$ ) y se tomo una última muestra del reactor B después de ser alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $B_{V3}$ ). Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 minutos y congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta la extracción del DNA.

### 3.3.2. Extracción de DNA

Se realizó con el kit de extracción UltraClean™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA), verificando la cantidad y rendimiento del DNA por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) a 90 voltios (V) durante 1 hora. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó con un transluminador de luz ultravioleta.

### 3.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La región V2-V3 de los genes de arqueas del 16S rDNA fue amplificada usando los iniciadores A109 (T)-f (5'-ACTGCTCAGTAACACGT-3') y 515-r (5'-ATCGTATTACCGC GGCTGCTGCTGGCAC-3') con grapa (Lane, 1991; Muyzer y col., 1993; Grosskopf y col., 1998), con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos con una desnaturalización a 95 °C durante 30 seg (desnaturalización), una hibridación a 53 °C durante 40 seg y una elongación a 72 °C durante 1 min, y una post-elongación a 72 °C durante 7 min (García-Saucedo y col., 2008). La región V6-V8 de los genes bacterianos del rDNA 16S fue amplificada usando los iniciadores bacterianos 968-f (5'-GAACGCGAAGAACCTTACC -3') con grapa y 1401-r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Nübel y col., 1996), con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 94 °C durante 2 min, 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 45 seg, una hibridación a 60 °C durante 30 seg y una elongación a 72 °C durante 1.5 min, y una post-elongación a 72 °C durante 10 min (Nielsen y col., 2004). La grapa utilizada para DGGE consistió en una secuencia de 40 pb (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia), con 50 µL de una mezcla de reacción para la PCR, que consistió en (µL): 2.5 de cada primer (20 mM), 1 de mezcla de nucleótidos (10 mM por nucleótido), 10 de amortiguador (10X), 5 de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 de Taq DNA polimerasa (5u/µL), 1 de ADN del lodo y 27.5 de agua estéril. El rendimiento y calidad de los productos amplificados fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v).

### **3.3.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)**

Los productos de amplificación fueron separados por DGGE en un DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) a 60 °C; inicialmente se aplicaron 200 V durante 5 minutos y posteriormente 85V durante 16 horas, de acuerdo al procedimiento descrito por García-Saucedo y col. (2008), utilizando geles de poliacrilamida al 6% (p/v) y un gradiente desnaturalizante de 40 a 55% y de 30 a 55% para arquea y bacteria, respectivamente. Los geles de DGGE fueron teñidos con nitrato de plata, de acuerdo con Sanguinetti y col. (1994) y escaneados mediante un fotodocumentador Epichemi3 Darkroom (UVP Bioluminescence Systems, Upland, CA).

### **3.3.5. Purificación y secuenciación de las bandas de 16S rDNA**

Las bandas del gel de DGGE fueron cortadas y reamplificadas usando los mismos iniciadores, pero sin grapa. Los productos de PCR fueron purificados (Wizard® SV gel and PCR clean-up system, Promega, Madison, WI, USA), visualizados por electroforesis en gel de agarosa y secuenciados usando el kit ABI Prism Big-Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing en un secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Las secuencias de ADN fueron analizadas usando los programas Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La afiliación filogenética de las secuencias parciales fue estimada usando el programa Basic Local Alignment Search Tool BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (McGinnis y Madden, 2004). La presencia de quimeras fue revisada por medio del programa Ribosomal Database Project Chimera Check (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) (Cole y col., 2003). Los árboles filogenéticos de las secuencias del gen para el ARNr 16S de las bandas del gel de DGGE (posiciones de *Escherichia coli* 110 a 482 y 969 a 1367) fueron construidos usando el método de neighbor-joining (Saitoi & Nei, 1987) por medio del software MEGA4 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura y col., 2007).

### 3.3.6. Análisis de las secuencias

La identificación de las secuencias se realizó en la base de datos RDP (Ribosomal Database Project), utilizando las herramientas desarrolladas por Cole y col. (2008) para la búsqueda de la identidad de las secuencias.

### 3.3.7. Análisis de resultados

El software NTSYSpc 2.11T (Exceter Software, NY, USA) fue utilizado para la construcción de dendogramas mediante un agrupamiento de ausencia/presencia de bandas (1/0), utilizando el coeficiente de similitud de Dice ( $S_D$ , Ec. 1), por el método de los promedios no ponderados UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), para comparar los patrones de bandas obtenidos en los geles de DGGE (Gelsomino y col., 1999).

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

Donde:

