

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**EVALUACIÓN DE UN BIOFILTRO ACOPLADO A UN BIODIGESTOR ANAEROBIO
PARA LA REMOCIÓN DE H₂S EN LA CORRIENTE DE BIOGÁS.**

POR:

Q.B.P. BENJAMÍN HERNÁNDEZ FIGUEROA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JULIO DE 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih. 10 de junio de 2020.

Oficio: 34/CA/SIP/20

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente:

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la Tesis intitulada: **EVALUACIÓN DE UN BIOFILTRO ACOPLADO A UN BIODIGESTOR ANAEROBIO PARA LA REMOCIÓN DE H₂S EN LA CORRIENTE DE BIOGÁS**, presentada por el Q.B.P. Benjamín Hernández Figueroa, alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

Atentamente
"Por la Ciencia para Bien del Hombre"

Dr. Antonio Pérez Hernández
Co-Director de tesis

Dr. Jorge Alberto Gómez
Asesor de tesis

Dra. María de Lourdes Ballinas Casarrubias
Asesora de tesis

Dra. Beatriz Adriana Rocha Gutiérrez
Asesora de tesis

Dra. María del Rosario Peratta Pérez
Directora de tesis

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARÍA
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 6000
Chihuahua, Chihuahua, México
<http://www.fcq.uach.mx>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo incondicional de mi familia, en especial de mi madre Susana Figueroa López, me das todo con solo existir, eres el motor de mi vida. A mis Hermanos Sofía y Erick, que siempre han creído en mí. A ti Miguel, muchas gracias por estar allí apoyándome de manera incondicional y hasta en lo académico, de no ser por esos debates científicos no hubiésemos podido extraer “ADN de una roca”, orgullosamente puedo compartir este logro con todos ustedes.

A los doctores que conforman el cuerpo académico CA-130 Ciencias Químico Biológicas: D.C. Beatriz A. Rocha Gutiérrez, D.C. Ma. De Lourdes Ballinas Casarrubias, D.C. Francisco J. Zavala Díaz De La Serna. En especial a la D.C. María Del Rosario Peralta Pérez, siempre estaré agradecido por abrirme las puertas y depositar su confianza en mí para este proyecto, sobre todo gracias por su ingenio para generar paz y orden en medio de lo que para un servidor parecía un caos, por permitirme echar a volar la creatividad y nunca limitarme. A cada persona que es parte del laboratorio de Biotecnología IV, a la D.C. Blanca Estela Rivera Chavira por proveernos un lugar digno para trabajar. Al personal técnico del laboratorio de Química III, Lety, fue un placer trabajar con usted. También quiero agradecer al Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Chihuahua y a cada uno de los académicos: D.C. Héctor López Aguilar, D.C. Jorge Alberto Gómez, M.C. Enrique A. Huerta Reynoso, Ing. David Rosales Rodríguez y al M.C. Alonso Gracia; dirigidos por el D.C. Antonino Pérez Hernández a quien agradezco todas sus atenciones y paciencia, haciéndome sentir como parte de su equipo. Fue un honor compartir tiempo con una eminencia de las matemáticas. A mis entrañables compañeros de la maestría: Susana (mi 11:11), Eduardo, Carlos, Jesús, Omar y Fernando. Gracias por hacer de esta experiencia algo inolvidable a través del apoyo, reuniones, viajes, lágrimas y sobre todo risas. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Secretaria de Energía (SENER) por el apoyo otorgado a través del proyecto 243715 del Fondo de Sustentabilidad Energética, en particular al Ing. José Antonio Alonso Villa, propietario del establo “Los Arados”, por su tiempo, disposición y compromiso ¡Gracias!



DEDICATORIA

Dios por ti y para ti, una vez más me demuestras que para ti no hay imposibles.

Espero seguir siendo instrumento de la ciencia para bien del hombre. A mi madre

(Susana) y mis hermanos (Sofía y Erick) cómplices de mis desvelos. A mi padre

(Benjamín) y mi abuela (Gregoria) sé que ustedes interceden por mí desde el

cielo.

Apaga la mentira y enciende la verdad, es tiempo de ser luz en la oscuridad.

(Benjamín Hernández Figueroa)



TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Digestión anaerobia, tecnología para tratar residuos y generar biogás como fuente de energía renovable	4
2.1.1. Aplicación del biogás para la generación de energía eléctrica a nivel mundial	6
2.2. H ₂ S en el biogás.....	11
Tabla 3. Concentraciones de exposición aguda y crónica a H ₂ S en el ambiente y sus efectos a la salud. Adaptado de (Malone et al., 2017).....	12
2.3. Métodos de remoción de H ₂ S.....	13
2.4. Biotecnología ambiental y su aplicación en la desulfuración de biogás ...	16
2.5. Ciclo del azufre en la remoción de H ₂ S.....	22
2.5.1. Metabolismo microbiano sulfato reductor	23
2.5.2. Metabolismo microbiano sulfuro oxidante.....	26
2.6. Configuraciones de biofiltros para la remoción de H ₂ S en la corriente de biogás.	27
2.7. Zeolita como material de soporte para la formación de biopelícula	32
2.8. Estudio molecular de microbiomas presentes en materiales arcillosos: extracción de ADN metagenómico.....	35
3. Justificación	38
4. Hipótesis	39
5. Objetivo general.....	39
5.1. Objetivos específicos	39
6. Materiales, reactivos y equipos.....	40
6.1. Materiales.....	40
6.2. Reactivos	41
6.3. Equipos	42
7. Métodos	44
7.1. Desarrollo general de la investigación.....	44
7.2. Caracterización de la TRA	45
7.3. Desarrollo de la biopelícula microbiana sobre TRA	46



7.4.	Construcción e Instalación del BLE en el establo “los Arados”	47
7.5.	Llenado del BLE	47
7.6.	Reposición de medio de cultivo fresco y conservación de microbioma... ..	47
7.7.	Monitoreo de la entrada y salida de H ₂ S (ppm), %CO ₂ y %O ₂ al BLE	48
7.8.	Evaluación de entradas y salidas de H ₂ S (ppm), %CO ₂ y %O ₂ al BLE	48
7.9.	Evaluación de la formación de la biopelícula microbiana sobre TRA.....	48
7.10.	Extracción de ADN genómico directamente de la TRA.....	49
7.11.	Extracción de ADN genómico, método fenol-cloroformo- alcohol isoamílico	50
7.12.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.....	51
8.	Resultados y discusión	52
8.1.	Caracterización de la TRA	52
8.1.1.	Propiedades texturales de la TRA: análisis BET	52
8.1.2.	Análisis de superficie y composición semicuantitativa de la TRA	55
8.1.3.	Microscopía de dispersión de energía (EDS)	56
8.1.4.	Difracción de Rayos X de la TRA	57
8.1.5.	Densidad y capacidad de retención de agua de la TRA	58
8.2.	Desarrollo de la biopelícula microbiana sobre TRA	59
8.3.	Instalación, monitoreo y evaluación del BLE	63
8.4.	Extracción de ADN genómico directamente de la TRA	74
8.5.	Evaluación de la formación de la biopelícula microbiana sobre la TRA ...	79
9.	Conclusiones	82
10.	Recomendaciones	84
11.	Referencias.....	85



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contribución del suministro de biogás a nivel mundial 2014-2015.....	7
Tabla 2. Registro del número de digestores anaerobios en México en el año 2015.....	9
Tabla 3. Concentraciones de exposición aguda y crónica a H ₂ S en el ambiente y sus efectos a la salud.....	12
Tabla 4. Principales configuraciones de biofiltros para la desulfuración de biogás	29
Tabla 5. Principales materiales de empaque utilizados en los biofiltros	31
Tabla 6. Análisis BET: propiedades texturales de TRA.....	52
Tabla 9. Condiciones operacionales y de diseño del BLE.....	64
Tabla 10. Histórico del clima de la ciudad Delicias, Chihuahua (Periodo Febrero-Julio 2019)	68
Tabla 11. Reportes de condiciones operacionales de BLE y porcentaje de remoción de H ₂ S.	71
Tabla 12. Tabla de composición elemental (%) de la TRA sin inocular e inoculara.....	81



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso de digestión anaerobia	6
Figura 2. Tasa de producción mundial de biogás en el año 2015.....	8
Figura 3. Esquematzación del proceso de formación de biopelícula.....	18
Figura 4. Representación esquemática del ciclo del azufre mediado por microorganismos.....	22
Figura 5. Vías para la reducción asimilatoria y disimilatoria de sulfato.	24
Figura 6. Vías propuestas para la reducción disimilatoria de sulfato.....	25
Figura 7. Representación esquemática de los principales biofiltros utilizados para la desulfuración de biogás.....	28
Figura 8. Esquematzación de los sitios catiónicos típicos de la zeolita.	32
Figura 9. Interacciones electrostáticas entre los microorganismos y el material arcilloso formado por diversos cationes	36
Figura 10. Recolección de la TRA; proveniente de la veta minera ubicada en la Cd. Aldama, Chihuahua.....	52
Figura 11. Isoterma de adsorción-desorción de la TRA con nitrógeno a 77 K.	54
Figura 12. Micrografía de la TRA vista a 10,000X.....	55
Figura 13. Micrografía de la TRA vista a 2,000X.....	56
Figura 14. Espectro del análisis EDS.....	57
Figura 15. Patrón de difracción de la TRA.....	58
Figura 16. Medios de cultivo inoculados con un consorcio bacteriano sulfato reductor/ sulfuro oxidante.....	60
Figura 17. Formación de la biopelícula sobre TRA, durante 4 semanas de incubación a temperatura ambiente	62
Figura 18. Fragmentos de TRA inoculada con el consorcio bacteriano sulfato reductor/ sulfuro oxidante, después de 4 semanas de incubación.	63
Figura 19. Esquema del prototipo de BLE.....	64
Figura 20. Vista frontal del BLE.....	65
Figura 21. Vista al interior del BLE).....	65
Figura 22. Sistema electrónico de detección de gases: CO ₂ (%), H ₂ S (ppm) y O ₂ (%).	66



Figura 23. Entrada (rojo) y salida (azul) de H ₂ S en la corriente de biogás (periodo Febrero-Julio 2019)	68
Figura 24. Evaluación del porcentaje de remoción de H ₂ S en la corriente de biogás	69
Figura 25. Entrada (rojo) y salida (negro) de %CO ₂ en la corriente de biogás.....	72
Figura 26. Entrada (rojo) y salida (negro) de %O ₂ en la corriente de biogás	73
Figura 27. Electroforesis de gel de agarosa al 0.8% del control positivo de ADN genómico.....	75
Figura 28. Electroforesis de gel de agarosa al 0.8% de la extracción de ADN genómico directamente de la TRA.	76
Figura 29. Micrografía de la TRA inoculada vista a 2,000X.	79
Figura 30. Micrografía de la TRA inoculada vista a 2,000X.	80



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
DA	Digestión Anaerobia
CH₄	Metano
CO₂	Dióxido de carbono
H₂S	Sulfuro de hidrógeno
BLE	Biofiltro de lecho escurrido
BLF	Biofiltro de lecho fijo
BS	Bioscrubbing
BSR	Bacterias sulfato reductoras
BSO	Bacterias sulfuro oxidantes
ppm	Partes por millón
LCT	Life Cycle Thinking (perspectiva del ciclo de vida)
TRA	Toba Reolítica Alterada
TRH	Tiempo de retención Hidráulica
TW/h	Tera Watts por hora
MW	Mega Watts
CFE	Comisión Federal de Electricidad
m³/año	Metro cúbico por año
m³ h⁻¹	Metro cúbico por hora
s	Segundo
min	Minuto
cc/g	Centímetro cúbico por gramo
L/min	Litro por minuto
L/h	Litro por hora
g/L	Gramo por litro
g/cm³	Gramo por centímetro cúbico
m²g⁻¹	Metro cuadrado por gramo
mgS m⁻³ h⁻¹	Miligramos de azufre por metro cúbico por hora
mg m⁻³h⁻¹	Miligramos por metro cúbico por hora



$mg\ m^{-3}$	Miligramos por metro cúbico
FIRCO	Fideicomiso de Riesgo Compartido
kWh/año	Kilo Watt por año
Ton CO₂/ año	Toneladas de CO ₂ por año
$mg\ L^{-1}$	Miligramos por litro
mg/dm^3	Miligramos por decímetro cúbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Å	Armstrong
°C	Grado centígrado
kW	Kilo Watt
S⁰	Azufre elemental
SO₄⁻²	Ion sulfato
OH⁻	Ion Hidroxilo
S₂O₃⁻²	Ion tiosulfato
HCO₃⁻	Ion bicarbonato
CO₃⁻²	Ion carbonato
SO₃⁻²	Ion sulfito
Cu	Cobre
Ce	Cesio
Mo	Molibdeno
Sn	Estaño
Mn	Manganeso
W	Tungsteno
Zn	Cinc
Ni	Niquel
Co	Cobalto
Fe	Hierro
ANSI	Instituto Nacional Americano de estándares, por sus siglas en inglés
ATSD	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, por sus siglas en inglés



OSHA	Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés
EPS	Sustancias Poliméricas extracelulares
pH	Potencial Hidrógeno
(l)	liquido
(g)	gas
% C	Porcentaje de carbón
% O	Porcentaje de oxígeno
% Na	Porcentaje de sodio
% Mg	Porcentaje de magnesio
% Al	Porcentaje de aluminio
% Si	Porcentaje de silicio
% P	Porcentaje de fósforo
% K	Porcentaje de potasio
% Ca	Porcentaje de calcio
% v / v	Porcentaje volumen/volumen
SDS	Dodecil sulfato de sodio
mL	Mililitro
mM	Mili molar
M	Molar
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Micro litro
TAE	Tris-acetato-EDTA
mg/mL	Miligramos por mililitro
N	Norte
O	Oeste
Ec.	Ecuación



RESUMEN

La Digestión Anaerobia (DA) de excretas de ganado, se ha convertido en una tecnología renovable para la producción de biogás, el producto obtenido de este bio proceso es el biogás crudo. Este es una mezcla del gas combustible CH_4 (40–65% v/v), CO_2 (35–55% v/v), humedad, entre otros compuestos traza como son el H_2S (0.1–3% v/v), compuestos orgánicos volátiles, amoníaco y siloxanos. Es de particular interés el H_2S , ya que es un gas corrosivo que limita el uso del biogás como energía renovable. Para reducir la concentración de H_2S de la corriente de biogás se propone el uso de tecnologías biológicas. Los sistemas de filtración biológica (biofiltros), además de ser una tecnología amigable con el medio ambiente, pueden remover de manera eficiente el H_2S . El objetivo de esta investigación fue evaluar la remoción de H_2S (100-9000 ppm) en la corriente de biogás en condiciones reales; mediante un prototipo de Biofiltro de Lecho Escurrido (BLE) elaborado de PVC, empacado con toba reolítica alterada (TRA) e inoculado con un consorcio microbiano sulfato reductor/ sulfuro oxidante. Las condiciones de pH y temperatura fueron de 6.05 y 21°C-36°C respectivamente. Dicho BLE fue instalado en el establo “los Arados”, y se monitoreo a partir de un sistema de detección de gases automatizada, en tiempo real durante el periodo Enero-Julio 2019. El prototipo presentó entre el 87%- 99% de eficiencia de remoción de H_2S . De manera paralela también se monitoreo la entrada y salida de O_2 y CO_2 al sistema; en base a estos resultados, el prototipo de BLE trabajó bajo condiciones aerobias permitiendo el desarrollo de microorganismos quimiolitotróficos oxidantes de azufre. De forma conjunta, mediante análisis BET, DRX y espectroscopia electrónica de barrido, se evaluó la TRA como material de soporte para el desarrollo de biopelículas microbianas, siendo este un material prometedor de empaque para BLE. Mediante la propuesta de un nuevo protocolo extracción de ADN metagenómico para muestras arcillosas, se demostró de manera cualitativa la presencia de comunidades microbianas en la TRA durante el bioproceso.