$n_{AB}$ : número de bandas entre los carriles A y B

$n_A$ : número de bandas en el carril A

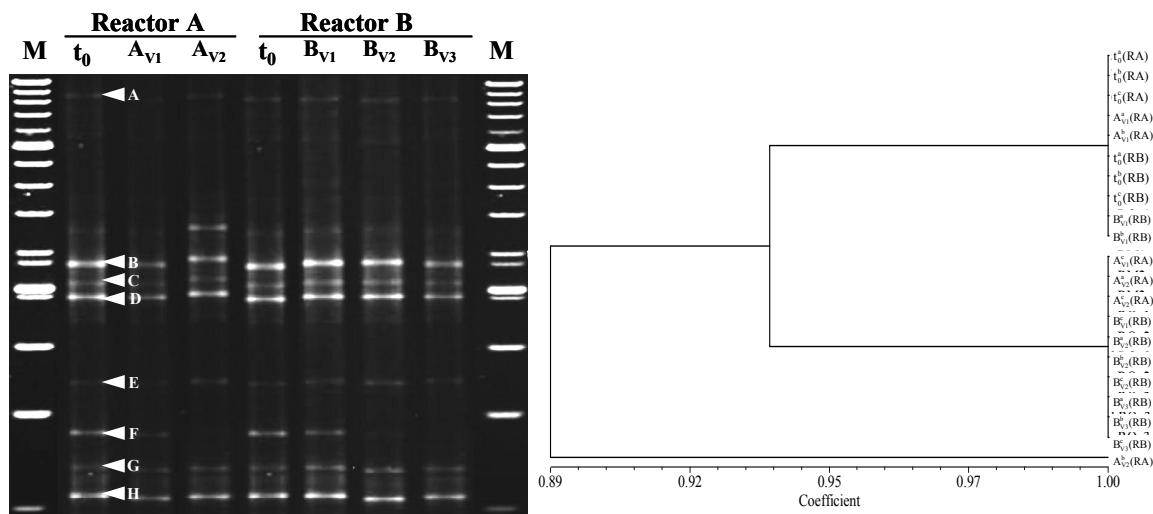
$n_B$ : número de bandas en el carril B

## 3.4. Resultados y Discusión

### 3.4.1. Análisis molecular de arqueas

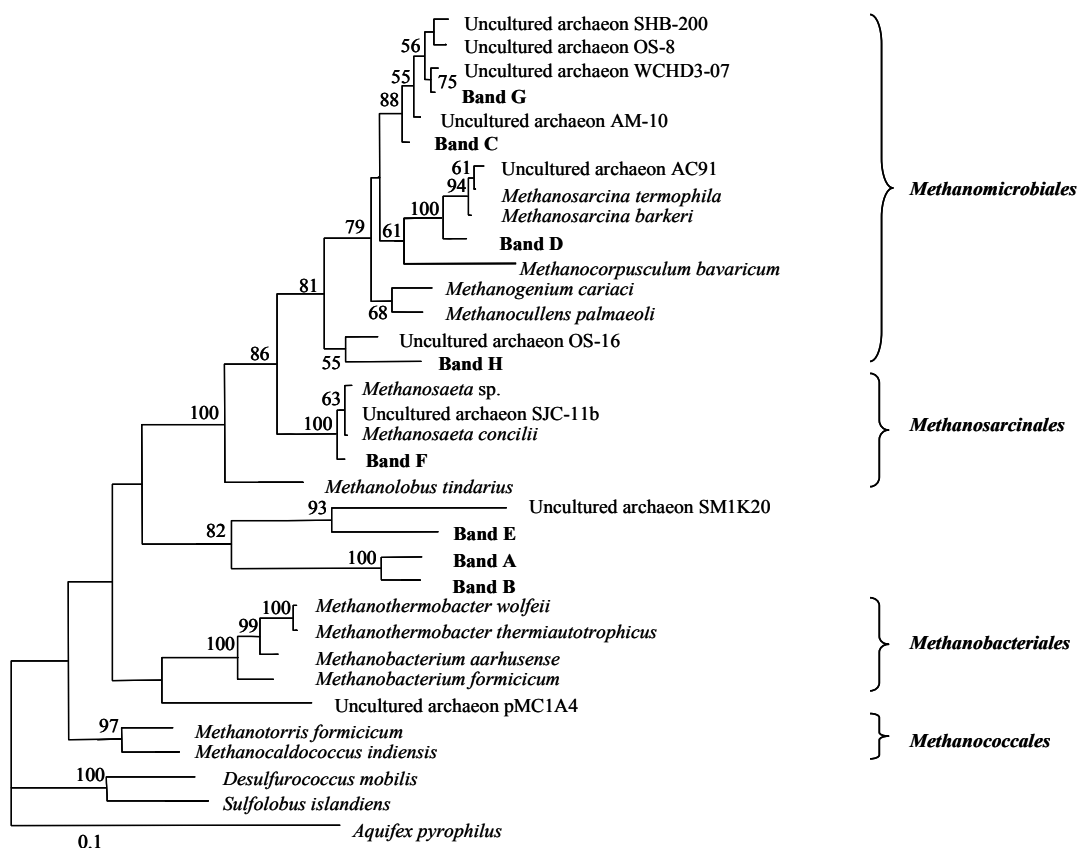
Desde el punto de vista fisiológico, en ambos reactores se presentó una inhibición de la metanogénesis cuando se aumentó la velocidad de carga de AV de 34 a 85 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, sin embargo este comportamiento no se puede atribuir a la desaparición de algunos grupos de arqueas metanogénicas, ya que el perfil de bandas de 16S rDNA DGGE y el dendograma mostrados en la Figura 3.1, no muestran cambios significativos en el patrón de bandas de estas poblaciones microbianas. Posiblemente este efecto se debió a la inactivación de algunas enzimas o a la disminución en la afinidad en éstas. El reactor B no presentó diferencias en el patrón de bandas, aún después de la adición de 1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto (OD), sugiriendo que el oxígeno no provocó un cambio significativo en las poblaciones de arqueas como ha sido reportado por otros autores (Keiner & Leisinger, 1983; Patel y col., 1984).

El análisis estadístico mediante el coeficiente de similitud de Dice mostró que las bandas de ambos reactores formaron dos grupos principales. El primer grupo estuvo formado por los perfiles de bandas de ambos reactores obtenidos con el inóculo inicial ( $t_0$ ) y cuando éstos operaron con la primera velocidad de carga de AV ( $A_{V1}$  y  $B_{V1}$ ). Con la primer velocidad de carga de AV no hubo desaparición de arqueas, con respecto al inoculo inicial, obteniéndose evidencia de que la técnica es reproducible con un bajo nivel de error. El segundo grupo estuvo formado por los perfiles de bandas cuando los reactores fueron alimentados con 85 mg  $C L^{-1} d^{-1}$  de AV ( $A_{V2}$  y  $B_{V2}$ ) y cuando el reactor B fue alimentado con 1 mg  $OD L^{-1} d^{-1}$ , debido a que bajo estas condiciones la cantidad de bandas presentes disminuyó de 8 a 7, sin diferencias significativas.



**Figura 3.1.** Perfil de 16S rDNA-DGGE de arqueas de lodos de dos reactores UASB (izquierda) y Dendrograma de 16S rDNA-DGGE utilizando el coeficiente de similitud de Dice y analizados por UPGMA (derecha).

Las bandas obtenidas en el 16S rDNA-DGGE fueron cortadas y secuenciadas. La Figura 3.2 muestra que el árbol filogenético de las arqueas, de ambos reactores, se agrupó en cuatro órdenes filogenéticos principales. El 50% de las secuencias pertenecieron al orden de los *Methanomicrobiales*, el 12.5% de las secuencias pertenecieron al orden de los *Methanosarcinales* y las secuencias restantes no fueron agrupadas. Se ha reportado que los *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* son los principales consumidores de acetato en reactores anaerobios (Ferry, 1992), evidenciando que en ambos reactores estos dos órdenes son los responsables del consumo de acetato, que es un intermediario en la hidrólisis del AV.



**Figura 3.2.** Árbol filogenético de las secuencias de arqueas del rDNA 16S a partir de bandas de DGGE. Generado por el método de Neighbor-Joining.

Las bandas D y F fueron identificadas como cercanas a *Methanosarcina barkeri* y *Methanosaeta concilii*, respectivamente; las bandas C, E, G y H correspondieron con arqueas secuencias depositadas en la base de datos de arqueas no cultivadas, y las bandas A, B y E no pudieron ser identificadas (Tabla 3.1). Los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* se encuentran en lodos anaerobios y son las principales consumidoras de acetato, sin embargo hay evidencias de que estos dos géneros tienen diferentes mecanismos de activación (Deppenmeier y col., 1996) y afinidad por el acetato (Zinder, 1993). Con respecto a los dos microorganismos identificados se puede observar que *Methanosarcina barkeri* estuvo presente en ambos reactores en todas las condiciones de operación evaluadas, sin embargo *Methanosaeta concilii* desapareció a partir de que los reactores operaron con  $85 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de AV. Esto se debió a que bajo estas condiciones hubo una alta acumulación de acetato, y se ha reportado que el crecimiento y actividad metabólica del género *Methanosaeta* en lodos

metanogénicos se ve favorecido con bajas concentraciones de acetato, mientras que la presencia del género *Methanosarcina* se da con concentraciones altas (Peng y col., 2008). Por lo tanto, el AV no tuvo un efecto significativo en las poblaciones de arqueas en los reactores, ya que solo hubo desaparición de *Methanosaeta concilii* cuando los reactores fueron alimentados con 85 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV, debido a una mayor acumulación de acetato.

**Tabla 3.1.** Secuencias de bandas del 16S rDNA de arqueas de dos reactores UASB.

Banda	Cercanía relativa en GenBank	Aparición					Similitud (%)
		Reactor A <sup>1</sup>		Reactor B <sup>2</sup>			
		A <sub>V1</sub>	A <sub>V2</sub>	B <sub>V1</sub>	B <sub>V2</sub>	B <sub>V3</sub>	
A	Unidentified archaeon	+	+	+	+	+	–
B	Unidentified archaeon	+	+	+	+	+	–
C	Uncultured archaeon AM-10 (AB056013)	+	+	+	+	+	95±1.3
D	<i>Methanosarcina barkeri</i> (AF028692)	+	+	+	+	+	94±2.0
E	Unidentified archaeon	+	+	+	+	+	–
F	<i>Methanosaeta concilii</i> (X51423)	+	–	+	–	–	97±1.0
G	Uncultured archaeon WCHD3-07 (AF050617)	+	+	+	+	+	98±0.8
H	Uncultured archaeon OS-16 (AB056041)	+	+	+	+	+	99±0.5

<sup>1</sup> El reactor A fue utilizado como un control anaerobio

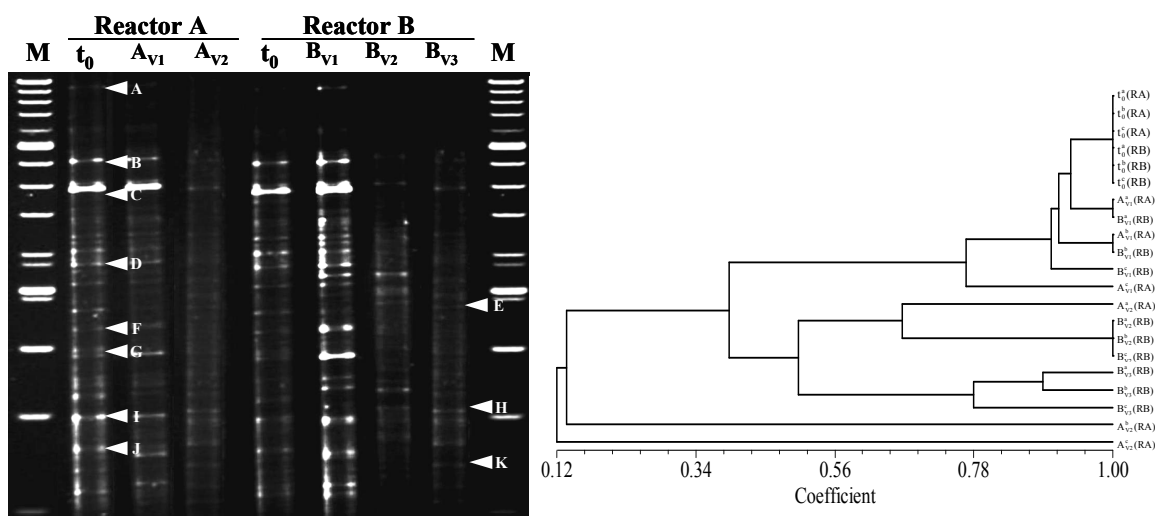
<sup>2</sup> Reactor B operó bajo condiciones anaerobias durante 400 días (B<sub>V1</sub> y B<sub>V2</sub>) y después fue alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (B<sub>V3</sub>)

### 3.4.2. Análisis de bacterias

Al evaluar si hay una relación entre la dinámica de las poblaciones de bacterias y el proceso respiratorio en los reactores, se evidenció la desaparición de la mayoría de las bandas cuando ambos reactores fueron alimentados con 85 mg C L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de AV (B<sub>V2</sub>). Sin embargo, cuando el reactor B fue alimentado con 1 mg OD L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (B<sub>V3</sub>) se observó la aparición de nuevas bandas (Figura 3.3, derecha). En condiciones metanogénicas y en ambos reactores la carga de AV tuvo un efecto inhibitorio sobre las poblaciones de bacterias, pero en el reactor B la adición de OD favoreció a las poblaciones de bacterias y la recuperación de la metanogénesis, por lo que la acumulación de acetato disminuyó significativamente. Bajo estas condiciones, se puede ver una relación entre la dinámica de las poblaciones de bacterias y el proceso respiratorio, ya que en el reactor B se mejoró la eficiencia de eliminación como resultado de una mayor mineralización del AV. En el reactor A es muy probable que el efecto inhibitorio del AV, que ha sido reportado por otros autores (Stuckey y col., 1980; Durán y col., 2008), esté relacionado con la actividad de las bacterias.

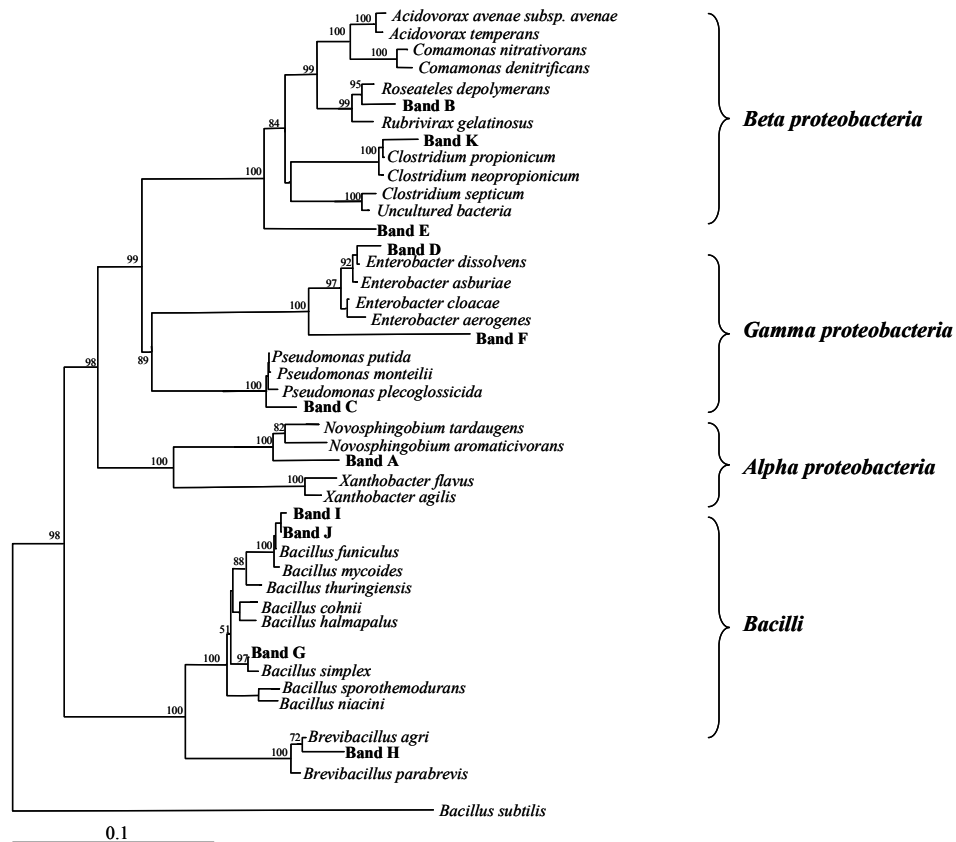


Mediante el análisis estadístico se evidenció que sólo se formó un grupo principal, correspondiente a las bandas presentes en lodos de los reactores antes de ser alimentados con AV; sin embargo, la mayoría de las bandas no se agruparon, ya que las poblaciones de bacterias se modificaron significativamente al cambiar las condiciones en el reactor B.



**Figura 3.3.** Perfil de 16S rDNA-DGGE de bacterias de lodos de dos reactores UASB (izquierda) y Dendrograma de 16S rDNA-DGGE utilizando el coeficiente de similitud de Dice y analizados por UPGMA (derecha).

Al igual que las bandas del 16S rDNA-DGGE de arqueas, éstas fueron cortadas y secuenciadas, la Figura 3.4 muestra que en el inóculo inicial ( $t_0$ ) y después de operar los reactores con  $34 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de AV, únicamente la secuencia de la banda E no pudo ser agrupada en ningún orden, y las secuencias restantes pertenecieron a 4 órdenes: *Alpha Proteobacteria* (12.5%), *Beta Proteobacteria* (12.5%), *Gamma Proteobacteria* (37.5%) y *Bacilli* (37.5%). Todas las bacterias presentes en estas condiciones fueron anaerobias estrictas. Sin embargo, cuando el reactor A operó con  $85 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de AV la mayoría de las bandas desaparecieron, aunque en el reactor B aparecieron nuevas bandas de bacterias que han sido reportadas como aerobias estrictas o facultativas (Guiot y col., 2000; Garibay-Orijel y col., 2005), cuando éste fue alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 3.4.** Árbol filogenético de las secuencias del rDNA 16S de bacterias a partir de bandas de DGGE. Generado por el método de Neighbor-Joining.