ABSTRACT

Anaerobic digestion (AD) of cattle excreta, has become a renewable technology for biogas production, the product obtained from this bioprocess is raw biogas. This is a mixture of combustible gas CH_4 (40–65% v/v), CO_2 (35–55% v/v), humidity, among other trace compound such as H_2S (0.1-3% v/v), volatile organic compounds, ammonia and siloxanes. H_2S is of particular interest, as it is a corrosive gas that limits the use of biogas as renewable energy. In order to reduce the H_2S concentration on biogas stream, the use of biological technologies is proposed. Biological filtration systems (biofilters), in addition to being an environmentally friendly technology, can efficiently remove H_2S . The objective of this research, was to evaluate the H_2S (100-9000 ppm) removal in the biogas stream, under real conditions; through PVC Biotrickling filter aprototype (BTF), packaged with altered rhyolitic tuff (ART), and inoculated with a microbial consortium reducer sulfate/ oxidizing sulfide. The pH and temperature conditions were 6.05 and 21°C-36°C respectively. BLE was installed in “the Arados” farm, and monitored from automatized gas detection system, in real time during the period January-July 2019. The prototype exhibited between 87- 99% H_2S removal efficiency. In parallel, the inlet and outlet of O_2 and CO_2 to the system was also monitored; based on these results, the BTF prototype performs under aerobic conditions allowing the development of sulfur oxidizing chemolithotrophic microorganisms. Through BET, DRX and scanning electron microscope, ART was evaluated as supporting material for the development of microbial biofilms, this being a promising packaging material for BTF. By proposing a new methodology for extracting metagenomics DNA for clay samples, the presence of microbial communities in ART during bioprocess, was demonstrated qualitatively.



1. **Introducción**

La *Digestión Anaerobia* (DA) de excretas de ganado, se ha convertido en una tecnología renovable para la producción de biogás, este es considerado como una fuente de energía limpia y accesible que puede ser una solución potencial para las altas demandas de energía a nivel mundial. Se prevé que en el futuro, hasta el 25% de toda la bioenergía será proveniente del biogás. Sus aplicaciones van desde ser usada como fuente primaria de energía para la generación de calor y electricidad, como combustible para motores y para alimentar la red de gas de uso doméstico; además, el subproducto semisólido de la DA (digestato) tiene un alto contenido de nutrientes, que pueden usarse en la agricultura directamente como fertilizante. Esto hace evidente que la DA ofrece muchos beneficios potenciales tanto para la industria como para el medio ambiente, pues reduce la huella de carbono (González *et al.*, 2017; Thanakunpaisit *et al.*, 2017; Lupitskyy *et al.*, 2018; Sahota *et al.*, 2018; Esteves *et al.*, 2019).

En términos generales la DA consiste en la descomposición gradual de un sustrato orgánico (por ejemplo desechos agrícolas o excretas de ganado) por diversas poblaciones microbianas (Fagbohunbe *et al.*, 2017); el producto obtenido de este bio proceso es el biogás crudo. El biogás es una mezcla del gas combustible metano (CH_4 , 40–65% v/v), dióxido de carbono (CO_2 , 35–55% v/v), humedad, entre otros compuestos traza como son el sulfuro de hidrógeno (H_2S , 0.1–3% v/v), compuestos orgánicos volátiles, amoníaco y siloxanos (Aryal *et al.*, 2018; Sahota *et al.*, 2018).

Es de particular interés el H_2S el cual se forma durante la descomposición de sustancias orgánicas que contienen aminoácidos sulfurados, así como por la descomposición de sales (sulfuros) mediante la acción de bacterias sulfidogénicas o reductoras de sulfato (SRB, por sus siglas en inglés) (Ventura *et al.*, 2019). La concentración de H_2S presente en la corriente de biogás varía de 50 a 10,000 ppm, dependiendo del sustrato con que se esté generando dicho biogás (Malone *et al.*, 2017; Wang S. *et al.*, 2019).



El H_2S es un gas corrosivo, comúnmente se puede percibir como un olor a “huevo podrido”. Tanto en las fases líquida como gaseosa, desde el punto de vista económico, medioambiental y de seguridad debe de removerse de la corriente de biogás. El H_2S limita el aprovechamiento del biogás en los usos antes mencionados (Pikaar *et al.*, 2014; Choudhury *et al.*, 2019).

El daño a los sistemas ecológicos y la salud pública por la liberación de H_2S al ambiente ha impulsado el desarrollo de diversas tecnologías para su tratamiento. Dichas tecnologías consisten en sistemas basados en procesos físicos y químicos; como el scrubbing (Borhan *et al.*, 2017; Kurella *et al.*, 2017), líquidos iónicos, tecnologías electroquímicas; procesos termo catalíticos y de adsorción (Sahota *et al.*, 2018). Estas tecnologías se utilizan ampliamente en entornos industriales y comerciales en todo el mundo. Sin embargo, estas opciones de tratamiento tienen inconvenientes tecno-económicos, como altos costos de operación y procesamiento, generación de subproductos peligrosos y requisitos de alta presión y temperatura (Vikrant *et al.*, 2018). Recientes investigaciones enfocadas en la remoción de H_2S en la corriente de biogás, se han centrado en el desarrollo de tecnologías amigables con el medio ambiente. Desde la perspectiva del LCA (Life Cycle Assessment, por sus siglas en inglés) se ha encontrado que la biotecnología ambiental es más favorable que las tecnologías físico-químicas (Cano *et al.*, 2018). Un tipo de sistema simple para la desulfuración de biogás, son los biofiltros, estos se han usado durante casi un siglo, su funcionamiento se basa en hacer pasar una corriente de biogás húmedo a través de un material de empaque (que puede ser orgánico e inorgánico) en el que deberán residir consorcios microbianos sulfato oxidantes quienes convierten el H_2S en compuestos inocuos. Existen diferentes tipos de biofiltros para la remoción de H_2S : biolavadores, de lecho fijo y de lecho escurrido. En este sentido la biofiltración, tiene como objetivo maximizar la eficiencia de eliminación de H_2S , a través del diseño y la optimización de biorreactores inoculados con consorcios microbianos sulfato oxidantes. Mediante reacciones de oxidación, tienen la capacidad de transformar el H_2S en compuestos menos tóxicos para el medio ambiente y la salud (Beristain-Cardoso *et al.*, 2008; Pokorna *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2018; Vikrant *et al.*, 2018).



Los biofiltros de lecho escurrido, que pueden estar empacados con una variedad de materiales adsorbentes (carbón vegetal, compost, cerámica, césped y materiales sintéticos) previamente inoculados con consorcios microbianos sulfato oxidantes. Son una alternativa viable para remover concentraciones de hasta 20,000 ppm de H₂S en el biogás (Pokorna *et al.*,2015). Aunque la biotecnología ambiental sea prometedora para la remoción de H₂S en la corriente de biogás; en los sistemas de biofiltración, los materiales de soporte siguen siendo un área de oportunidad ya que hasta la fecha existen obstáculos operacionales como lo son las caídas de presión, que afectan la eficiencia de remoción de H₂S así como la inhibición del metabolismo microbiano por el propio sustrato.

Para la eliminación de H₂S se han utilizado diferentes tipos de zeolita (estructuras naturales y modificadas) en varios métodos experimentales de filtración (Ozekmekci *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Actualmente existe una demanda creciente de zeolitas naturales como Mordenita, Clinoptilolita, Erionita, Phillipsita y Ferrierita como materiales adsorbentes. Las propiedades texturales de la zeolita, le permiten adsorber cantidades de H₂S con eficiencias de alrededor del 90% (Pourzolfaghar *et al.*,2013). Aprovechando las bondades de las zeolitas naturales como materiales adsorbentes, en este trabajo se propone el uso de este material como superficie de soporte, para el desarrollo de biopelículas microbianas en un sistema de biofiltración para la remoción de H₂S en la corriente de biogás.



2. Antecedentes

2.1. Digestión anaerobia, tecnología para tratar residuos y generar biogás como fuente de energía renovable

La FAO identifica a la industria ganadera como una de las principales fuentes de contaminación ambiental, contribuyendo al calentamiento global, la contaminación del aire, el agua y la pérdida de biodiversidad (FAO, 2006). En particular la actividad pecuaria representa el 11% (Llonch *et al.*, 2016) de las emisiones globales de efecto invernadero. En estas emisiones se encuentra el CH₄, este representa un potencial de calentamiento global 23 veces más que el CO₂ (Rodríguez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2017).

En Estados Unidos de América (EUA), existen legislaciones específicas para el manejo y el depósito de excretas animales que impactan a los cuerpos de agua, suelo y la atmósfera; las cuales son supervisadas y certificadas por la agencia de protección ambiental (EPA). En Canadá, las regulaciones para el manejo y depósito de excretas animales son menos rigurosas. En Argentina, Chile, Colombia y México, la regulación y vigilancia gubernamental sobre el uso y manejo de excretas animales es escasa, sin especificaciones claras relacionadas con la disposición de excretas de ganado (Rodríguez *et al.*, 2012).

Alrededor del mundo, han existido tecnologías que desde la antigüedad se han utilizado para el tratamiento de residuos de: estiércol, alimentos, cultivos agrícolas y desechos industriales orgánicos; evidencia histórica indica que, el proceso de digestión anaerobia (DA) es una de las tecnologías más antiguas. El concepto de DA se ha introducido alrededor de 1870 con el desarrollo del sistema de tanques sépticos por Jean-Louis Mouras. Fue Louis Pasteur (1822-1895) quien informó que el biogás, producido durante la DA, podría ser utilizado para calefacción e iluminación (Pramanik *et al.*, 2019).

Se estima que 1,200 millones de personas en el mundo carecen de acceso a la electricidad, y 2.8 millones de personas dependen de la biomasa para cocinar y como medio de calefacción.



En este sentido, el biogás, es una opción que ofrece muchas posibilidades para contribuir a satisfacer estas necesidades (FIRCO-SAGARPA 2016). Hoy en día, la DA, se utiliza para el tratamiento de aguas residuales y residuos sólidos (Lora Grando *et al.*, 2017). El biogás es una mezcla del gas combustible CH_4 (40–65% v/v), CO_2 (35–55% v/v), humedad, entre otros compuestos traza como son el H_2S (0.1–3% v/v), compuestos orgánicos volátiles, amoníaco y siloxanos (Aryal *et al.*, 2018; Sahota *et al.*, 2018).

La Figura 1 esquematiza el proceso fermentativo para la generación de biogás; las bacterias juegan un papel importante, estas interactúan entre sí, en una serie de reacciones metabólicas complejas en ausencia de oxígeno. Estos procesos metabólicos se han dividido en 3 etapas principales: 1) Hidrólisis y fermentación, 2) Acetogénesis y 3) Metanogénesis. (Corrales *et al.*, 2015):

- 1) Hidrólisis y fermentación: el proceso involucra la hidrólisis de sólidos insolubles, es decir partículas orgánicas (celulosa o hemicelulosa) o coloides orgánicos (proteínas), en compuestos solubles simples que pueden ser absorbidos a través de la pared celular de las bacterias, posteriormente dichas moléculas hidrolizadas son catalizadas por bacterias fermentativas en alcoholes y ácidos grasos, teniendo como resultado de este proceso, la producción de hidrógeno y CO_2 .
- 2) La Acetogénesis, se produce ácido acético a través de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta o alcoholes o a través de la reducción del CO_2 , usando hidrógeno como donador de electrones para la reacción.
- 3) La Metanogénesis, es llevada a cabo por arqueas las cuales obtienen su energía de la conversión de un número restringido de sustratos a CH_4 .

Se identifica a la tecnología de DA, como la mejor manera de mitigar los impactos negativos de la degradación del estiércol, generando energía limpia y renovable a partir del biogás (Thanakunpaisit *et al.*, 2017).

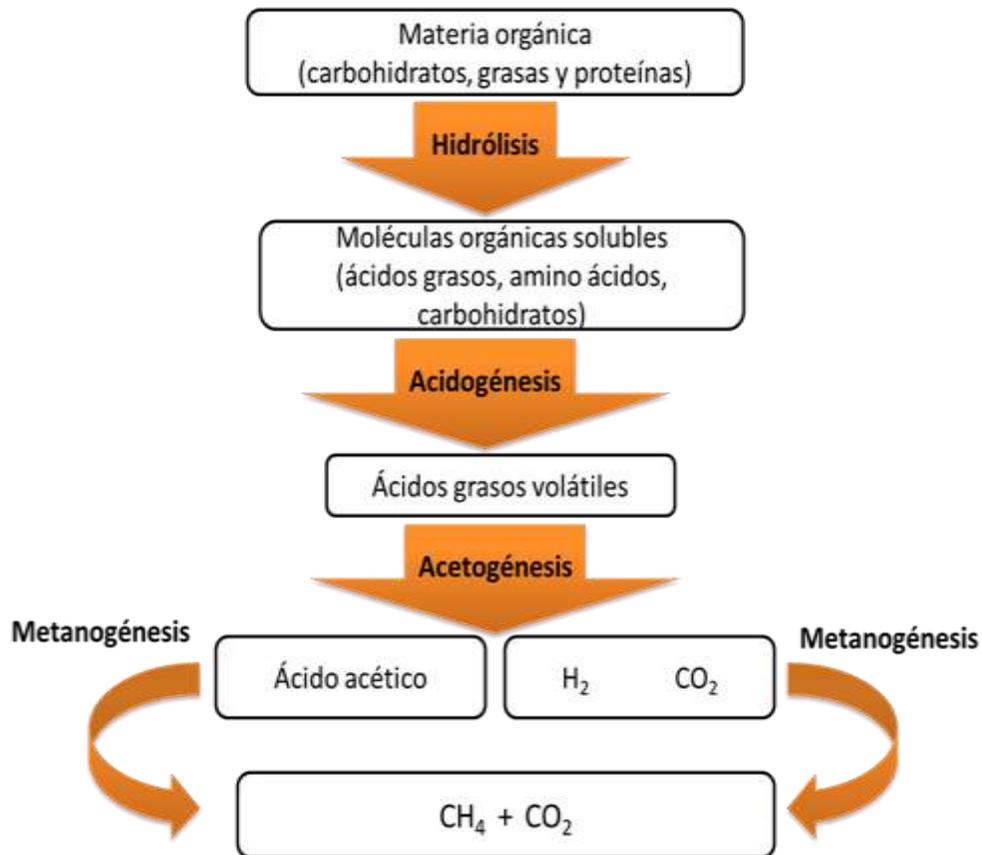


Figura 1. Representación esquemática del proceso de digestión anaerobia

2.1.1. Aplicación del biogás para la generación de energía eléctrica a nivel mundial

Respecto a la cantidad empleada de biogás en la industria para generación de electricidad a nivel mundial, en la Tabla 1 se muestran los porcentajes de contribución de suministro de biogás en el año 2014; los países europeos como Alemania, Reino Unido y Francia, encabezan la lista con un alto porcentaje de suministro de biogás para la generación de energía eléctrica en comparación con países asiáticos y américa Latina (FIRCO-SAGARPA, 2016).



Tabla 1. Contribución del suministro de biogás a nivel mundial 2014-2015 (datos tomados de FIRCO-SAGARPA, 2016)

País	Contribución del suministro del biogás
Alemania	63.8 %
Reino Unido	30%
Francia	26.1%
Polonia	5.7%
Italia	47.1%
Dinamarca	19.2%
China	27%
Estados Unidos	16.7%
México	6.67%
Brasil	1.1%

En el año 2015, la producción de biogás a nivel mundial fue de aproximadamente de 57 mil millones de metros cúbicos que corresponde a una fuente de energía de aproximadamente de 289 TWh - 400 TWh; de los cuales los principales países con mayor producción fueron Alemania con un promedio total de 9 mil millones de metros cúbicos, seguida por Suiza que produjo un 30%. En China, la capacidad de producción anual de biogás alcanzó los 15.8 millones de metros cúbicos, aproximadamente el 5% del consumo de gas natural (Xue *et al.*, 2020).

En la Figura 2, se muestra la producción de biogás a nivel mundial en el año 2015; Europa representa la mitad (53%) de la producción mundial de biogás.

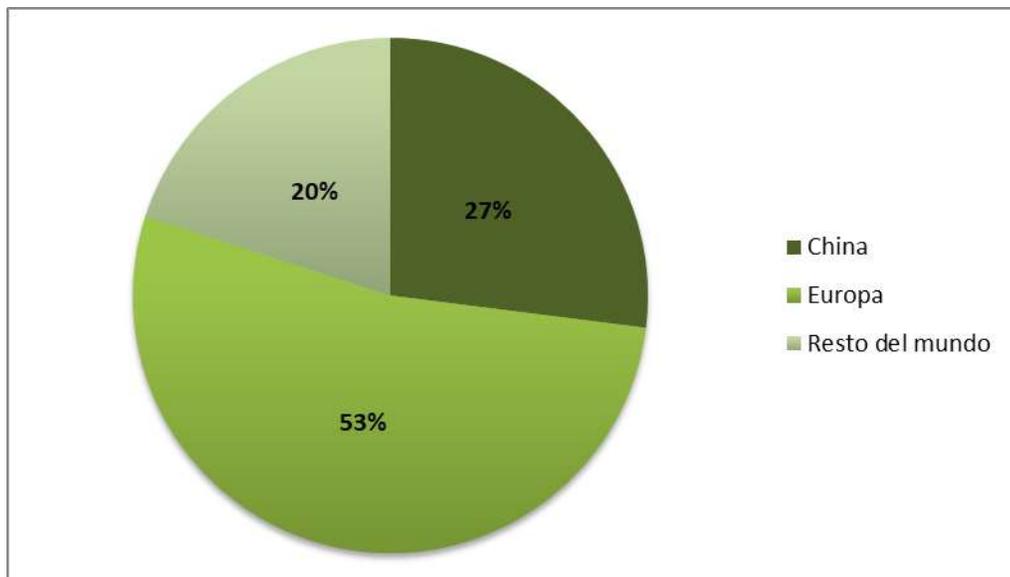


Figura 2. Tasa de producción mundial de biogás en el año 2015. Datos tomados de Xue *et al.*, (2020).

México cuenta con un potencial de 3000 MW distribuidos en 721 biodigestores, sin embargo, solo 367 están en operación. Se estima que la capacidad instalada en energías renovables se incrementará en 20,869 MW para el año 2029 (un crecimiento del 134% con respecto al 2014) (Merino, 2017).

La distribución del número de biodigestores por estado se muestra en la Tabla 2. A nivel industrial, los estados con la mayor cantidad de biodigestores son: Jalisco (252), Sonora (243), Yucatán (176) y Guanajuato (78). En el 2013, se reporta que de las 13 centrales eléctricas a partir de biogás, nueve operaban en la modalidad de autoabastecimiento, las cuales se ubican en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Guanajuato, Nuevo León, Coahuila, Querétaro y Puebla; y cuatro operaban bajo la modalidad de cogeneración, las cuales se encuentran en los estados de Jalisco, Nuevo León, México y Querétaro. Cabe indicar que la CFE no participa en la generación de este tipo de energía (FIRCO-SAGARPA, 2016).



Tabla 2. Registro del número de digestores anaerobios en México en el año 2015 (Datos tomados de FIRCO-SAGARPA, 2016).

Estado	Sector doméstico	Sector productivo	Sector industrial	Total
Jalisco	5	23	252	280
Sonora	0	7	243	250
Yucatán	48	5	176	229
Guanajuato	6	14	78	98
Durango	1	9	67	77
Puebla	169	14	63	246
Coahuila	0	11	57	68
Nuevo León	0	3	46	49
Aguascalientes	0	4	32	36
Querétaro	98	5	30	133
Chihuahua	9	3	22	34
Michoacán	5	2	21	28
Tamaulipas	8	10	21	39
Sinaloa	1	4	20	25
Veracruz	12	3	17	32
Edo. de México	130	12	11	153



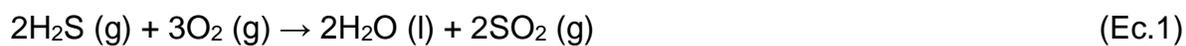
A pesar de los grandes beneficios que aporta la producción de biogás para la generación de energía; en México el 70% de los biodigestores anaerobios existentes están en operación, el resto se encuentra fuera de servicio. Esto se debe principalmente a problemas técnicos que llegan a surgir en estos sistemas, entre ellos, la generación de H_2S . En el caso particular del establo lechero “Los Arados”, ubicado en la ciudad de Delicias, Chihuahua; cuenta con un biodigestor que tiene la capacidad de procesar 6156 Ton/año de excreta para la producción de 203148 $m^3/año$ de biogás, este biogás genera alrededor de 485899 kWh/año. Esto contribuye con el medio ambiente, evitando que se emitan a la atmósfera el equivalente de 234418 Ton $CO_2/año$ (Merino, 2017).

El establo “los Arados” cuenta con un motogenerador de pistones, este produce 100 kW de energía eléctrica con un consumo de $10 m^3 h^{-1}$ de biogás, no obstante tolera concentraciones menores a $200 mg L^{-1}$ de H_2S . Dicho establo también cuenta con una turbina capstone que produce alrededor de 30 kW de energía eléctrica, con un consumo de $11 m^3 h^{-1}$ de biogás y una tolerancia de $70,000 mg L^{-1}$ de H_2S , además de representar un ingreso mensual de \$89000. Sin embargo ambos generadores de energía eléctrica se encuentran inactivos, ya que la concentración de H_2S (10,000 ppm) en la corriente de biogás es tan alta, que ambos equipos representan un costo mayor en su mantenimiento. Aunque la turbina capstone puede ser una buena opción por su tolerancia a concentraciones altas de H_2S , la energía eléctrica que produce no es equiparable a los 100 kW de energía eléctrica que produce el moto generador de pistones (Merino, 2017). Esto hace evidente la necesidad de la búsqueda de tecnologías para la desulfuración de biogás. Es de particular interés el H_2S ; este se forma durante la DA mediante la descomposición de sustancias orgánicas que contienen aminoácidos sulfurados, así como por la descomposición de sales (sulfuros) mediante la acción de BSR (Ventura *et al.*, 2019). El H_2S tiene consecuencias negativas para la salud y la economía del lugar en donde se genera, tales como la alta capacidad de corrosión y toxicidad.



2.2. *H₂S en el biogás*

Está demostrado que el H₂S en la corriente de biogás corroe el acero, incluido el acero inoxidable, así como las aleaciones de cobre y níquel provocando, eventualmente, fugas de gas; es explosivo (4.3-4.5% por volumen de aire) e inflamable (temperatura de ignición 260°C). Además puede reaccionar directamente con el vapor de agua produciendo ácido sulfuroso (H₂SO₃), también puede oxidarse a dióxido de azufre (SO₂) durante la combustión, causando la corrosión en los motores; en la Ecuación 1 (Ec.1), se muestra la conversión de sulfuro de hidrógeno a dióxido de azufre en el aire por combustión (Malone *et al.*, 2017; Wang H. *et al.*, 2019).



La OSHA afirma que la concentración máxima aceptable para la exposición humana al H₂S es de 20 ppm solo durante 8 h; la exposición a concentraciones más altas, tiene graves efectos negativos para la salud (Kolluru *et al.*, 2013; Choudhury *et al.*, 2019). La exposición a H₂S ocurre más comúnmente en fábricas de papel y textiles, refinerías de petróleo, sitios de extracción de gas natural y lugares donde se genera el biogás. Se ha informado que el H₂S causa irritación de la mucosa de los ojos y las vías respiratorias (Ventura *et al.*, 2019). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una concentración relativamente baja de H₂S (0.008 ppm) tiene un efecto adormecedor, por lo que su propio olor no proporciona una advertencia de niveles peligrosos de H₂S. El sentido del olfato se pierde a niveles de 150 a 250 ppm, mientras que niveles de 500 ppm y más pueden ser fatales llegando a provocar la muerte (Jones, 2014). En la Tabla 3 se muestran los efectos de exposición a diferentes concentraciones de H₂S de acuerdo con el ANSI, ATSD y la OSHA. Como se puede observar, conforme aumentan la exposición a este agente a altas concentraciones, el daño a la salud se vuelve irreversible (Malone *et al.*, 2017).

Tabla 3. Concentraciones de exposición aguda y crónica a H₂S en el ambiente y sus efectos a la salud. Adaptado de (Malone et al., 2017).

Concentración de H₂S (mg/dm³)	Efectos / síntomas esperados
0.00011-0.00033	Sin efecto negativo a la salud.
0.0005	Concentración más baja detectable por el sentido del olfato.
0.01-1.5	Umbral de olor (cuando el olor a huevo podrido se nota por primera vez). El olor se vuelve más intenso a 3-5 ppm.
2-5	La exposición prolongada puede causar náuseas, lagrimeo de ojos, dolores de cabeza o pérdida de sueño, constricción bronquial en algunos pacientes con asma.
20	Posible fatiga, pérdida de apetito, dolor de cabeza, irritabilidad, mala memoria, mareos.
50-100	Conjuntivitis leve e irritación del tracto respiratorio después de 1 h de exposición. Puede causar malestar digestivo y pérdida de apetito.
100	Tos, irritación ocular, pérdida del sentido del olfato después de 2-15 min. Respiración alterada, dolor en los ojos y somnolencia después de 15 a 30 min, seguido de irritación de la garganta después de 1 h.
100-150	Pérdida del olfato (fatiga olfativa o parálisis).
200-300	Marcada conjuntivitis e irritación del tracto respiratorio después de 1 h de exposición. Puede producirse edema pulmonar por exposición prolongada.
500-700	Pérdida de conciencia y posiblemente muerte entre 30 - 60 min de exposición.
700-1000	Inconsciencia rápida, “caída” o colapso inmediato, cese de la respiración y muerte en minutos.
1000-2000	La muerte puede ocurrir incluso si el individuo es trasladado a un lugar con aire fresco.



2.3. Métodos de remoción de H₂S

La eliminación de H₂S es necesaria para el uso seguro del biogás como fuente de energía. Se han desarrollado sistemas físicos y químicos de separación selectiva de H₂S que emplean: a) Scrubbing (SB) o lavado químico de gases; b) líquidos iónicos (LIs); c) procesos termocatalíticos (tecnología Claus); d) tecnologías electroquímicas; e) técnicas de adsorción, solo por mencionar algunas (Vikrant *et al.*, 2018).

a) SB o lavado químico de gases

EL scrubbing fue aplicado por primera vez para la desulfuración de gases de combustión, en dos plantas británicas de una central eléctrica a carbón (Fulham Power Station) en 1936, y se identificó como una tecnología efectiva desde 1965. Este es un método fisicoquímico simple que puede transferir contaminantes gaseosos a una solución acuosa. La cantidad de dichos contaminantes transferidos depende de su concentración y solubilidad, junto con la resistencia a la transferencia de gases del SB. Para mejorar la solubilidad del H₂S en el sistema de depuración, se puede convertir en compuestos solubles en agua mediante oxidación catalítica o proporcionando condiciones más alcalinas (OH⁻, HCO₃⁻ y CO₃⁻²) para el tratamiento de gases. Sin embargo, esta tecnología tiene un costo alto, poca confiabilidad y bajo desempeño ambiental (Rochelle *et al.*, 2009; Kailasa *et al.*, 2019).

b) Lis

Recientemente, los investigadores se han centrado en los Lis. Estos son generalmente sales compuestas de un catión heterocíclico sustituido con un anión orgánico o inorgánico, y se han explorado como solventes verdes o amigables con el medio ambiente (Bhutto *et al.*, 2016; Vekariya *et al.*, 2017); Los Lis se caracterizan por ser componentes de bajo punto de fusión que contienen cationes orgánicos voluminosos y aniones orgánicos o inorgánicos poli atómicos. La baja presión de vapor y la alta estabilidad térmica, son otras de sus propiedades que los hacen aplicables en la industria; como procesos de absorción/separación para eliminar H₂S de las corrientes de gas, este proceso consiste en la solubilidad del



H₂S en los LIs, este fenómeno está determinado por los momentos dipolares y cuadrupolo que presenta el H₂S (Chiappe *et al.*, 2017). Investigaciones han demostrado la capacidad de solubilidad del H₂S en los LIs, la cual aumenta notablemente con la alcalinidad de los aniones y la longitud de la cadena de alquilo de los cationes. Otros informes han revelado que los grupos funcionales como los grupos amino y los grupos de ácido carboxílico desempeñan un papel clave para minimizar la viscosidad de las LI y capturar H₂S con alta selectividad. (Jalili *et al.*, 2013; Panah *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Soltani *et al.*, 2017; Kailasa *et al.*, 2019; Wang, Y *et al.*, 2019).

c) Procesos termocatalíticos (tecnología Claus)

Esta tecnología fue presentada por primera vez por Claus en una patente en 1883 y luego fue mejorado e investigado para tratar gases que contienen compuestos de azufre en su estado reducido (El-Bishtawi *et al.*, 2004). Consiste en una oxidación catalítica selectiva y completa de H₂S. La tecnología Claus generalmente convierte el 94–98% de los compuestos reducidos de azufre en azufre elemental (Nassar *et al.*, 2016). Sin embargo, el SO₂ puede formarse mediante la oxidación de H₂S o la oxidación adicional de azufre elemental. Por lo tanto, el proceso efectivo para la recuperación de azufre, depende en gran medida de la actividad específica del catalizador. Además, la mayoría de los catalizadores actuales se producen a altas temperaturas (200–300 °C). Por lo tanto, implica más energía y un proceso de alto costo (Li *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019)

d) Tecnologías electroquímicas

Las técnicas electroquímicas no requieren dosificación, transporte y almacenamiento de productos químicos potencialmente peligrosos. Las reacciones de oxidación electroquímica se pueden dividir en oxidación directa e indirecta. La oxidación directa en la superficie del electrodo puede tener lugar si un compuesto es electroquímicamente activo; durante la oxidación directa de sulfuro, el sulfuro se oxida en la superficie del electrodo a azufre (S⁰), tiosulfato (S₂O₃⁻²), sulfito (SO₃⁻²) o sulfato (SO₄⁻²), según el material del ánodo utilizado y el potencial



que se le aplica. La oxidación indirecta consta de la formación de mediadores físicos y químicos para la absorción de especies como el oxígeno, cloro, Ag^{2+} y Ce^{4+} en la superficie del electrodo, que posteriormente se difunde lejos del electrodo hacia la fase acuosa en donde se produce la reacción de oxidación real. La principal desventaja es la deposición de azufre elemental sobre la superficie del electrodo, resulta en la saturación del electrodo y, finalmente, el final del proceso. Es factible oxidar el sulfuro a azufre elemental, pero no hay suficiente información sobre el potencial económico (Pikaar *et al.*, 2014).

Todos estos métodos requieren cantidades significativas de productos químicos y / o energía, lo que conlleva grandes costos operativos. Además, el transporte, la manipulación y el almacenamiento frecuentes de productos químicos conllevan problemas de salud y seguridad en el trabajo (Pikaar *et al.*, 2014). El método más utilizado para eliminar H_2S es la adsorción. Los estudios se han centrado en encontrar materiales adsorbentes y de bajo costo como la madera, barro activado, cenizas de bagazo, barro rojo, turba, carbón activado (CA), lignito, zeolita, etc., así como productos de desecho industrial, agrícola y doméstico (Aguilera *et al.*, 2016; Thanakunpaisit *et al.*, 2017; Montes-Luna *et al.*, 2020; Sánchez-Ruíz *et al.*, 2020).

e) Técnicas de adsorción

Las técnicas de adsorción se utilizan debido a su simplicidad de operación, bajos costos iniciales y de implementación, además del buen desempeño para la remoción de contaminantes. La adsorción es una alternativa sostenible que utiliza desechos sólidos para la producción de materiales adsorbentes (Puchana-Rosero *et al.*, 2016).