En el inóculo inicial las bandas A, B, C, D, F, G, I y J fueron identificadas como cercanas a *Novosphingobium tardaugens*, *Roseateles depolymerans*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus simplex*, *Bacillus funiculus* y *Bacillus mycoides*, respectivamente (Tabla 3.2). Sin embargo, en ambos reactores la mayoría de estas bacterias desaparecieron cuando los reactores fueron alimentados con  $34 \text{ mg C L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de AV, tan sólo *Pseudomonas putida* que ha sido reportada como una bacteria versátil y resistente en condiciones de estrés (Lovley y Lonergan, 1990), permaneció en ambos reactores. Las bandas E, H y K aparecieron en el reactor B después de ser alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , y fueron identificadas como cercanas a *Pelotomaculum propionicum*, *Brevibacillus agri* y *Clostridium propionicum*. Además de que *Roseateles depolymerans* y *Pseudomonas putida* se mantuvieron en este reactor (Tabla 3.2). Los resultados del reactor B mostraron que en presencia de oxígeno, el AV pudo ser mineralizado vía aerobia por bacterias aerobias. Existen

diversos reportes sobre el aislamiento de bacterias aerobias estrictas y facultativas a partir de lodos anaerobios (Assih y col., 2002; Ouattara y col., 2003; Rapheal y col., 2003; Guyot y col., 2004; Lara-Mayorga y col., 2010), bacterias que participan en el metabolismo cuando los lodos son alimentados con bajas concentraciones de OD. Algunas de estas bacterias han sido identificadas como es el caso de Lara-Mayorga y col. (2010), quienes aislaron una bacteria aerobia a partir de lodos metanogénicos alimentados con AV y la identificaron como *Brevibacillus agri*.

**Tabla 3.2.** Secuencias de bandas del 16S rDNA de bacterias de dos reactores UASB.

Banda	Cercanía relativa en GenBank	Aparición					Similitud (%)
		Reactor A		Reactor B			
		A <sub>V1</sub>	A <sub>V2</sub>	B <sub>V1</sub>	B <sub>V2</sub>	B <sub>V3</sub>	
A	<i>Novosphingobium tardaugens</i> (AB070237)	+	-	+	-	-	81±2.0
B	<i>Roseateles depolymerans</i> (AB062129)	+	-	+	+	+	90±1.8
C	<i>Pseudomonas putida</i> (D85999)	+	+	+	+	+	97±1.0
D	<i>Enterobacter dissolvens</i> (EDZ96079)	+	-	+	-	-	94±2.0
E	<i>Pelotomaculum propionicicum</i> (AB154390)	-	-	-	-	+	95±0.8
F	<i>Enterobacter cloacae</i> (AY787819)	+	-	+	-	-	62±3.3
G	<i>Bacillus simplex</i> (AF478071)	+	-	+	-	-	95±0.6
H	<i>Brevibacillus agri</i> (D79454)	-	-	-	-	+	85±2.4
I	<i>Bacillus funiculus</i> (AB049195)	+	-	+	-	-	96±0.9
J	<i>Bacillus mycoides</i> (AF155957)	+	-	+	-	-	95±1.2
K	<i>Clostridium propionicum</i> (CP16SRRN)	-	-	-	-	+	99±0.5

Stephenson y col. (1999) mencionan que al participar los microorganismos aerobios o facultativos en el proceso respiratorio de un lodo mantienen un ambiente reducido para la función de las arqueas metanogénicas. Lara-Mayorga y col. (2010), demuestran que *B. agri* participa en la eliminación del AV en los lodos, ya que ambos presentan una velocidad específica de consumo y afinidad por el AV similares.

### 3.5. Conclusiones

Las poblaciones de arqueas no presentaron cambios significativos en su patrón de bandas, en ambos reactores. Las bandas D y F fueron identificadas como próximas a *Methanosarcina barkeri* y *Methanosaeta concilii*, que pertenecen a los ordenes *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*, respectivamente. *Methanosarcina barkeri* estuvo presente en ambos reactores en todas las condiciones de operación evaluadas y *Methanosaeta concilii*

desapareció a partir de que los reactores operaron con  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de AV, por lo que al desaparecer está última la velocidad de consumo de acetato disminuyó y se observó una mayor acumulación de este intermediario. Con respecto a la dinámica de las poblaciones de bacterias, la mayoría de las bandas desaparecieron cuando ambos reactores fueron alimentados con  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , sin embargo cuando el reactor B fue alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  se observó la aparición de nuevas bandas de bacterias aerobias o facultativas. Las secuencias obtenidas pertenecieron a 4 ordenes: *Alpha proteobacteria*, *Beta proteobacteria*, *Gamma proteobacteria* y *Bacilli*. Las bandas A, B, C, D, F, G, I y J fueron identificadas como cercanas a *Novosphingobium tardaugens*, *Roseateles depolymerans*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus simplex*, *Bacillus funiculus* y *Bacillus mycoides*, respectivamente. Las bandas E, H y K, identificadas como próximas a *Pelotomaculum propionicicum*, *Brevibacillus agri* y *Clostridium propionicum*, aparecieron sólo en el reactor B después de ser alimentado con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

### 3.6. Referencias

- Agency for Toxic Substances and Disease (ATSDR) (2008). Public health statement for vinyl acetate. Encyclopedia of Earth. Eds. Cutler J. Cleveland. Washington, D.C.
- Amann, RI & Kühn, M (1998). In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:352-358.
- Araya, P; Aroca, G & Chamy, R (1999). Anaerobic treatment of the effluents from an industrial polymers synthesis plant. *Waste management.* 19: 141-146.
- Assih, EA; Ouattara, AS; Thierry, S; Cayol, J-L; Labat, M & Macarie, H (2002). *Stenotrophomonas acidaminiphila sp. nov.*, a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International journal of systematic evolution and microbiology.* 52: 559–568.
- Atlas, RM; Saylor, G; Burlage, RS & Bej, AK (1992). Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *Biotechniques.* 12(5): 706-17.
- Briones, A & Raskin, L (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability, *Current opinion of biotechnology.* 14: 270–276.

- Casserly, C & Erijman, L (2003). Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor, *International Biodeterioration and biodegradation*. 52: 7–12.
- Cole, JR; Chai, B; Marsh, TL; Farris, RJ; Wang, Q; Kulam, SA; Chandra, S; McGarrell, DM; Schmidt, TM; Garrity, GM & Tiedje, JM (2003). The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic acids research*. 31:442-443.
- Dangcong, P & Xingwen, Z (1994). Effects of the seed sludge on the performance of UASB reactors for treatment of toxic wastewater. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 60: 171-176.
- Daniels, W (1983). Vinyl acetate monomer, in, Mark, H.F., Othmer, D.F., Overberger, C.G., Seaborg, G.T & Grayson, N. (Eds.), *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 3rd Ed., Vol. 23, New York, John Wiley & Sons, pp. 817-847.
- Deppenmeier, U; Müller, V & Gottschalk, G (1996). Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Archives of microbiology*. 165:149-163.
- Diez, B; Pedros-Alio, C; Marsh, TL & Massana, R (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukariotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and environmental microbiology*. 67:2942–2951.
- Durán, U; Monroy, O; Gómez, J & Ramírez, F (2008). Biological wastewater treatment for removal resins in UASB reactor: Influence of oxygen. *Water science and technology*. 57(7): 1047-1052.
- Ergüder, TH & Demirer, GN (2005). Granulation of a mixture of suspended anaerobic and aerobic cultures under alternating anaerobic/microaerobic/aerobic conditions: a preliminary study. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80(7): 837-842(6).
- Felske, A; Rheims, H; Woltering, A; Stackebrandt, E & Akkermans, ADL (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in glasslands soils. *Microbiology*. 143: 2983-2989.
- Ferry, JG (1992). Methane for acetate. *Journal of Bacteriology*. 174(17): 5489-5495.

- García-Saucedo, C; Fernández, FJ; Buitrón, G; Cuervo-López, FM & Gómez, J (2008). Effect of loading rate on TOC consumption efficiency in a sulfate reducing process: sulfide effect in batch culture. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 83(12): 1648-1657.
- Garibay-Orijel, C; Ríos-Leal, E; García-Mena, J & Poggi-Varaldo, HM (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partially-aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 80: 1180-1187.
- Gelsomino, A; Keijzer-Wolters, AC; Cacco, G & Dirk Van, EJ (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiology methods*. 38: 1-15.
- Grosskopf, R; Janssen, PH & Liesack, W (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and environmental microbiology*. 64: 960-969.
- Guiot, SR; Tawfiki-Hajji, K & Lépine, F (2000). Immobilization strategies for bioaugmentation of anaerobic reactors treating phenolic compounds. *Water science and technology*. 42(5-6): 245-250
- Kato, M.T., Field, J.A. & Lettinga, G. (1997) Anaerobe tolerance to oxygen and the potentials of anaerobic and aerobic cocultures for wastewater treatment. *Brazilian journal of chemical engineering*. 14(4): 1-15.
- Keiner, A & Leisinger, T (1983). Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Systematic applied microbiology*. 4: 305-312.
- Lane, D (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In; Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, pp 115-175.
- Lara-Mayorga, I; Durán-Hinojosa, U; Arana-Cuenca, A; Monroy-Hermosillo, O & Ramírez-Vives, F (2010). Vinyl acetate degradation by *Brevibacillus agri* isolated from a slightly aerated methanogenic reactor. *Environmental technology*. 31(1): 1-6.