El CA es un material de adsorción ampliamente utilizado debido a sus propiedades texturales, que incluyen mayor área de superficie (750 a $1,500 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), volumen total de poros así como la estructura de los poros. Estas características permiten el uso de CA como material prometedor para la adsorción de una amplia variedad de productos químicos a través de diversas fuerzas no covalentes (van der Waals, apilamiento $\pi - \pi$, electrostático, hidrofóbico y enlace H) (Puchana-Rosero *et al.*, 2016; Kailasa *et al.*, 2019; Foo *et al.*, 2010; Habeeb *et al.*, 2019)



En años recientes, el tratamiento de gases que contienen compuestos de azufre, se basa en la adsorción; este tipo de tratamiento ha atraído considerable atención científica en la química de los materiales debido a numerosas ventajas (p. Ej., gran área superficial) de los adsorbentes (p. Ej., óxidos metálicos, carbonos activados y zeolitas). Estos adsorbentes también se pueden funcionalizar para alterar sus propiedades físicas y químicas, y de esta manera aumentar sus interacciones con las moléculas objetivo. Los óxidos de Cu, Ce, Mo, Sn, Mn, W, Co, Fe, Zn y Ni, y el uso de aminas se han utilizado para tales fines (Hamed *et al.*, 2014; Ozekmekci *et al.*, 2015; Azzouz *et al.*, 2018).

2.4. Biotecnología ambiental y su aplicación en la desulfuración de biogás

La biotecnología ambiental es la rama de la biotecnología que aborda problemas ambientales, como la eliminación de la contaminación, la generación de energía renovable o la producción de biomasa, mediante la explotación de procesos biológicos (Mantecón, 2018). La aplicación de la biotecnología ambiental, presenta la ventaja de tratar altas concentraciones de H₂S, mediante métodos eficaces y sencillos. En este sentido, la biofiltración tiene como objetivo maximizar la eficiencia de eliminación de H₂S a través del diseño y la optimización de biorreactores inoculados con consorcios microbianos sulfato oxidantes, los cuales tienen la capacidad de oxidar el H₂S a compuestos menos tóxicos para el medio ambiente y la salud (Vikrant *et al.*, 2018); el azufre elemental se puede eliminar completamente de la fase líquida del sistema debido a su baja solubilidad en agua y se utiliza en la industria como fertilizante al igual que los sulfatos (Beristain-Cardoso *et al.*, 2008; Pokorna *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2018). Desde la perspectiva del LCT se ha encontrado que la biotecnología es más favorable que las tecnologías físico-químicas (Cano *et al.*, 2018).

Las biopelículas formadas por consorcios microbianos, desempeñan un papel crucial en los biofiltros, ya que la eficiencia de eliminación de los contaminantes de interés como el H₂S, depende principalmente del metabolismo del consorcio. Estas son comunidades microbianas sésiles (células procariotas y / o eucariotas) que crecen en superficies, generalmente adheridas a una matriz polimérica extracelular en una estructura tridimensional. Estas microcolonias pueden estar



conformadas por una misma especie celular o varias. La composición de una micro colonia depende de las especies involucradas y comprende 10% - 25% de células y 75% – 90% de la matriz de EPS (Singh *et al.*, 2020).

En la Figura 3, se esquematiza el proceso de formación de la biopelícula. Este se divide típicamente en cuatro pasos distintos: 1) transporte de bacterias hacia una superficie del sustrato, los microorganismos planctónicos se adhieren a soportes o superficies (orgánicas o inorgánicas) que albergan los nutrientes necesarios para asegurar el crecimiento microbiano; 2) adhesión bacteriana reversible, proceso mediado por flagelos, pili o adhesinas físicas o bacterianas. La adhesión bacteriana depende en gran medida de las condiciones ambientales, como la energía obtenible, el área de superficie, la temperatura y la presión. Cuando las fuerzas repulsivas se vuelven mayores que las fuerzas de atracción, antes del acondicionamiento de un sustrato, se produce un desprendimiento de bacterias de la superficie.; 3) transición de adhesión bacteriana reversible a irreversible, hay varias células bacterianas que se adsorben de manera reversible en la superficie y permanecen inmovilizadas durante un periodo de tiempo, hasta que mediante fuerzas electrostáticas se adsorben a la superficie de manera irreversible. Esto ocurre debido a las interacciones físicas entre las bacterias. Se afirma que la adhesión microbiana depende en gran medida de las propiedades hidrofóbicas-hidrofílicas de las superficies con las que interactúan; 4) deformación de la pared celular para la formación de sustancias poliméricas extracelulares como polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelulares; después de la fase de retraso inicial, comienza una fase exponencial en la que la población aumenta rápidamente a un ritmo constante a costa de los nutrientes contenidos en el sustrato. En esta etapa, comienzan a sintetizarse polisacáridos de adhesión intercelular que en conjunto con los cationes divalentes ayudan a construir fuertes enlaces entre las células y la superficie donde dichas células se adhieren.

En esta fase, las comunidades microbianas entran en fase estacionaria, la biopelícula participa en la señalización celular, a este fenómeno se le denomina QS. QS es un mecanismo de comunicación entre los microorganismos inducido por varios auto inductores para impulsar la expresión de genes junto con procesos mecánicos y enzimáticos, que son los componentes básicos de la matriz extracelular (Carniello *et al.*,2018; Vikrant *et al.*,2018; Singh *et al.*, 2017).

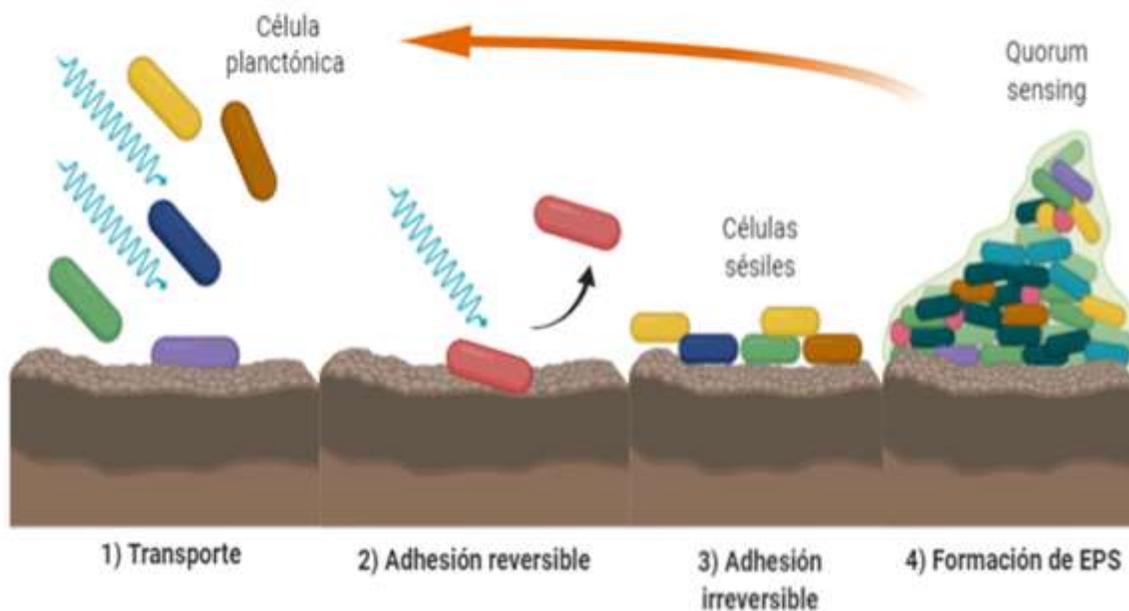


Figura 3. Esquematación del proceso de formación de biopelícula; 1) transporte de bacterias hacia una superficie del sustrato; 2) adhesión bacteriana reversible a una superficie del sustrato; 3) transición de adhesión bacteriana reversible a irreversible; 4) deformación de la pared celular para la formación de sustancias poliméricas extracelulares como polisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelulares (Carniello *et al.*, 2018; Vikrant *et al.*, 2018).

La eliminación biológica del H_2S , se basa principalmente en la actividad del metabolismo de bacterias fotoautotróficas o quimiolitotróficas que oxidan este compuesto. Las bacterias sulfato oxidantes (BSO) fotoautotróficas obtienen energía a partir de la energía lumínica, mientras que las BSO quimiolitotróficas obtienen energía directamente mediante reacciones de oxidación de sustratos inorgánicos. Donde el oxígeno y los nitratos/nitritos sirven como aceptores de



electrones liberados durante la oxidación de H₂S para BSO aerobias y anaerobias respectivamente (Pokorna *et al.*, 2015).

Desde un punto de vista tecnológico, para la eliminación biológica de H₂S, el tipo de BSO más importantes son las quimiolitotróficas (*Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* y *Thiothrix*), también conocidas como bacterias incoloras oxidantes de azufre. Son particularmente adecuadas, ya que presentan una tasa alta de oxidación de H₂S, además de tener requerimientos nutricionales sencillos y una afinidad extremadamente alta por el H₂S y el oxígeno. Estas propiedades les permiten llevar a cabo la oxidación del H₂S tanto en el medio ambiente natural como en los biorreactores con un suministro limitado de oxígeno (Pokorna *et al.*, 2015; Janssen, *et al.*, 1998).

A) Bacterias fototróficas oxidantes de azufre

Como su nombre lo dice, estos microorganismos requieren de luz como fuente de energía para llevar a cabo reacciones químicas. El H₂S se oxida a azufre elemental, mientras que el CO₂ se reduce y se incorpora a los compuestos orgánicos. La intensidad de una energía luminosa aplicada depende de la concentración de H₂S y se expresa mediante la llamada curva de van Niel (Pokorna *et al.*, 2015). El concepto de Van Niel Curve fue introducido originalmente por Cork *et al.*, (1985) y describe la relación entre la carga de S²⁻ y la intensidad de la luz (flujo radiante) (Ec. 2).



Henshaw *et al.*, (2001) evaluaron la remoción de H₂S en un biorreactor fotosintético de flujo continuo de película fija, en aguas residuales industriales, mediante el uso de la bacteria *Chlorobium thiosulfatophilum*, convirtiendo el H₂S en azufre elemental.



Las tasas de eliminación de H_2S fueron del 82 al 100% y las tasas de recuperación de azufre elemental del 75 al 95%. No obstante, el principal problema asociado con el uso de SOB fototróficas consiste en que tienen lenta tasa de crecimiento y, por lo tanto, la fuente de luz debe ser lo suficientemente fuerte, lo que no solo requiere una inversión considerable, sino también costos operativos.

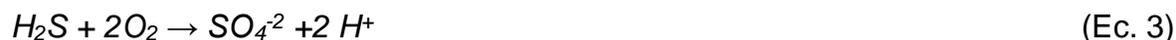
B) Bacterias quimiolitotróficas oxidantes de azufre

Las bacterias oxidantes quimiolitotróficas conocidas como bacterias incoloras oxidantes del azufre utilizan la energía de los compuestos de azufre inorgánicos reducidos (sulfuro de hidrógeno, tiosulfatos, sulfitos, azufre elemental), pero en algunos casos también de compuestos de azufre orgánicos (por ejemplo, metanetiol, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo) (Pokorna *et al.*, 2015). Estas bacterias utilizan CO_2 como fuente de carbono para la construcción de nuevo material celular. Las bacterias incoloras oxidantes de azufre, en su mayoría son gram negativas y, en términos de los requisitos de crecimiento, difieren mucho incluso en las diferentes especies de un género. Sus temperaturas óptimas son de 4 a 90 ° C y los valores de pH están en el rango de 1 a 9. La mayoría de las bacterias quimiolitotróficas estudiadas prosperan mejor en condiciones mesofílicas o termofílicas (*Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*) (Tang *et al.*, 2009)

Las bacterias oxidantes quimiolitotróficas consisten en dos grupos morfológica y taxonómicamente distintos; son bacilos del género *Thiobacillus* (*Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus denitrificans* o *Thiobacillus thiooxidans*) y bacterias filamentosas largas de los géneros *Beggiatoa* y *Thiothrix*. El grupo de bacterias filamentosas largas oxida el H_2S a azufre elemental (S^0), que almacenan dentro de la célula, y posteriormente puede oxidarse a sulfatos. Cuando el suministro de H_2S es adecuado, el S^0 se almacena dentro de la célula en forma de gotas negras, pero en caso de escasez de sulfuro de hidrógeno o exceso del agente oxidante, el S^0 se oxida aún más a sulfatos solubles capaces de atravesar las paredes celulares (Pokorna *et al.*, 2015).



La oxidación del H_2S puede ser inducida en especies de *Thiobacillus* a través de la vía sulfito oxidasa. En las siguientes reacciones químicas (Ecuaciones 3-6) se muestra el proceso biológico global de oxidación del H_2S en condiciones aerofilicas (Meier *et al.*, 2017).



La biodegradación del H_2S presente en la corriente de biogás se ha estudiado principalmente en condiciones microaerofilicas, pero también se han informado varios estudios que utilizan condiciones anóxicas. La principal ventaja de trabajar en condiciones anóxicas es que el biogás no se diluye con el aire, por lo que la concentración de CH_4 no se reduce. Además, estas condiciones evitan el riesgo de explosión de la mezcla O_2 / CH_4 . En este caso, los nitratos (NO_3^-) pueden usarse como aceptores de electrones en lugar de O_2 . No obstante, los biorreactores anóxicos producen menos biomasa que los biorreactores aeróbicos debido a la naturaleza inorgánica de los reactivos y al menor rendimiento energético, como resultado del menor potencial de oxidación del nitrato en comparación con el O_2 (Soreanu *et al.*, 2008; Ramírez-Sáenz *et al.*, 2009; Jaber *et al.*, 2017). Chaiprapat *et al.*, 2011 proponen que un suministro suficiente de O_2 es clave para el éxito de la operación del sistema. Al mismo tiempo, se debe mantener la cantidad de CH_4 sin cambios en el sistema.

En una operación de biofiltración típica, una corriente de biogás líquido con H_2S pasa a través de un lecho lleno de materiales adsorbentes inorgánicos u orgánicos. El H_2S se biodegrada en una delgada biopelícula, formada principalmente por exopolisacáridos y agua, donde las moléculas contaminantes se absorben de la fase gaseosa (Vikrant *et al.*, 2018).

2.5. Ciclo del azufre en la remoción de H_2S

Las bacterias implicadas en el ciclo del azufre (Figura 4) han sido objeto de numerosos estudios. En particular, las bacterias reductoras de sulfato y oxidantes de sulfuro son de gran importancia desde el punto de vista industrial y medioambiental (Pokorna *et al.*, 2015).

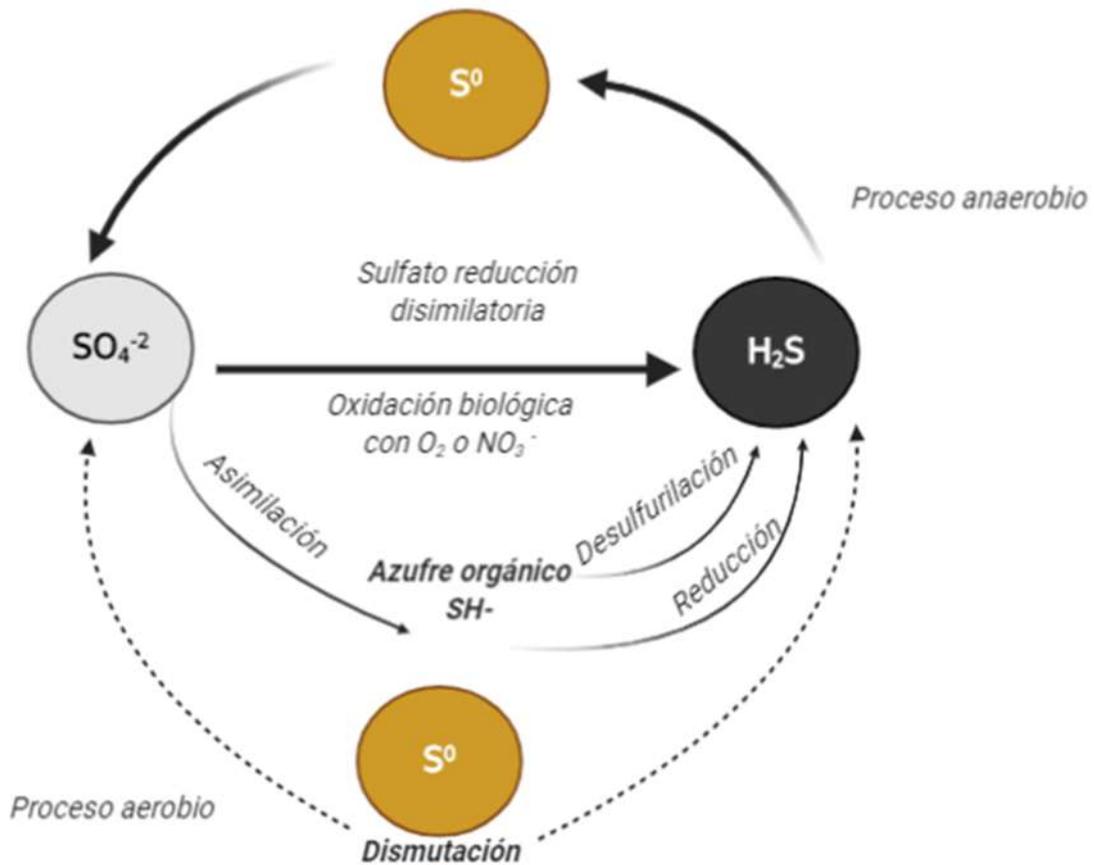


Figura 4. Representación esquemática del ciclo del azufre mediado por microorganismos (Imagen modificada de Tang *et al.*, 2009).