- Loveley, DR & Lonergan, DJ (1990). Anaerobic oxidation of toluene, toluence, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15, Applied and environmental microbiology. 56: 1858-1864.
- Macarie, H; Ahring, BK; Rinderknecht-Seijas, N & Poggi-Varaldo, HM (2002). A review on bioreactors with simultaneous electron acceptors for removal of recalcitrant and toxic compounds. 5th IWA chemical industry group conference. O. Thomas, J.R. Degorce-Dumas, B. Roig (Eds.). Nimes, Francia, 13-14/11/02, pp. 149-156.
- McGinnis, S & Madden, TL (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic acids research. 32: W20-W25.
- Muyzer, G; De Waal, EC & Uitterlinden, AG (1993). Profiling of complex microbialpopulations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and environmental microbiology. 59: 695-700.
- Muyzer, G; Hottenträger, S; Teske, A & Wawer, C (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, p. 1–23. In A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), Molecular microbial ecology, manual 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Nielsen, HB; Mladenovska, Z; Westermann, P & Ahring, BK (2004). Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. Biotechnology and bioengineering. 86(3): 291-300.
- Nübel, U; Engelen, B; Felske, A; Snaidr, J; Wieshuber, A; Amann, RI; Ludwig, W & Backhaus, H (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16 rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of bacteriology. 178: 5636-5643.
- Ouattara, AS; Assih, EA; Thierry, S; Cayol, J-L; Labat, M; Monroy, O & Macarie, H (2003). *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. Intrnational journal of systematic evolution and microbiology. 53: 1247-1251.

- Patel, GB; Roth, LA & Agnew, BJ (1984). Death rates of obligate anaerobes exposed to oxygen and the effect of media prereduction on cell viability. *Canadian journal of microbiology*. 30: 228-235.
- Peng, J; Lu, Z; Rui, J & Lu, Y (2008). Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and environmental microbiology*. 74(9): 2894-2901.
- Rapheal, SV; Swaminathan, KR & Lalitha, K (2003). Metabolic characteristics of an aerobe isolated from a methylotrophic methanogenic enrichment culture. *Journal of bioscience*. 28(2): 235-242.
- Saitoi, N & Nei, M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 4: 406-425.
- Sanguinetti, CJE; Dias, NE & Simpson, AJ (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques*. 17: 914-921.
- Shen, CF & Guiot, SR (1996). Long-term impact of dissolved O<sub>2</sub> on the activity of anaerobic granules. *Biotechnology and bioengineering*. 49: 611-620.
- Stephenson RJ; Patoine, A & Guiot, SR (1999). Effects of oxygenation and upflow liquid velocity on a coupled anaerobic/aerobic reactor system. *Water research*. 33(12): 2855-2863.
- Stuckey, D; Owen, W & McCarty, PL (1980). Anaerobic toxicity evaluation by batch and semi-continuous assays. *Journal of water pollution (control federal)*. 52(4): 720-729.
- Tamura, K; Dudley, J; Nei, M & Kumar, S (2007). MEGA 4, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. *Molecular biology and evolution*. 24: 1595-1599.
- Van der Gucht, K; Sabbe, K; De Meester, L; Vloemans, N; Zwart, G; Gillis, M & Vyverman, W (2001). Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environmental microbiology*. 3: 680-690.
- Zinder, SH (1993). *Methanogenesis: physiological ecology of methanogens*. Ed. Chapman & Hall. NY. Pps.: 128-206.



## 4. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones generales

En base a los objetivos planteados para esta tesis, el presente trabajo muestra evidencias de que sólo es posible la metanogénesis del AV con bajas velocidades de carga; que el AV no es el responsable de la disminución en la metanogénesis de, sino la acumulación de acetato; con la adición de  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  de oxígeno disuelto, el AV puede ser metanizado y mineralizado aún a altas velocidades de carga; y que la glucosa no mejoró la eliminación del AV en ambos cultivos.

Bajo condiciones metanogénicas, el metabolismo de los lodos del reactor UASB, cambió significativamente cuando las velocidades de carga se modificaron, sin embargo la eficiencia de consumo del AV fue siempre del 100%, indicando que el efecto negativo no está asociado con el efecto tóxico del compuesto, sino debido a la acumulación de acetato. Desde el punto de vista poblacional, *Methanosarcina barkeri* estuvo presente en ambos reactores en todas las condiciones de operación evaluadas y *Methanosaeta concilii* desapareció a partir de que los reactores operaron con  $85 \text{ mg C-AV L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Evidenciando que la disminución en la capacidad metanogénica parece estar relacionada con el género que consume el acetato y con la modificación en la ruta metabólica de consumo del AV. Cuando el reactor B operó con  $1 \text{ mg OD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  ( $Q_{B3}$ ), la eficiencia de eliminación se recuperó y la acumulación de acetato disminuyó 41%, debido a que el oxígeno aumentó la capacidad oxidativa de los lodos para metanizar y mineralizar este intermediario. Confirmando los resultados del análisis molecular de las bacterias, donde se observó, la aparición de nuevas bandas algunas de ellas identificadas como aerobias estrictas, como es el caso de *Brevibacillus agri*, que probablemente participaron en la mineralización del AV.

Para los cultivos en lote, se observó que bajo condiciones metanogénicas no se presentó ningún fenómeno de inhibición en el consumo del AV, pero a altas concentraciones éste solamente se hidrolizó y se acumuló como acetato; la exposición del lodo al AV durante 350 días provocó una disminución de 69% en la velocidad específica máxima de consumo de acetato; los ensayos en presencia de oxígeno evidenciaron que con 1 mg OD L<sup>-1</sup> la metanogénesis se ve favorecida y una fracción de AV fue mineralizada por una ruta aerobia.

#### **4.2. Recomendaciones**

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se recomienda:

- Evaluar las barreras que impiden el consumo de acetato, con cultivos axénicos de arqueas metanogénicas del lodo.
- Realizar estudios enzimáticos en lote, de la ruta de metanogénesis y mineralización del acetato de vinilo.
- Evaluar el proceso de eliminación de este compuesto, con cultivos axénicos de bacterias aerobias y arqueas metanogénicas, aisladas a partir de los lodos.

# ANEXOS



## ANEXO I. Materiales

### 1.1. Diseño y operación de cultivos en continuo

Los experimentos en continuo se realizaron en dos reactores anaerobios UASB con un volumen de 1.5 L cada uno, temperatura de incubación de  $30 \pm 2$  °C, pH de  $7 \pm 0.3$ , tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 1 día, concentración inicial de inóculo de 33.5 g sólidos suspendidos volátiles (SSV)  $L^{-1}$  (correspondiente a 500 mL) y relación carbono/nitrógeno (C/N) de 50. En la Figura 1 se muestra el diseño de los reactores. Uno de los reactores fue alimentado con oxígeno mediante una columna de saturación burbujeadada con aire comprimido a un flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . En ambos reactores el biogás se recolectó mediante columnas invertidas con solución salina saturada (NaCl  $300 \text{ g L}^{-1}$ ), a un pH de 2 y con rojo de metilo como indicador de la dilución de  $\text{CO}_2$ . El influente se mantuvo en refrigeración para evitar pérdidas por volatilidad AV.