2.5.1. **Metabolismo microbiano sulfato reductor**

Las transformaciones biológicas del azufre son complicadas debido a sus diversos estados de oxidación: -2 (sulfuro y azufre orgánico reducido), 0 (azufre elemental) y +6 (sulfato); además de los diversos organismos microbianos involucrados en el ciclo del azufre. Los dos grupos principales de microorganismos involucrados en el ciclo biológico del azufre son las BSR y las BSO. BSR utiliza compuestos de azufre oxidado (por ejemplo, SO_4^{2-} , SO_3^{2-} y S^0) como aceptores de electrones y produce sulfuro mientras oxida los compuestos orgánicos para la generación de energía y el crecimiento celular (Lin *et al.*, 2018).

El sulfuro puede ser producido por microorganismos anaerobios como resultado de la descomposición de las proteínas en aminoácidos y una mayor degradación de los aminoácidos en sulfuro, o la reducción directa de sulfato en sulfuro por SRB. La reducción de sulfato puede ocurrir a través de vías asimilatorias o disimiladoras. La vía de asimilación genera compuestos de azufre reducidos para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas y no conduce a la excreción directa de sulfuro. En la reducción disimilatoria, el sulfato (o azufre) se reduce a sulfuro inorgánico mediante SRB (Postgate, 1984).

En general, la reducción de sulfato incluye tres pasos principales: (1) activación de sulfato a adenosina 5'-fosfosulfato (APS) (Ec. 7); (2) reducción de APS a sulfito (Ec. 8); y (3) reducción de sulfito a sulfuro (Ec. 9). La reducción de sulfato es un proceso intracelular que requiere transporte activo de sulfato. Primero, antes de la reducción, el sulfato debe ser activado por ATP sulfurilasa para producir APS y pirofosfato (Broco *et al.*, 2005).



Las SRB no pueden utilizar directamente el ion sulfato (SO_4^{2-}) como donador de electrones para su crecimiento. Por si solo el SO_4^{2-} es un donante de electrones inadecuado para las SRB, ya que es una forma oxidada termodinámicamente estable del azufre. La reducción asimilatoria y disimilatoria del SO_4^{2-} , comienza con su activación por el trifosfato de adenosina (ATP) mediante la enzima ATP sulfurilasa a Adenosina 5'- fosfosulfato (APS) (Muyzer & Stams, 2008).

En la Figura 5, se esquematizan la sulfato reducción asimilativa y disimilativa. En la reducción asimilativa, el resto sulfato de APS se reduce directamente a sulfito (SO_3^{2-}) por la enzima APS reductasa; se agrega otro átomo de fósforo al APS para formar fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS). PAPS luego se reduce a SO_3^{2-} . Una vez que se forma el sulfito, se convierte en sulfuro por la enzima sulfito reductasa. En la reducción disimilativa, el sulfuro se excreta, mientras que en la reducción asimilativa, el sulfuro se incorpora en compuestos orgánicos de azufre (Madigan *et al.*, 2006).

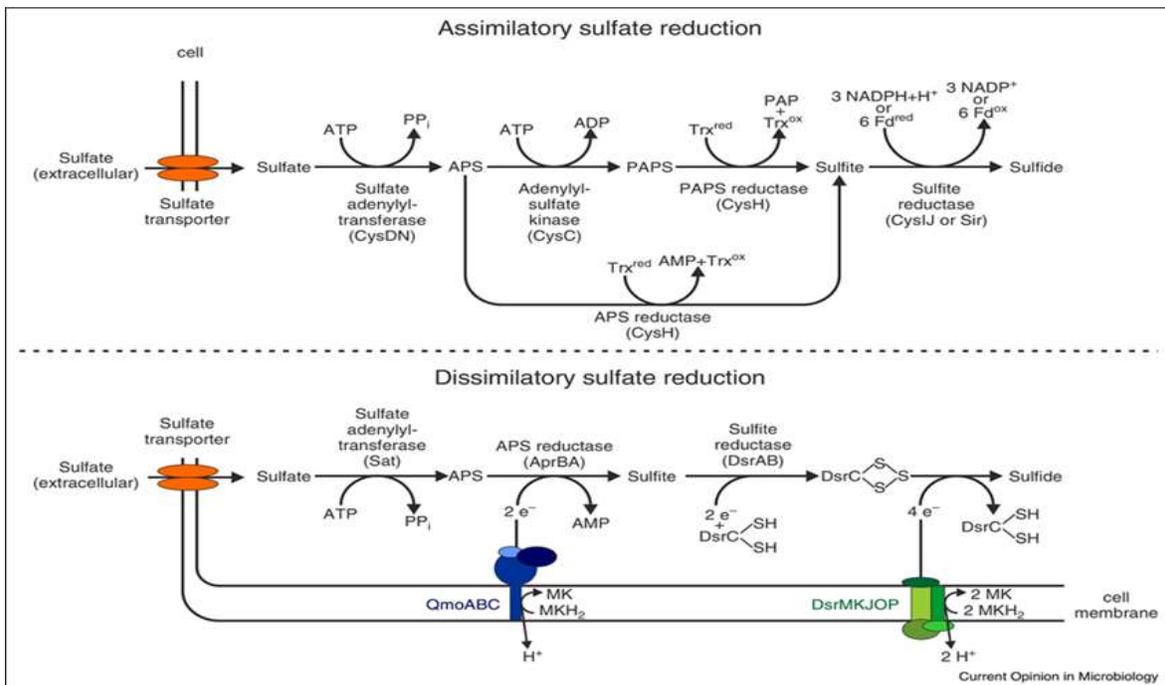


Figura 5. Vías para la reducción asimilatoria y disimilatoria de sulfato. Si bien las enzimas en ambas vías tienden a estar altamente conservadas, con los nombres de proteínas comunes dados, el transporte de sulfato se realiza a través de una amplia variedad de transportadores (Piłsyk & Paszewski, 2009).

La formación de APS es un proceso endergónico. Por lo tanto, a menudo es necesaria la adición de una fuente de carbono adecuada para la reducción de sulfato. En segundo lugar, de manera exergónica, el APS puede ser reducido a sulfito por la reductasa APS. El tercer paso sigue siendo un punto de discusión con dos mecanismos propuestos: la reducción de sulfito a sulfuro que ocurre en un paso a través de la transferencia de seis electrones (vía directa). Otro sugiere la formación de tritronato y tiosulfato como intermedios en la reducción de sulfito (vía del tritronato) (Figura 6). Para la reducción completa de sulfito a sulfuro, intervienen algunas enzimas, como las reductasas de trisulfonato y tiosulfato (Lin et al., 2018).

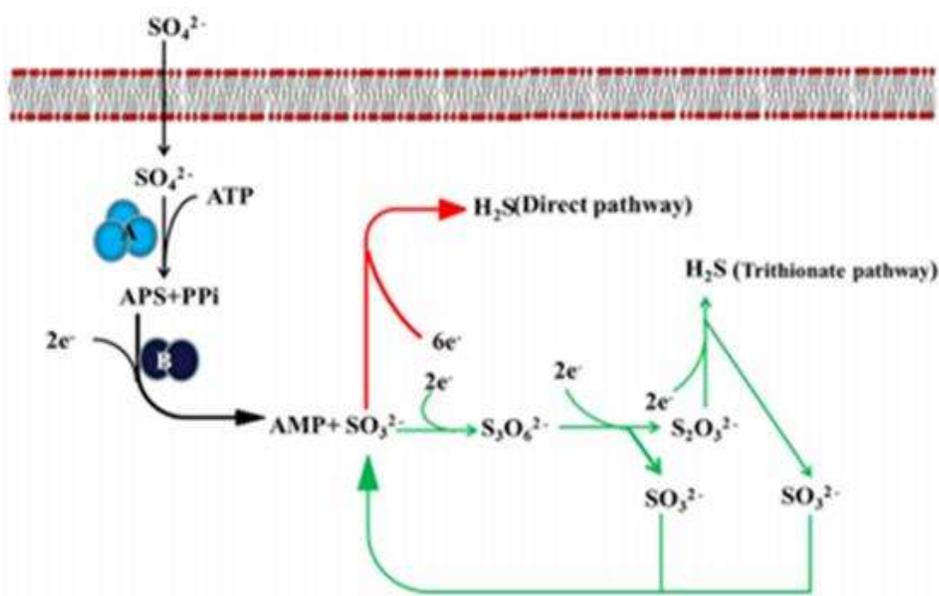


Figura 6. Vías propuestas para la reducción disimilatoria de sulfato; **A)** ATP sulfurilasa; **B)** APS reductasa. Las flechas rojas representan el camino directo; las flechas verdes la ruta del tritronato (Broco *et al.*, 2005; Muyzer y Stams 2008).



2.5.2. **Metabolismo microbiano sulfuro oxidante**

La oxidación química del sulfuro tiene lugar en paralelo con la oxidación biológica y puede afectar positivamente la actividad biológica del BSO al disminuir la concentración inhibitoria de sulfuros. El metabolismo procede espontáneamente en medio alcalino acuoso en presencia de oxígeno suministrado y conduce a la formación de los siguientes productos intermedios: azufre elemental, polisulfuros, sulfitos y tiosulfatos. Entre los factores que influyen en la estequiometría y la cinética de la oxidación química de los sulfuros se encuentra la relación molar de sulfuros y oxígeno, pH, temperatura, fuerza iónica y la presencia de catalizadores o inhibidores (Nielsen *et al.*, 2004).

Las enzimas oxidantes de sulfito se pueden separar en dos clases, las sulfito oxidasas (SO, que se encuentran en animales y plantas, EC 1.8.3.1) y las sulfito deshidrogenasas (SDH, que se encuentran en bacterias, EC 1.8.2.1), en función de su capacidad de transferencia de electrones a oxígeno molecular (Feng *et al.*, 2007).

Durante la oxidación biológica del sulfuro de hidrógeno, al igual que en el caso de la oxidación química, el primero procede a la formación de polisulfuros y su posterior oxidación a azufre elemental S^0 y sulfito con oxígeno como el principal receptor de electrones, que se reducen a H_2O . La oxidación de azufre elemental a sulfato se produce de dos maneras. Más a menudo, la reacción se realiza a través de la enzima citocromo C con formación simultánea de ATP. Otra forma puede ser el uso de adenosina fosfosulfato reductasa (Díaz *et al.*, 2010). La oxidación biológica de los sulfuros en presencia de oxígeno se describe en las ecuaciones 10 - 12 (Tang *et al.*, 2009).





El primer paso en la oxidación del sulfuro implica la producción de sulfito a través de la transferencia de seis electrones desde el sulfuro al sistema de transporte de electrones de la célula y, posteriormente, al receptor de electrones terminal. El aceptor de electrones terminal es principalmente oxígeno, ya que muchos quimiolitotrofos de azufre son aerobios. Sin embargo, algunas especies pueden crecer anaeróbicamente usando nitrato o nitrito como el aceptor de electrones terminal. La oxidación de sulfito a sulfato podría ocurrir a través de dos vías diferentes. En la vía más extendida, la enzima sulfito oxidasa transfiere electrones del sulfito directamente al citocromo C con la formación concomitante de ATP como resultado del transporte de electrones y la fuerza motriz de los protones. En la segunda vía, la oxidación de sulfito se produce a través de una inversión de la actividad de la adenosina fosfosulfato reductasa. Esta reacción produce un enlace fosfato de alta energía al convertir el monofosfato de adenosina (AMP) en difosfato de adenosina (ADP). Cuando el tiosulfato se usa como donante de electrones, se divide en azufre y sulfito elementales, los cuales se oxidan a sulfato (Madigan *et al.*, 1997).

2.6. Configuraciones de biofiltros para la remoción de H_2S en la corriente de biogás.

Un tipo de sistema simple para la desulfuración del biogás, son los biofiltros; se han usado durante casi un siglo. Su funcionamiento se basa en hacer pasar una corriente de biogás húmedo, para posteriormente ser pasado a través de un material de empaque (que puede ser orgánico o inorgánico) en el que residen consorcios microbianos sulfato oxidantes, quienes a través de su metabolismo purifican el biogás removiendo el H_2S . Existen diferentes tipos de biofiltros para la remoción de H_2S : BS o biolavadores, BLF y BLE. En la Fig. 7 se representa de forma esquemática de los principales biofiltros utilizados para la desulfuración de biogás: a) los BS, se caracterizan por oxidar el H_2S principalmente en un reactor de lodo activado externo, y la torre con material empaquetado se utiliza para absorber el sulfuro; b) los BLF y c) BLE, son similares, no obstante se diferencian en la manera en que recircula el medio de cultivo; el BLE se caracteriza por ser un sistema continuo o semicontinuo, mientras que en el BLF se hace de manera

discontinúa o por lote (Lin *et al.*, 2018). San-Valero *et al.* (2019) demostraron la viabilidad técnica del uso de BS aerobio para la desulfuración de biogás con eficiencias de eliminación de H₂S superiores al 80%. Sin embargo los costos asociados con la construcción y operación de BS están por encima que los costos de un BLE (Nagendranatha Reddy *et al.*, 2019).

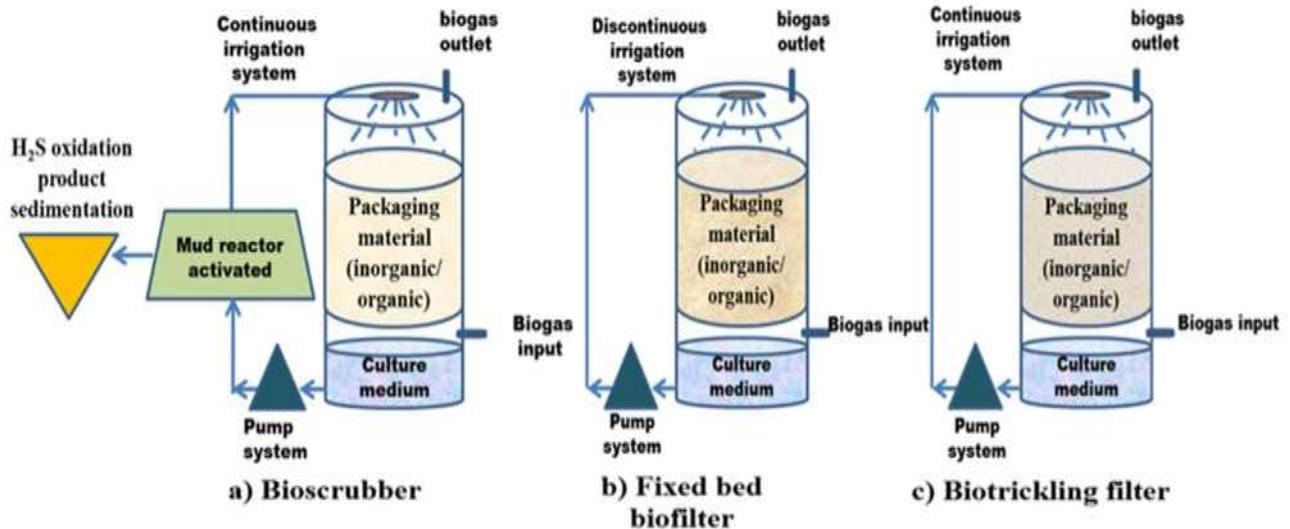


Figura 7. Representación esquemática de los principales biofiltros utilizados para la desulfuración de biogás.