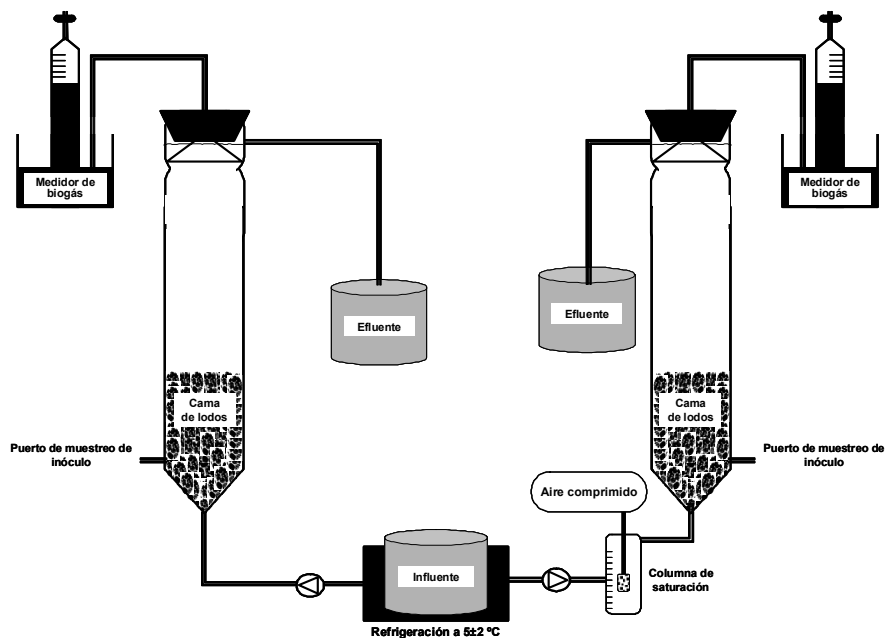


Figura 1. Diagrama de reactores en continuo.

### 1.2. Diseño de cultivos en lote

Los cultivos en lote se realizaron por duplicado en botellas serológicas de 60 mL, con un volumen útil de 40 mL. Los SSV para inocular las botellas fueron tomados de los cultivos en continuo bajo régimen estacionario y condiciones metabólicas estables. Todos los cultivos en

lote se realizaron a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C, pH de  $7 \pm 0.3$ , una concentración de inóculo de  $33.4 \text{ g SSV L}^{-1}$  y una relación carbono orgánico total/sólidos suspendidos volátiles (COT/SSV) de 2. Las botellas fueron selladas herméticamente bajo una atmósfera de nitrógeno para mantener las condiciones anaerobias.

### 1.3. Fuente de inóculo

Se utilizó un lodo metanogénico procedente de un reactor en continuo que trataba aguas residuales de resinas poliméricas (Durán y col., 2008). Previamente los lodos fueron caracterizados con base a la concentración de SSV. La concentración inicial fue de  $33.4 \text{ g L}^{-1}$ .

### 1.4. Medio mineral

El medio mineral utilizado (Visser, 1995) contenía un alta concentración de sales de fosfato y una fuerza iónica baja ( $0.022 \text{ M}$ ), por lo que fue reformulado disminuyendo la concentración de fosfatos y aumentando la fuerza iónica a  $0.025 \text{ M}$  con la adición de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ), para reducir los posibles problemas de transporte celular. El medio reformulado fue utilizado para alimentar los cultivos en continuo y para los ensayos en lote (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Composición del medio mineral base.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>
$\text{NH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.703
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.028
KCl	0.500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.111
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.100
NaCl	0.297

En la Tabla 2 se muestra la composición de la solución de elementos traza, de la cual se adicionó 1 mL por cada litro de medio mineral.

**Tabla 2.** Solución de elementos traza.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g L<sup>-1</sup>)</b>
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.786
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.05
ZnCl <sub>2</sub>	0.05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.05
AlCl <sub>3</sub>	0.05
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.07
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05
HCl 36% (Concentrado)	0.5 mL

## ANEXO II. Métodos Analíticos

### 2.1. Cuantificación de sólidos

La cuantificación de los sólidos suspendidos totales (SST), los sólidos suspendidos fijos (SSF) y los SSV en el inóculo, se realizó con base en el método estándar (APHA, 1995). La cuantificación de los sólidos presentes, se realizó por duplicado utilizando un volumen conocido de inóculo, previamente filtrado mediante vacío en una membrana de fibra de vidrio a peso constante. Posteriormente para la determinación de los SST, las muestras fueron secadas a 105 °C y los SSF se cuantificaron, después de haber incinerado la muestra a 550 °C durante 30 minutos. A continuación se muestran las ecuaciones utilizadas en esta técnica:

$$\text{SST (g L}^{-1}\text{)} = (B - A)/V$$

$$\text{SSF (g L}^{-1}\text{)} = (C - A)/V$$

$$\text{SSV (g L}^{-1}\text{)} = \text{SST} - \text{SSF}$$

Donde:

A = peso del filtro (g)

B = peso del filtro + muestra seca (g)

V = volumen de muestra (L)

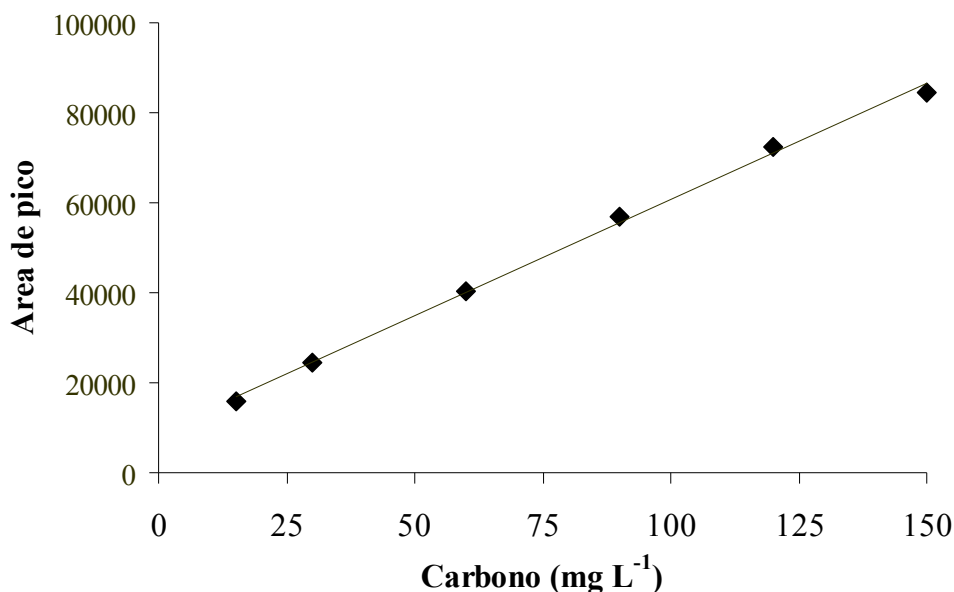
Donde:

C = peso del filtro + cenizas (g)

### 2.2. Medición de carbono orgánico total

El carbono orgánico total (COT) se determinó con un analizador de carbono total (TOC-5000 Shimadzu TM; Kyoto, Japan). Para realizar la cuantificación, la muestra fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 µm. La muestra para determinar carbono fue acarreada por un flujo de aire extrapuro (150 mL min<sup>-1</sup>) a una cámara de combustión a 680 °C, obteniéndose un área proporcional a la concentración de carbono presente en la muestra. La curva patrón se realizó con AV como carbono.





**Figura 2.** Curva estándar de carbono orgánico total.

Para la estandarización del método, la curva estándar (Figura 2) se realizó por triplicado, con la finalidad de evaluar la reproducibilidad del método. En la Tabla 3 se presentan los resultados de la curva estándar y los resultados estadísticos del método.

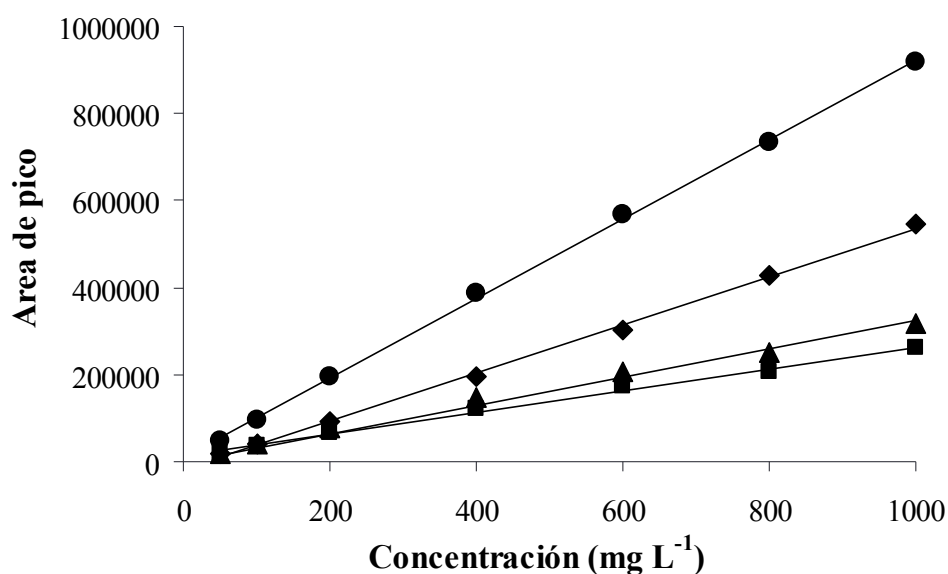
**Tabla 3.** Parámetros de curva estándar de carbono orgánico total.

Parámetro	Valor	C.V. (%)
Pendiente	$50.13 \pm 0.9$	1.84
Ordenada al origen	$258.33 \pm 11.5$	4.45
Coefficiente de determinación	$0.9996 \pm 0.0002$	0.02

### 2.3. Determinación de los compuestos volátiles por cromatografía de gases

Se cuantificó el consumo de AV y la formación de acetato (AcCOOH), acetaldehído (AcCHO) y etanol (EtOH) con un cromatógrafo de gases HP-5890 series II con detector de ionización de flama (FID), con una columna AT-1000 (0.53 mm x 1.2 mm x 10 m), operando a temperaturas de 120°C para el horno, 130°C para el inyector y 150°C para el detector, utilizando nitrógeno como gas acarreador a un flujo de 6.6 mL min<sup>-1</sup> (Durán y col., 2008).

Se elaboraron curvas estándar de AV, AcCOOH, AcCHO y EtOH (Figura 3). Se preparó una solución madre de los compuestos en mezcla a una concentración de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , haciendo diluciones para tener intervalos de concentración de 50 a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  para cada uno. Se prepararon viales de inyección con  $950 \mu\text{L}$  de muestra y  $50 \mu\text{L}$  de HCl al 50% como medio acidificante. El programa para la determinación de los compuestos fue el siguiente: temperatura inicial de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , temperatura final de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , una rampa de temperatura de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  por minuto y un tiempo de análisis de 5.95 minutos.



**Figura 3.** Curvas estándar de compuestos volátiles. Ac (■), AcCHO (◆), AV (●) y EtOH (▲).

Para la estandarización del método, se cuantificaron los compuestos en mezcla y por triplicado. En la Tabla 4 se presenta los resultados de las curvas estándar. Al evaluar la reproducibilidad del método, se obtuvieron coeficientes de variación menores que 10%, para cada compuesto.

**Tabla 4.** Parámetros de curvas estándar de compuestos volátiles.

Compuesto	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de determinación ( $R^2$ )
Ac	$249.32 \pm 2.5$ (1.0)	$13827 \pm 516$ (3.7)	$0.9934 \pm 0.0011$
AcCHO	$554.57 \pm 8.6$ (1.6)	$-21269 \pm 518$ (2.4)	$0.9971 \pm 0.0021$
AV	$913.93 \pm 5.5$ (0.6)	$11872 \pm 523$ (4.4)	$0.9993 \pm 0.0003$
EtOH	$301.98 \pm 4.2$ (1.4)	$13621 \pm 1326$ (9.7)	$0.9934 \pm 0.0012$

#### 2.4. Determinación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>

El biogás producido se cuantificó con solución salina saturada (300 gNaCl L<sup>-1</sup>) a pH de 2, de acuerdo con APHA (1995). La composición del biogás (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) se determinó con un cromatógrafo de gases GOWMAC series 580, con detector de conductividad térmica (TCD) empleando una columna de Carbosphere 80/100, operando a temperaturas de 140°C para la columna, 190°C para el detector, 170°C para el inyector, presión de 40 psi, polaridad de 120 mA y utilizando helio a un flujo de 25 mL min<sup>-1</sup>. Se determinó la composición del biogás inyectando 0.1 mL de biogás por duplicado, directamente de los cultivos y comparando el área de pico para cada gas con la curva estándar de la Figura 5.

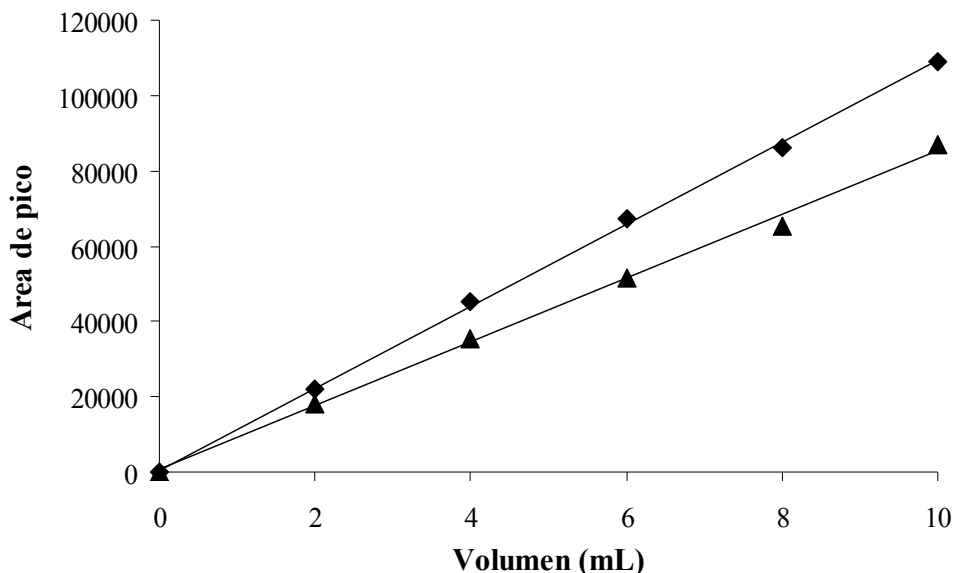


Figura 4. Curvas estándar de CH<sub>4</sub> (▲) y CO<sub>2</sub> (◆).

Para la estandarización del método, se determinó la composición de una mezcla de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por triplicado. En la Tabla 5 se presenta los resultados de las curvas estándar, los cuales muestran que hubo reproducibilidad del método, con coeficientes de variación menores que 10%.