Sin embargo, las tecnologías basadas en los BLE, tienen la particularidad de recircular las partículas celulares así como los nutrientes; la velocidad de alimentación del medio debe de ajustarse para inducir la fluidización, esta proporciona una gran área de superficie para la formación y crecimiento de biopelículas. En estos reactores, las células pueden crecer alrededor del material de empaque y formar una biopelícula. El reciclaje del efluente también puede reutilizarse para asegurar una fluidización uniforme y una velocidad de carga de sustrato adecuada. En la Tabla 4 se enlistan las principales configuraciones de biofiltros, en donde se pueden apreciar las diferencias entre la fase móvil y el tipo de soporte; en base a lo anterior el BLE presenta mayores ventajas en su operación y diseño que otros sistemas de biofiltración para H₂S (Ercan *et al.*, 2013).

Tabla 4. Principales configuraciones de biofiltros para la desulfuración de biogás

Diseño de biofiltro	Fase móvil	Soporte	Biomasa activa
BS	Líquida y gas	Ninguno	Dispersa
BLE	Líquida y gas	Sintético/orgánico	Fija
BLF	gas	Sintético/orgánico	Fija

BS: Bioscrubbing; BLE: Biofiltro de lecho escurrido; Biofiltro de lecho fijo.

Actualmente los BLE se consideran la tecnología más prometedora para la remoción biológica de H₂S (Lin et al., 2018), principalmente debido a una mayor estabilidad del proceso, facilidad para regular el pH y la temperatura, baja resistencia al flujo para la fase líquida móvil; lo que significa que la recirculación del medio de cultivo líquido, elimina los metabolitos intermedios que pudiesen inhibir la actividad metabólica microbiana, además este diseño provee un suministro continuo de nutrientes. (Rybarczyk et al., 2019).

Para la desulfuración de biogás, el diseño de BLE ha demostrado ser una técnica efectiva a nivel piloto y a gran escala en condiciones aerobias (Rodríguez et al., 2014; Gabriel et al., 2013). No obstante, esta tecnología también se ha evaluado en condiciones anaerobias, demostrando la eficacia del sistema mediante estudios piloto y a escala laboratorio (Almenglo et al., 2016; Fernandez et al., 2014; Brito et al., 2017; Cano et al., 2018).

Vikromvarasiri et al., 2017, reportaron un 95-100% de remoción de sulfuro de hidrógeno utilizando el sistema de BLE, con una concentración de entrada de H₂S sintético de 0–1,500 ppm. Giordano et al., 2018, reportaron un prototipo de biofiltro de lecho escurrido a gran escala; la eficiencia de eliminación fue, en promedio, superior al 80% mientras que la concentración promedio de H₂S a la entrada del sistema fue de 170 mgSm⁻³h⁻¹ y el caudal de biogás fue de aproximadamente 8,000 m³ h⁻¹.



Juntranapaporn *et al.*, 2019, trabajaron con el sistema de BLE, obteniendo una eficiencia de remoción de H₂S de 98.3–99.7% en un rango de concentración de entrada de 300–1,500 ppm de H₂S.

Fernández *et al.*, 2013 obtuvieron un 99% de remoción de H₂S al utilizar la biofiltración de lecho escurrido, la carga de entrada del contaminante fue menor a 1,200 mgS m⁻³ h⁻¹.

Cano *et al.*, 2019 estudiaron la influencia de las condiciones operacionales del sistema de biofiltración de lecho escurrido, con una concentración entre 2,000-10,000 ppm de H₂S a la entrada, obtuvieron un 99% de remoción. La biopelícula y el material de empaque son la parte medular de la biofiltración porque son los principales factores responsables de regular fenómenos complejos como el crecimiento y la actividad microbiana, la transferencia de masa, la absorción y la adsorción (Rajamanickam *et al.*, 2017).

Además de las características fisicoquímicas (alta porosidad, alta superficie específica, alta resistencia mecánica y capacidad de retención de humedad), el material de empaque debe tener una alta capacidad de amortiguación (para evitar la fluctuación del pH) además de abundantes nutrientes (Singh *et al.*, 2017).

Los BLE pueden estar empacados con una variedad de materiales adsorbentes previamente inoculados con consorcios microbianos sulfato oxidantes (carbón vegetal, compost, cerámica, lava, césped y materiales sintéticos), son una alternativa viable para remover concentraciones de hasta 20,000 ppm de sulfuro de hidrógeno en la corriente de biogás (Pokorna *et al.*, 2015). El uso de nuevos materiales de empaque como los desechos de concreto es un enfoque ingenioso y económico para reducir las irregularidades asociadas con el ajuste del pH y la acumulación de sulfuro, lo que aumenta la confiabilidad de la eliminación de H₂S (Vikrant *et al.*, 2018). La Tabla 5 enumera los diferentes materiales de empaque utilizados en BLE y las tasas de eliminación de H₂S asociadas.

Tabla 5. Principales materiales de empaque utilizados en los biofiltros .

Material de empaque	Escala	Carga másica de H ₂ S	Tasa de eliminación de H ₂ S (%)	TRH _(s)	Referencia
Mezcla de fragmentos de madera, turba, bloques y conchas marinas.	Gran escala	1.876 - 34.705 mg/m ³	99.92	13-16.2	Zhang <i>et al.</i> (2013)
Espuma de poliuretano (OPUF, siglas en inglés)	Escala piloto	4100- 7900	95	176-600	Almenglo <i>et al.</i> , (2016)
Roca metamórfica expandida	Laboratorio	7-35 g m ⁻³ h ⁻¹	97	30	Shareefdeen (2015)
Roca metamórfica expandida		100 ppm	47- 100	13-63	Ben Jaber <i>et al.</i> (2016a)
Roca metamórfica expandida y material nutricional sintético (UP20)		40-360 ppm	95	63	Ben Jaber <i>et al.</i> (2016b)
Polietileno resistente a los ácidos (Industrias Holman)		7.8 g m ⁻³ h ⁻¹ / 16.2 g m ⁻³ h ⁻¹	96-99	62	Rabbani <i>et al.</i> (2016)
Composta de estiércol		50–250 mg m ⁻³	95	11.3	Hou <i>et al.</i> (2016)
Hojuelas de madera		10000 ppm	97	289	Aita <i>et al.</i> (2015)
Semillas de fruta		200 ppm	97.15	-	Lestari <i>et al.</i> , (2016)
Cerámica porosa		2200 ppm	96	6-18	Lee <i>et al.</i> , (2006)
Roca metamórfica expandida		1100 ppm	100	300	Jaber <i>et al.</i> (2017)
CM-5*		49.5-80 g m ⁻³ h ⁻¹	100	29-121	Zhu <i>et al.</i> (2017)
Residuo de concreto		300 ppm	100	240	Jaber <i>et al.</i> (2017)
Medio sintético (BIOSORBENS™)		40 ppm	99	30	Shareefdeen <i>et al.</i> , (2003)
Estiércol de cerdo y aserrín		0.03 - 0.32 g m ⁻³	83- 97	22	Barona <i>et al.</i> , (2004)
Carbón activado granular		100–4000 ppm	98	-	Rattanapan <i>et al.</i> , (2009)
Biomedio, encapsulado por alginato de sodio y alcohol polivinílico (PVA)		6 g m ⁻³ h ⁻¹	99	31-52	Kim <i>et al.</i> , (2008)
Fibra de coco	184-644 ppm	100	49	Filho <i>et al.</i> , (2010)	

* CM-5(Medio compuesto-5,): mezcla de cemento, compost maduro, carbonato de calcio, medios inorgánicos, perlita porosa y fibra vegetal.

2.7. Zeolita como material de soporte para la formación de biopelícula

La zeolita se caracteriza por ser ideal para el intercambio iónico y la adsorción de gases como H_2S , debido a su alto grado de porosidad y gran área superficial. Hay alrededor de 194 estructuras de zeolita y más de 40 tipos de zeolitas naturales. La Figura 8 muestra la unidad estructural principal de la zeolita. Se puede ver que la zeolita está formada por tetraedros de silicio-oxígeno y aluminio-oxígeno que están conectados en la sección central por átomos de oxígeno. Este ordenamiento molecular da como resultado un sistema de canales de poros, con intercambio catiónico distribuido en los espacios de la estructura, que le confieren a la estructura una carga neutra (Nozue *et al.*, 2012; Ozekmekci *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019).

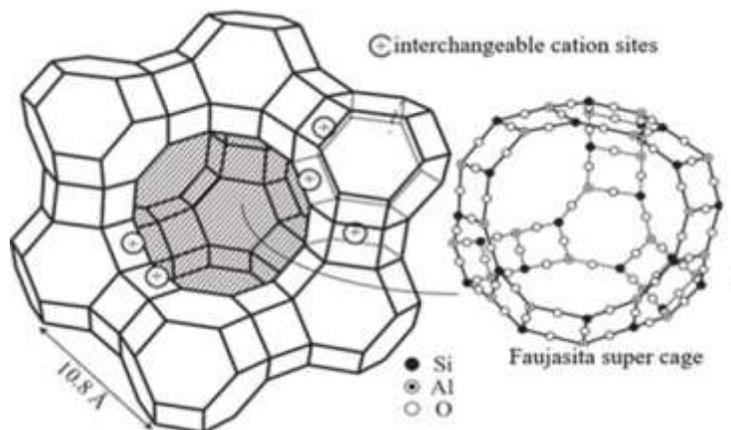


Figura 8. Esquematación de los sitios catiónicos típicos de la zeolita. Adaptado de Nozue *et al.*, (2012).

Actualmente existe una demanda creciente de zeolitas naturales para la separación de gases (Mordenita, Clinoptilolita, Erionita, Phillipasita y Ferrierita). Diversos estudios han utilizado experimentalmente diferentes tipos de estructuras de zeolita naturales y modificadas para eliminar H_2S (Ozekmekci *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2019). Por ejemplo la clinoptilolita, es la zeolita natural más abundante, esto hace que su alcance y costo sea accesible; se ha utilizado como adsorbente para la remoción de H_2S ; Ozekmekci *et al.*, (2015) reportan una investigación en donde se utilizó la clinoptilolita en un sistema de lecho fijo a diferentes temperaturas



(100°C y 600°C). Se encontró que la capacidad de la zeolita natural era 0.03g S/g de zeolita natural.

Los minerales arcillosos como las zeolitas y otros materiales tensoactivos influyen en el crecimiento microbiano así como en la transformación enzimática de una variedad de sustancias incluidos amonio, azufre, carbohidratos, materiales proteícos y compuestos fenólicos. De acuerdo con resultados previos, se ha encontrado que la zeolita funciona exitosamente como soporte microbiano en la DA debido a las siguientes características: 1) alta capacidad de inmovilización de microorganismos; 2) capacidad de equilibrio iónico; 3) la capacidad de oxidoreducción de compuestos en solución. En los BLE, el uso de materiales de empaque con cribados pequeños y porosidad alta, permite que los BLE retengan altas concentraciones de biomasa. La ventaja de usar medios como la zeolita para retener biomasa dentro de los reactores es la alta tasa de remoción de contaminantes (Montalvo *et al.*, 2012). La capacidad de acumulación de una gran cantidad de biomasa en el interior y sobre la superficie externa de la zeolita está estrechamente relacionada con la rugosidad y porosidad de este material (Arif *et al.*, 2018)

Montalvo *et al.*, (2012) encontraron que en diferentes configuraciones de reactores y con distintos sustratos, las zeolitas naturales proporcionan una alta capacidad para la inmovilización microbiana.

Milán *et al.*, (2010) estudiaron en reactores discontinuos las comunidades microbianas inmovilizadas en zeolita con composta de cerdo; encontraron una rica diversidad de microorganismos metanogénicos del orden *Methanococcaceae*, *Methanosarcina* y *Methanosaeta*.

Poirier *et al.*, (2017) evaluaron durante el proceso de DA la influencia específica de diferentes materiales de soporte (zeolitas (10 g / L), carbono activado (10 g / L) y quitosano (1 g / L) en la composición del microbioma bajo altas concentraciones de amoníaco. La fase logarítmica de metanogénesis se vio reducida en un 42%, 22% y 32% en presencia de zeolita, carbón activado y quitosano, respectivamente.



La zeolita y el carbono activado fueron capaces de superar por completo la inhibición causada por 19 g/L de amoníaco a través de la preservación del microbioma. Este estudio sugiere que los materiales de empaque podrían mejorar la estabilidad del proceso de la DA bajo una alta toxicidad de amonio o amoníaco a través del aumento biológico mediante la retención de sustancias tóxicas que pudiesen inhibir el metabolismo microbiano.

Paolini et al., (2015) demostraron un manera rentable para obtener biometano altamente puro ($\text{CO}_2 < 2 \text{ g / m}^3$; $\text{H}_2\text{S} < 1.5 \text{ mg / m}^3$) a partir de biogás, a través de la adsorción selectiva de CO_2 y H_2S mediante zeolitas naturales (generalmente compuestas de chabacita, phillipsita y clinoptilolita) del residuo de toba al vacío y la adsorción por oscilación de presión. La capacidad de adsorción de la zeolita de toba fue de 45 g / kg y 40 mg / kg, para CO_2 y H_2S , respectivamente. Otro beneficio de este material de empaque es la regeneración del adsorbente después de la saturación a baja presión y puede reutilizarse en un ciclo de adsorción posterior, sin variaciones significativas en la eficiencia, incluso en presencia de amoníaco, humedad, y otros compuestos traza del biogás.

Desde el punto de vista de la aplicación de la biotecnología ambiental para la remoción de H_2S en la corriente de biogás, en este trabajo se presenta la evaluación de un prototipo de biofiltro de lecho escurrido instalado en el establo “los Arados”, utilizando una zeolita natural, TRA, endémica de la ciudad de Aldama Chihuahua, como material de empaque del BLE para el crecimiento de consorcios microbianos con capacidad sulfato oxidante.



2.8. Estudio molecular de microbiomas presentes en materiales arcillosos: extracción de ADN metagenómico.

Los análisis moleculares se han convertido en el estándar para el estudio de la ecología microbiana. Los protocolos actuales de extracción de ADN para análisis moleculares están poco adaptados para comunidades microbianas adheridas a superficies líticas o arcillosas, debido a la naturaleza que presentan estas matrices, generalmente matrices mineralizadas o “duras” (Wade *et al.*, 2003).

Las interacciones entre microorganismos y minerales arcillosos son ubicuas en la naturaleza. Estas interacciones desempeñan papeles fundamentales en la biosfera y la geosfera. Estas relaciones están involucradas en los ciclos biogeoquímicos, ya que los minerales arcillosos proporcionan nutrientes y hábitats para los microorganismos y juegan un papel importante; ya sea en la inhibición o promoción del crecimiento de microorganismos. Se ha sugerido que los microorganismos se adhieren a la superficie de los minerales mediante interacciones electrostáticas (Figura 9) e inducen la formación de biopelículas, nucleación, cristalización, biomineralización, descomposición, meteorización y alteración (Li, G. *et al.*, 2019).

Cuando los microorganismos formadores de biopelícula se cultivan durante un largo período de tiempo sobre superficies arcillosas, se sabe que producen cantidades significativas de polisacáridos capsulares, capaces de unir metales fuertemente debido a la desprotonación de los ligandos orgánicos anfóteros, contenidos en los polímeros de la pared celular de las bacterias, la superficie bacteriana se carga negativamente en un amplio rango de pH. Estos ligandos se unen a cationes metálicos y actúan como un sitio de nucleación (Pokrovsky *et al.*, 2008). Como se puede observar en la Figura 9, los cationes como Na^+ , K^+ , Fe^{+3} , Al^{+3} y Si^{+4} actúan como puentes catiónicos entre el material arcilloso y los productos microbianos, tales como polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Otra manera en la que se puede llevar a cabo las interacciones electrostática, es mediante la transferencia de electrones a través del “pilus” bacteriano (Li, G. *et al.*, 2019).