**Tabla 5.** Parámetros de curvas estándar de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

<b>Compuesto</b>	<b>Pendiente</b>	<b>Ordenada al origen</b>	<b>Coficiente de determinación (R<sup>2</sup>)</b>
CH <sub>4</sub>	8458 ± 162 (1.9)	1175 ± 87 (7.4)	0.9937 ± 0.0039
CO <sub>2</sub>	10868 ± 215 (2.0)	671 ± 29 (4.4)	0.9974 ± 0.0003

## ANEXO III. Análisis de Resultados

### 3.1. Variables de respuesta

Los cultivos en continuo y los cultivos en lote fueron evaluados mediante el cálculo de variables de respuesta, tales como:

Eficiencia de consumo:

$$E(\%) = \left( \frac{\text{mg sustrato consumido}}{\text{mg sustrato alimentado}} \right) * 100$$

Velocidades volumétricas de consumo de sustratos:

$$\begin{array}{c} \text{Cultivos en continuo} \\ r_s = \frac{\text{mg sustrato consumido}}{TRH} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{Cultivos en lote} \\ r_s = \frac{\text{mg sustrato consumido}}{t(\text{días})} \end{array}$$

Velocidades volumétricas de formación de productos:

$$\begin{array}{c} \text{Cultivos en continuo} \\ r_p = \frac{\text{mg producto formado}}{TRH} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{Cultivos en lote} \\ r_p = \frac{\text{mg producto formado}}{t(\text{días})} \end{array}$$

Rendimientos de productos:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{mg producto formado}}{\text{mg sustrato consumido}}$$

Para los cultivos en lote se determinó las velocidades específicas de consumo de sustratos y de formación de CH<sub>4</sub>:

Velocidad específica de consumo de sustratos

$$q_s = \frac{g \text{ carbono} - \text{sustrato}}{g \text{ SSV } t(\text{días})}$$

Velocidad específica de formación de CH<sub>4</sub>

$$q_{CH_4} = \frac{g \text{ carbono} - CH_4}{g \text{ SSV } t(\text{días})}$$

### 3.2. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico NCSS 2000 para determinar las diferencias en las variables de respuesta del cultivo en continuo por la modificación de las condiciones de operación, mediante análisis de varianza (ANOVA) y análisis multivariados de varianza (MANOVA). En los cultivos en continuo se determinaron coeficientes de correlación y diferencias en los tratamientos con respecto a un grupo control, por medio de ANOVA (NCSS, 2000).

## **ANEXO IV. Ensayos**

### **4.1. Pruebas abióticas aerobias y anaerobias**

Con la finalidad de verificar que no existieran interacciones químicas o fenómenos de volatilización del AV, se realizaron pruebas abióticas en botellas serológicas de 60 mL, determinando la concentración inicial y final de éste después de 98 horas de incubación.

Se realizó una cinética bajo condiciones anaerobias utilizando una atmósfera de nitrógeno para desplazar el oxígeno presente y una cinética con 1 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno disuelto, utilizando el medio mineral de la Tabla 1 y una concentración inicial de AV de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Las dos pruebas se realizaron a una temperatura de 30±2 °C y un pH de 7±0.3.

## **ANEXO V. Análisis molecular**

### **5.1. Preparación de las muestras de lodos de los cultivos en continuo**

Las muestras de lodos para el estudio molecular fueron tomadas de los cultivos en continuo en régimen estacionario. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos y se mantuvieron en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta ser utilizadas.

### **5.2. Extracción de DNA**

La extracción del DNA se realizó con el kit de extracción UltraClean™ Soil DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). Después de la extracción se determinó la concentración y calidad del DNA, por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 V por 1 hora. Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio y se visualizó con un transluminador de luz ultravioleta.

### **5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La región V6-V8 de genes bacterianos del rDNA 16S fue amplificada usando los iniciadores bacterianos 968-f con grapa (5'- GAACGCGAAGAACCTTACC – 3') y 1401-r (5'- CGGTGTGTACAAGACCC –3') (Nübel y col., 1996). La región V2-V3 de los genes de arqueas del 16S rDNA fueron amplificados usando los iniciadores A109 (T)-f (5'- ACTGCTCAGTAACACGT –3') y 515-r con grapa (5'- ATCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGGCAC –3') (Lane, 1991; Muyzer y col., 1993; Grosskopf y col., 1998). La grapa consistió en una secuencia de 40 pb compuesta exclusivamente de guanosinas y citidinas (5'- CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCG GGGGCACGGGGGG-3'). La composición de la mezcla de reacción para la PCR se puede ver en la Tabla 6.



**Tabla 6.** Mezcla de reacción para PCR, con un volumen final de 50  $\mu$ L.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
Iniciador delantero	2.5
Iniciador trasero	2.5
Mezcla de nucleótidos (10 mM / nucleótido)	1
Amortiguador 10X	10
Cloruro de magnesio (25 mM)	5
Taq DNA polimerasa (5u / $\mu$ L)	0.5
DNA del lodo	1
Agua estéril	27.5

La reacción de amplificación para bacterias se realizó con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 94 °C por 2 min., 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 45 seg., una hibridación a 60 °C por 30 seg. y una elongación a 72 °C por 1.5 min., y una post-elongación a 72 °C por 10 min (Nielsen y col., 2004). La reacción de amplificación para arqueas se realizó con el siguiente programa: pre-desnaturalización a 95 °C por 5 min., 35 ciclos con una desnaturalización a 95 °C por 30 seg. (desnaturalización), una hibridación a 53 °C por 40 seg., una elongación a 72 °C por 1 min., y una post-elongación a 72 °C por 7 min. (García-Saucedo y col., 2008). Las PCR se realizaron en un termociclador CG1-96 (Corbett Research, Sydney, Australia). El tamaño de los productos amplificados fue verificado por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

#### **5.4. Separación por DGGE**

Los productos de amplificación fueron separados por DGGE en un DCode universal mutation detection system (Bio-RAD Laboratories, Hercules, USA) siguiendo el procedimiento descrito por García-Saucedo y col. (2008), utilizando geles de poliacrilamida al 6% p/v y un gradiente desnaturalizante de 30 a 55% y 40 a 55% para bacteria y arquea, respectivamente. Los geles de DGGE fueron teñidos con nitrato de plata, de acuerdo con Sanguinetti y col. (1994) y escaneados mediante un fotodocumentador Epichemi3 Darkroom (UVP Bioluminescence Systems, Upland, CA).

### **5.5. Secuenciación y análisis filogenético**

Las bandas representativas del gel de acrilamida fueron cortadas y reamplificadas usando los iniciadores 968-f y 1401-r para el género *Arquea*, así como los iniciadores A109 (T)-f y 515-r para el género *Bacteria*. Los productos de PCR fueron purificados (Wizard® SV gel and PCR clean-up system, Promega, USA) y visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La secuenciación de los productos purificados se realizó con el ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). En todas las secuencias obtenidas se indagó que no fuesen el producto de quimeras con el programa en línea CHIMERA-CHECK de la bases de datos RDP-II.

Las secuencias parciales fueron sujetas a una búsqueda con el programa en línea BLAST version 2.2.3 (Altschul y col., 1990) y con ayuda de los programas de la base de datos RDP Analysis Tools of Ribosomal Database Project-II Release 9 para buscar la jerarquía taxonómica. Los alineamientos múltiples fueron llevados a cabo con CLUSTAL X (Thompson y col., 1997) seleccionando secuencias emparentadas depositadas en GeneBank del National Center for Biotechnology Information-Taxonomy Homepage (TaxBrowser) y la base de datos ribosomales de la base de datos de Ribosomal Database Project-II.

Los porcentajes de similitud nucleotídica se calcularon con ayuda del programa MEGA v. 2.1 (Kumar y col., 2001). Los porcentajes de similitud de nucleótidos para definir géneros y especies fueron 95% y el 97.5%, respectivamente (Rossello-Mora y Amman, 2001). La similitud de las secuencias con porcentajes por debajo del 95% fueron asignados para definir el nivel más cercano de la familia.

México D.F. a 25 de Junio del 2010

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Estudio Fisiológico y Poblacional de un Proceso Microbiológico  
Metanogénico con Oxígeno para la Eliminación de Acetato de Vinilo”**

Que presentó

**M. en B. Ulises Durán Hinojosa**

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesor: Dr. Jorge Gómez Hernández

Asesora: Dra. Beatriz Rendón Aguilar

H. Jurado:

Presidente: Dr. Jorge Gómez Hernández

Secretario: Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Vocal: Dra. Suyén Rodríguez Pérez

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino

The image shows three handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The top signature is the most compact and stylized. The middle signature is larger and more fluid. The bottom signature is the largest and most legible, appearing to read 'Francisco José Fernández Perrino'.