En base a lo anterior, el proceso general de extracción de ADN es técnicamente desafiante, lo que requiere el uso de pasos de lisis agresivos. Las extracciones con agentes agresivos, ya sean físicos (sonicación, calentamiento 65-90°C, resina de intercambio iónico, choque térmico) o químicos (ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA), etanol, formaldehído combinado con calentamiento o hidróxido de sodio); aumentan el rendimiento del ADN pero a costa de su integridad, lo que resulta en fragmentos de ADN más pequeños que podrían ser menos adecuados para análisis posteriores. Cabe mencionar que es crucial el pretratamiento de muestras ambientales; esto se basa en la idea de que el lavado debe promover la eliminación de cationes covalentes, así como compuestos orgánicos que se disuelven fácilmente y que promueven la dispersión y homogeneidad de la muestra, además de disminuir la posible adsorción de ADN por los componentes de los EPS (D'Abzac *et al.*, 2010; Govil *et al.*, 2019).

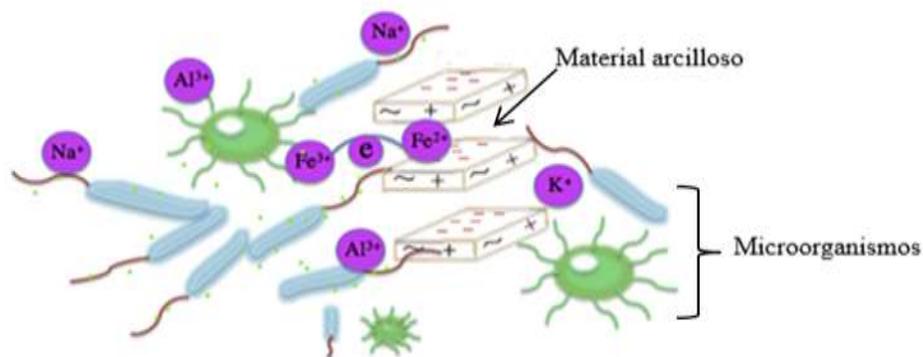


Figura 9. Interacciones electrostáticas entre los microorganismos y el material arcilloso formado por diversos cationes; Na⁺, K⁺, Al³⁺ y Fe³⁺ (Imagen modificada de Li, G. *et al.*, (2019).



La extracción exitosa y eficiente de ADN genómico, de alta calidad y alto peso molecular de muestras ambientales, es un paso primario esencial para comprender la genética, el metabolismo y características evolutivas de las comunidades microbianas. Al trabajar con muestras de biopelículas, los dos factores importantes que dificultan la extracción de ADN son: 1) la unión del ADN a la matriz y 2) la presencia de diversidad microbiana en una comunidad de biopelículas con diferentes tipos de paredes y membranas celulares (Govil *et al.*, 2019).

Se ha encontrado que aún con el uso de novedosos kits comerciales y técnicas de extracción de ADN; alrededor del 75% de las células microbianas permanecen intactas en el residuo de la extracción de ADN, lo que lleva a pensar que grandes fracciones de muchas comunidades microbianas se han perdido en estudios ecológicos moleculares anteriores (Morono *et al.*, 2014).

Considerando los factores que dificultan la extracción de ADN en muestras ambientales, en esta investigación se propone un nuevo protocolo de extracción llevando a cabo el pretratamiento de la muestra basado en los protocolos de Morono *et al.*, 2014 quienes a través de tratamientos térmicos y alcalinos, establecieron un aumento del rendimiento de lisis celular (alrededor del 80%), un rendimiento de extracción de ADN 52 veces mayor que los métodos convencionales basados en kits comerciales, así como mayor cantidad y diversidad molecular de genes pertenecientes al dominio *Archea*.



3. Justificación

La DA de excretas de ganado ofrece beneficios potenciales tanto para la industria como para el medio ambiente, puede reducir el 11% de las emisiones globales de efecto invernadero producido por la actividad ganadera. Según el FIRCO, hace diez años el establo lechero “Los Arados”, ubicado en la ciudad de Delicias, Chihuahua; cuenta con un biodigestor que tiene la capacidad de procesar 6156 Ton/año de excreta para la producción de 203148 m³/año de biogás, este biogás genera alrededor de 485899 kWh/año de energía eléctrica. Sin embargo la concentración de H₂S (~10000 ppm) contenido en la corriente de biogás, imposibilita el uso de este combustible como fuente de energía renovable, ya que H₂S, por ser un gas tóxico y corrosivo ,representa un riesgo para la salud y una problemática económica para los lugares en donde se genera. A pesar del desarrollo de nuevas tecnologías basadas en procesos físico-químicos para la remoción de H₂S, éstas representan desventajas económicas y para el medio ambiente. Actualmente cada vez es de mayor interés, la implementación de tecnologías fundamentadas en sistemas biológicos, que hacen uso de consorcios microbianos específicos para degradar diversos contaminantes en compuestos no tóxicos o menos tóxicos.

La implementación de la biotecnología ambiental, mediante el aprovechamiento del metabolismo de consorcios microbianos sulfato reductor y sulfato oxidante, aplicado a BLE para remover H₂S en la corriente de biogás, representa ventajas por su fácil diseño, además de ser una tecnología amigable con el medio ambiente. Esto resulta atractivo para sitios en donde se produce biogás, como es el caso del establo “Los Arados”, donde se encuentra un biodigestor anaerobio el cual produce elevadas concentraciones de H₂S. De esta manera, se estaría reduciendo la concentración de H₂S en la corriente de biogás, generando así un recurso combustible renovable de calidad para su uso.



4. Hipótesis

Es posible obtener una alta eficiencia, en la remoción de H_2S en la corriente de biogás, a través de un sistema prototipo de Biofiltro de Lecho Ecurrido empacado con TRA e inoculado con un consorcio bacteriano con capacidad sulfato reductora- sulfato oxidante.

5. Objetivo general

Cuantificar la remoción biológica de H_2S en un prototipo de BLE, instalado en el establo "los Arados", empacado con TRA e inoculado con un consorcio bacteriano con capacidad sulfato reductora-sulfato oxidante.

5.1. Objetivos específicos

1. Caracterizar la TRA mediante técnicas físico-químicas y microscopía electrónica de barrido, antes y después del bioproceso.
2. Cultivar a partir de un consorcio microbiano sulfato reductor-oxidante, una biopelícula estable con capacidad sulfato oxidante sobre la TRA.
3. Monitorear y evaluar las entradas y salidas de biogás en un prototipo de BLE instalado en el establo "Los Arados".
4. Describir el metabolismo del consorcio microbiano en el prototipo de BLE.
5. Demostrar mediante microscopía electrónica de barrido, la capacidad de la TRA como material de soporte para el desarrollo de comunidades microbianas; así como proponer un protocolo de extracción de ADN genómico para el estudio molecular de dichas comunidades microbianas.



6. Materiales, reactivos y equipos.

6.1. Materiales

- ❖ Charolas de aluminio
- ❖ Botes de PVC con tapa con capacidad de 10L
- ❖ Baño de hielo
- ❖ Baño maría
- ❖ Barras agitadoras magnéticas cubiertas de teflón
- ❖ broches de acero inoxidable para baúl
- ❖ Cinta testigo
- ❖ Codos de PVC de ½ pulgada
- ❖ Codos de PVC de ¾ pulgada
- ❖ Conectores rosca exterior ¾ pulgada
- ❖ Desecador
- ❖ Espátula
- ❖ Guantes de asbesto
- ❖ Guantes de nitrilo
- ❖ Matraz Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL (PYREX, Nueva York, EUA)
- ❖ Matraces aforados 50 y 100mL (PYREX, Nueva York, EUA)
- ❖ Tubería PVC ¾ pulgada
- ❖ Tubería PVC de ½ pulgada
- ❖ Micropipetas de volumen ajustable 100-1000 µL; 1-10 µL (Eppendorf, Sao Paulo, Brasil)
- ❖ Mortero con pistilo de porcelana
- ❖ Niples de PVC de ½ pulgada
- ❖ Niples de PVC de 3 por ½ pulgada
- ❖ Papel filtro 0.45µm de poro
- ❖ Pegamento industrial
- ❖ Pintura blanca
- ❖ Pinzas de disección
- ❖ Pipetas volumétricas de 1mL y 10mL (Pyrex)
- ❖ Probeta graduada de 50mL



- ❖ Puntillas de plástico para micropipetas de 100-1000 μ L (Sorenson BioScience, Utah, Estados Unidos)
- ❖ Sellador industrial
- ❖ Tamiz malla #100
- ❖ tapones rosca para exterior $\frac{3}{4}$ pulgada
- ❖ Termómetro
- ❖ Tubos eppendorf de 1.5mL
- ❖ Tubos Falcon de 50mL (Corning, Nueva York, Estados Unidos)

6.2. **Reactivos**

- ❖ Acetato de potasio (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Agarosa (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ Agua destilada (FCQ-UACH, Chihuahua, México)
- ❖ Agua inyectable (PiSA, Jalisco, México)
- ❖ Agua tri destilada (FCQ-UACH, Chihuahua, México)
- ❖ Alcohol etílico absoluto (Proband, Estado de México, México)
- ❖ Ascorbato de sodio
- ❖ Cloruro de calcio (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Cloruro de sodio (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Dodecil sulfato sódico (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético) (Bio Basic, Ontario, Canadá)
- ❖ Extracto de carne (MCD LAB, México)
- ❖ Fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1) (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ Glicerol
- ❖ Glutaraldehído (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ Lactato de sodio al 60 % (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Lisozima (Boheringer Mannheim GmbH, Alemania)
- ❖ Marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III (invitrogen)
- ❖ Naranja G (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)



- ❖ Peptona de caseína (MCD LAB, México)
- ❖ Syber (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- ❖ Sulfato de hierro amoniacal (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Sulfato de Magnesio heptahidratado (J.T. Baker, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ TAE 1X

6.3. **Equipos**

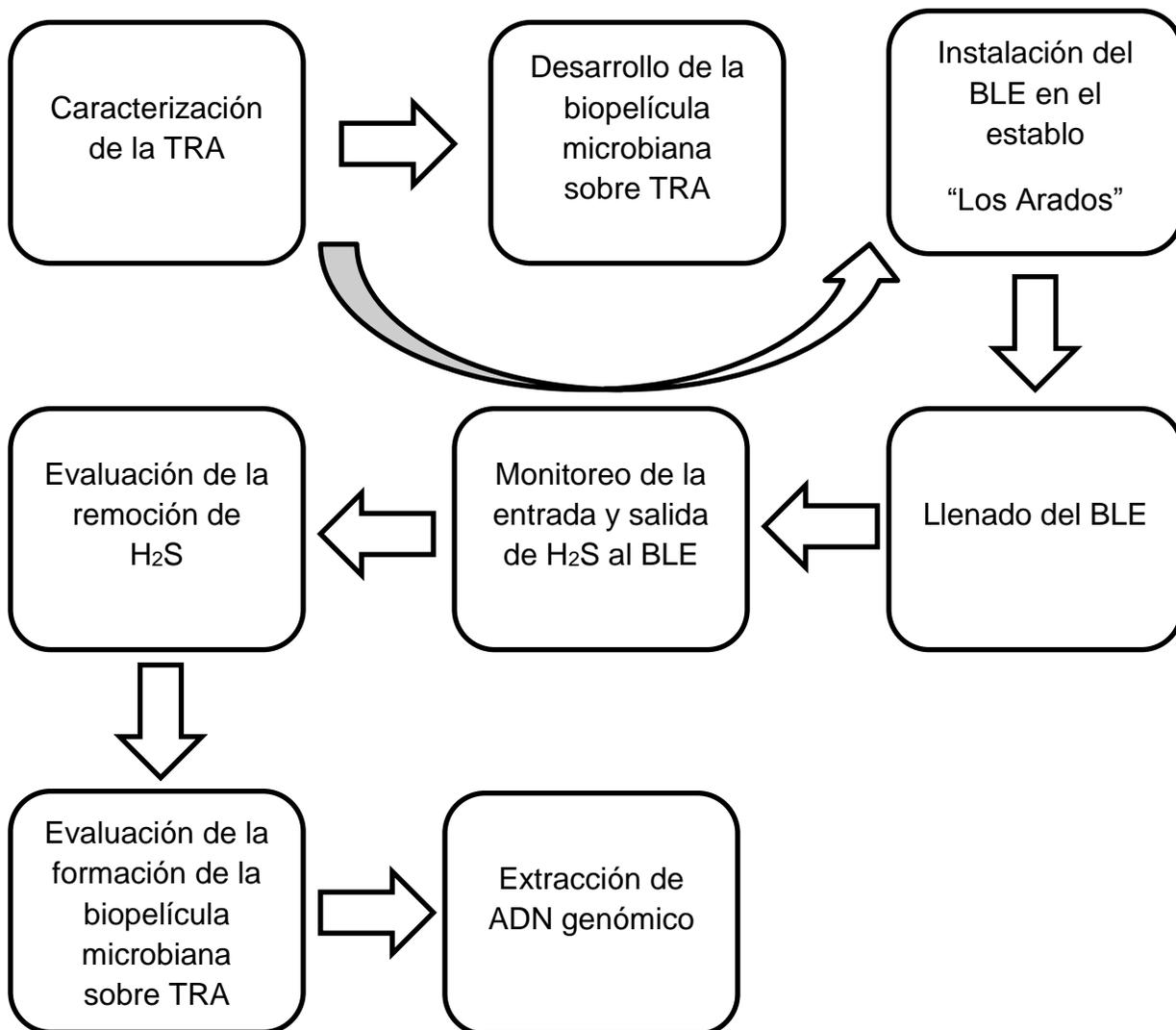
- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza analítica (OHAUS, modelo E01140, New Jersey, Estados Unidos)
- ❖ BET (Brunauer, Emmett y Teller) (Quantachrome Corporation, Autosorb for Windows® Version 1.16)
- ❖ Bomba de vacío
- ❖ Cámara de electroforesis (Lab Net)
- ❖ Centrifuga refrigerada (Thermo Fisher Scientific, Sorvoll ST 16R)
- ❖ Computadora Lenovo
- ❖ Congelador -20°C (Thermo Fischer Scientific, modelo Isotemp-20,
- ❖ Difracción de rayos X (X'Pert PRO MPDX' Celerator)
- ❖ Equipo de cómputo (ALASKA, modelo P4, Alaska, Estados Unidos)
- ❖ Fotodocumentador (KODAK, modelo gel Logic 200 imaging system, Nueva York, Estados Unidos)
- ❖ Fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad, modelo PowerPac 300, California, Estados Unidos)
- ❖ Incubadora (Fisher Scientific)
- ❖ Incubadora Estufa (Felisa, Jalisco, México)
- ❖ Microcentrífuga Centrifuge (Eppendorf, modelo 5415C, Sao Paulo, Brasil)
- ❖ Microondas hot point
- ❖ Microscopio electrónico de barrido con espectrómetro de energía dispersiva (JEOL JSM-7401F)
- ❖ Parrilla de calentamiento con agitación (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)



- ❖ Potenciómetro (HANNA instruments, modelo HI 2211 pH/ORP Meter, Estado de México, México)
- ❖ Refrigerador 4°C (VWR Scientific products, Pensilvania, Estados Unidos)
- ❖ Landtec biogás 5000®
- ❖ Ultra congelador vertical -80°C (Revco Thermo Scientific™ ULT2330V)
- ❖ Vórtex Mixer (Labnet, modelo VX-200, New Jersey, Estados Unidos)
- ❖ Detector electrónico de gases: CO₂ (%), CH₄ (%), H₂S (ppm) y O₂ (%) (CIMAV; Chihuahua, Chih.)

7. Métodos

7.1. Desarrollo general de la investigación





7.2. Caracterización de la TRA

Se recolectaron ~100 kg de TRA de ½ pulg de cribado, provenientes de la veta minera ubicada en la Cd. Aldama, Chihuahua (28°48' 36" N, 105° 54' 3.0" O); para su caracterización, se tomaron aleatoriamente diversas rocas de TRA (~30 g) tratando de abarcar toda el área del volumen de TRA recolectado de la veta minera.

A las rocas colectadas, se les realizaron lavados con agua destilada repetidas veces hasta observar un residuo de lavado incoloro, posteriormente se realizaron múltiples lavados con agua tridestilada para eliminar cualquier impureza que pudiera quedar.

Para eliminar el agua retenida por la TRA, se procedió a dejarla secar a temperatura ambiente durante 24 horas, transcurrido el tiempo, la TRA fue sometida a 250°C durante 3 h en una estufa (FELISA ®) para su activación (López *et al.*, 2018). Las rocas se dejaron enfriar al vacío en un desecador. Finalizado el tiempo de enfriamiento se procedió a triturar la TRA con un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino malla 100; otra parte de la TRA no fue triturada, esta se almacenó en un desecador. Mediante el método reportado por Jaber *et al.*, (2017) se determinó la densidad y la capacidad de retención de agua de la TRA; este consistió en sumergir una roca de TRA (6-8 g) en una probeta graduada (50 mL) con agua destilada durante 1 h, dejando escurrir la roca por 24 h; con el volumen arrojado por la roca y por diferencia de peso se calculó la densidad y la capacidad de retención de agua.

Las muestras trituradas se almacenaron de inmediato en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente llevados a peso constante; las muestras fueron trasladadas a las instalaciones del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) Chihuahua, Chih., para realizarles los análisis de superficie y composición semi cuantitativa mediante la Microscopía Electrónica de Barrido-Energía de dispersión de rayos X (SEM-EDS); composición química mediante difracción de rayos X (DRX); así como la determinación de las propiedades texturales de la TRA mediante el análisis BET.



7.3. Desarrollo de la biopelícula microbiana sobre TRA

Para la obtención de una mayor cantidad de biomasa y la posterior formación de biopelícula sobre la TRA, se llevaron a cabo cultivos sucesivos; partiendo de un consorcio microbiano sulfatoreductor y sulfatooxidante, el cual se encontraba congelado (-20°C) en un tubo de eppendorf (Epitacio, 2017). Siguiendo las bases metodológicas reportadas por Domínguez, 2017; se llevó a cabo la proliferación del consorcio microbiano así como el desarrollo de la biopelícula sobre TRA, haciendo uso de un medio de cultivo sulfato reductor (Burlage *et al.*, 1998).

El medio de cultivo sulfato reductor (125 mL) (**Anexo I**) fue inoculado con 25 μ L del consorcio microbiano y se incubó por 3 días / 29-30°C en matraces Erlenmeyer de 250mL. Se procedió a hacer una reincubación en medio de cultivo nuevo, donde se tomaron 250 μ L de la siembra No.1, a la siembra No.2 con 1000 mL de medio de cultivo sulfato reductor estéril y se dejó incubar por 3 días nuevamente a 29-30°C. Este proceso se repitió 5 veces más por triplicado.

Los ~100kg de TRA activada, descrita en la sección 7.3, fueron vertidos en 10 botes de PVC estériles con capacidad de 10L (~10 Kg en cada bote); a cada uno se le añadieron ~ 8L de medio de cultivo sulfato reductor y 16.6 mL de inóculo, teniendo en cuenta el cálculo realizado por Dominguez, (2017); por cada 500 mL de medio de cultivo se añadieron 1000 μ L de inóculo.

La incubación en el laboratorio hasta las condiciones ambientales de estos medios de cultivo, se llevó a cabo durante 3 meses. Durante este periodo de tiempo se monitoreo de manera cualitativa el metabolismo bacteriano, es decir la presencia de gas y cambio de color del medio de cultivo; así como los parámetros de pH y temperatura.



7.4. Construcción e Instalación del BLE en el establo “los Arados”

Se construyó un prototipo de BLE, basándose en la geometría del prototipo de BLE reportado por Domínguez 2017; a partir de un cilindro de PVC de 120 cm de altura y un diámetro de 35.5 cm y con un volumen aproximado de 118775.76 cm³. El sistema contó con un sistema de riego homogéneo de medio de cultivo así como un sistema de bombeo (bombas peristálticas) para la recirculación del medio de cultivo (5 L/min), mismo que era contenido en un recipiente de PVC con capacidad de 20L. A la columna de PVC, se le adicionaron dos puertos de entrada y salida de biogás de ½ pulg, ubicados en la parte inferior y superior del cilindro de PVC, respectivamente. Finalmente se insertaron dentro del cilindro de PVC 4 soportes de acero inoxidable, en donde la TRA pudiera ser soportada.

El BLE se instaló en el establo lechero “los Arados”, ubicado en la ciudad de Delicias, Chihuahua (28°11'24.5" N 105°28'12.4" O).

7.5. Llenado del BLE

Se recolectaron ~100 kg de TRA de ½ pulg de cribado, provenientes de la veta minera ubicada en la Cd. Aldama, Chihuahua (28° 48' 36" N, 105° 54' 3.0" O), para ser empacada sin activar en el BLE instalado en el establo “Los Arados”. Una vez empacado, se llenó con 10L del medio de cultivo inoculado, mismo que se utilizó para el desarrollo y evaluación de la formación de biopelícula sobre TRA (apartado

7.6. Reposición de medio de cultivo fresco y conservación de microbioma

Mensualmente por cada cultivo con TRA descrito en la sección 7.3, se realizó el cambio del medio de cultivo; este recambio consistió en conservar el 10 % del volumen total de los medios de cultivo inoculados y se descartó el restante siguiendo las normas de higiene y seguridad. Hecho esto, se agregó medio de cultivo sulfato reductor fresco y estéril (~8 L) a cada recipiente con el inóculo.

Se tomó por triplicado 0.5mL del medio de cultivo ya inoculado, para su conservación; se preparó una solución al 70% de glicerol grado molecular esterilizada en autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos, posteriormente en un criovial estéril se depositaron 0.5 mL de la solución de glicerol más 0.5 mL de



los medios inoculados de cada bote de PVC de 10L Las soluciones se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

7.7. Monitoreo de la entrada y salida de H_2S (ppm), $\%\text{CO}_2$ y $\%\text{O}_2$ al BLE

Mediante un sistema de detección electrónica con detectores infrarrojos y celdas electroquímicas e interlazados a una red inalámbrica de banda ancha; se monitorearon los porcentajes de CO_2 y O_2 así como las ppm de H_2S presentes en la corriente de biogás tanto a la entrada como a la salida del prototipo de BLE. Los datos fueron recolectados en la aplicación ThinkSpeak®.

7.8. Evaluación de entradas y salidas de H_2S (ppm), $\%\text{CO}_2$ y $\%\text{O}_2$ al BLE

Los datos recolectados de la aplicación ThinkSpeak®, fueron descargados y procesados en el programa de cálculo Microsoft Excel 2010 y el software GraphPad Prism 8.0.1. Se calcularon las entradas y salidas promedio de $\%\text{CO}_2$, $\%\text{O}_2$ y las ppm de H_2S durante el periodo Enero-Julio de 2019, así como el porcentaje de remoción de H_2S . Por cuestiones técnicas, el monitoreo y evaluación de la remoción de H_2S en la corriente de biogás, no pudo llevarse a cabo de manera continua.

7.9. Evaluación de la formación de la biopelícula microbiana sobre TRA

Finalizada la evaluación de la remoción de H_2S en el BLE, se tomaron muestras de TRA inoculada, por triplicado, abarcando los 4 niveles del biofiltro. Estas fueron tomadas con pinzas estériles de disección y se conservaron en tubos Falcon estériles de 50mL. Las muestras se conservaron a 4°C y se procesaron el mismo día. Basándose en las metodologías reportadas por Amaya *et al.*, (2015) y Kenjikida *et al.*, (1990) las rocas de TRA fueron procesadas para la subsecuente observación en el SEM; este proceso consistió en triturar las rocas con un mortero estéril hasta obtener fragmentos de $\sim 1-10$ mm, estos fueron sumergidos en tubos Falcon de 50 mL con una solución fijadora de glutaraldehído al 5% (5mL) (**Anexo II**) dejando reposar durante 24 h a 4°C . Posteriormente en una centrifuga refrigerada (4°C), las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante se descartó, la muestra se sometió a un tratamiento de deshidratación gradual, sumergiendo la TRA en etanol (5 mL) a diferentes



concentraciones: 30%, 40%, 50%, 70%, 90% y 100% (**Anexo II**); dejando reposar 5 minutos a 4°C por cada concentración de etanol; por cada tratamiento, se descartó el etanol para proseguir con las siguientes concentraciones. Finalmente la muestra se secó al vacío en un desecador. La muestra se conservó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

Para el análisis microscópico de las muestras pre tratadas y recubiertas con partículas de oro sobre una laminilla de cobre, se utilizó el Microscopio electrónico de barrido con espectrómetro de energía dispersiva JEOL JSM-7401F.

7.10. Extracción de ADN genómico directamente de la TRA

Finalizada la evaluación de la remoción de H₂S en el BLE, se tomaron muestras de TRA inoculada, por triplicado, abarcando los 4 niveles del biofiltro. Estas fueron tomadas con pinzas estériles de disección y se conservaron en tubos Falcon estériles de 50mL. Las muestras se conservaron a -20°C para luego ser procesadas. En base a los resultados reportados por Morono *et al.* (2014), se propuso una nueva metodología para la extracción de ADN genómico de la biopelícula formada sobre la TRA. En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 5 g de TRA fragmentada, a esta se le añadieron 10 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2M más EDTA 500 mM pH13; se dejó incubar en un baño maría a 80°C durante 15 minutos, agitando la mezcla ocasionalmente. Posteriormente la muestra fue llevada a -80°C durante 15 minutos, después fue colocada en un baño maría a 65°C durante 20 minutos, agitando ocasionalmente. Transcurrido el tiempo de incubación, con una micropipeta de 1000 µL se pasó la fase líquida a un tubo Falcon estéril de 50 mL, el residuo de TRA se descartó. La fase líquida fue centrifugada a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en un tubo Falcon estéril de 50 mL, se le agregaron 2 mL de SDS al 10%, la mezcla fue sometida a vórtex durante 1 minuto; se añadieron 100 µL de lisozima (10 mg/mL), la mezcla fue incubada a 65°C durante 30 minutos agitando ocasionalmente. Posteriormente se agregaron 2.5 mL de EDTA 100 mM pH 8 más 2 mL de acetato de potasio 5 M, esta mezcla se dejó reposando en hielo durante 20 minutos; se procedió a centrifugar a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se le añadió un volumen igual de etanol absoluto



frío, la muestra se refrigeró a -20°C durante 30 minutos; después se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se conservó la pastilla formada y se decantó la fase líquida, teniendo cuidado de no perder la pastilla; con etanol frío al 70% se lavó la pastilla (por duplicado), centrifugando a 10,000 rpm a 4°C durante 5 minutos entre cada lavado. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió con 50 μL de agua inyectable estéril, conservándose así a -20°C .

7.11. Extracción de ADN genómico, método fenol-cloroformo- alcohol isoamílico

Se llevó a cabo la proliferación de la biomasa presente en la TRA por duplicado, dejando incubar 5 g de TRA por separado en tubos Falcon de 50 mL con medio de cultivo sulfato reductor estéril (**Anexo I**) a 37°C durante 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se descartaron las rocas de TRA y se conservó el medio líquido en el tubo Falcon; las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos, se decantó el medio líquido y se conservó el pellet formado. Dicho pellet se disolvió en 1,000 μL de buffer de lisis (200 mM de NaCl y 0.5% de SDS), se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando suave y ocasionalmente, después se agregaron 500 μL de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo, después se centrifugó durante 5 minutos a 10,000 rpm, cuidadosamente se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, evitando tocar la interfase. Se adicionaron 400 μL de etanol absoluto frío y se mezcló invirtiendo el tubo, para subsecuentemente centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos y decantar el etanol. Se lavó la pastilla con 1,000 μL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 10,000 rpm por 3 minutos, posteriormente se decantó el etanol al 70% y se dejó secar la pastilla para luego ser resuspendida con 30 μL de agua de ampolleta y conservar el tubo con ADN genómico a -20°C hasta su próximo uso.



7.12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%

Se pesaron 0.8 g de agarosa y se disolvieron con 100 mL de amortiguador TAE 1X en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, la solución se calentó en el microondas hasta clarificar, una vez atemperada se le añadieron 4 μ L de Syber® concentrado; se procedió a vaciar la agarosa en el portagel, se colocó el peine guía para pocillos dejándose reposar a temperatura ambiente hasta gelificar. La cámara de electroforesis se llenó con un amortiguador TAE 1X hasta la marca indicada. El gel de agarosa se colocó dentro la cámara de electroforesis; uno de los pocillos del gel fue cargado con la mezcla de 5 μ L de muestra más 5 μ L de buffer de carga (Naranja G), de igual manera se realizó para el control positivo. El gel se corrió a 70 volts durante 60 min y finalmente se visualizó en el fotodocumentador.

8. Resultados y discusión

8.1. Caracterización de la TRA

Se recolectaron ~100 kg de TRA de ½ pulg de cribado (Figura 10); para su caracterización, se tomaron aleatoriamente diversas rocas de TRA (~30 g) tratando de abarcar toda el área del volumen de TRA recolectada.



Figura 10. Recolección de la TRA; proveniente de la veta minera ubicada en la Cd. Aldama, Chihuahua (28° 48' 36" N, 105° 54' 3.0" O).

8.1.1. Propiedades texturales de la TRA: análisis BET

En la Tabla 6 se muestran los siguientes valores correspondientes a las propiedades texturales de la TRA; obtenidos mediante isotermas de adsorción, utilizando el nitrógeno como adsorbato a 77 K.

Tabla 6. Análisis BET: propiedades texturales de TRA.

Propiedades texturales de la TRA	
Área superficial	28.98 m ² /g
Tamaño de poro	148.7 Å
Volumen de poro	0.1077 cc/g

Los valores del área superficial, tamaño de poro así como el volumen de poro de la TRA, son similares a las propiedades texturales de clinoptilolitas naturales reportadas por algunos autores (Tabla 7).

Tabla 7. Propiedades texturales de algunas zeolitas naturales.

Autor	Área superficial (m²/g)	Tamaño de poro (Å)	Volumen de poro (cc/g)
Contreras, 2017	29.4	162.8	0.11
Favvas <i>et al.</i> , 2016	28	150	-
Montes-Luna <i>et al.</i> , 2015	27.0	274.3	0.191

En base a las isothermas de adsorción con nitrógeno en condiciones de temperatura y presión estándar (STP); como se muestra en la Figura 11, la TRA presenta un comportamiento similar a las isothermas reportadas por Díaz-Nava *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Montes-Luna *et al.*, 2015; Favvas *et al.*, 2016; Contreras, 2017; de zeolitas naturales de diversos yacimientos en México (Tabla 8).

Tabla 8. Yacimientos de zeolita en México (Datos tomados de Hernández *et al.*, 2005; Contreras, 2017).

Población, estado	Fases cristalinas presentes
La Magdalena, Oaxaca	Mordenita/ Caolinita
Cruillas, Tamaulipas	Mordenita
Agua prieta, Sonora	Erionita/ Mordenita
Tepetitlán, Puebla	Clinoptilolita/Cuarzo
Mina San Francisco, Guanajuato	Clinoptilolita/Cuarzo

Díaz-Nava *et al.*, 2005 reportan que para el caso de las zeolitas, éstas presentan un comportamiento de sólido microporoso (<2 nm) con una curva de adsorción tipo I.

No obstante el comportamiento de la isoterma de adsorción de la TRA (Figura 11), así como de la zeolitas naturales reportadas por Hernández *et al.*, 2005; Montes-Luna *et al.*, 2015; Favvas *et al.*, 2016; Contreras, 2017; se desvían de este comportamiento presentando curvas de adsorción de tipo II, esto se debe a que las muestras de origen natural presentan impurezas, con la formación de poros entre partículas de mayor tamaño. De acuerdo con la clasificación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), una curva de adsorción tipo II es característica de sólidos mesoporosos (2-50 nm) monocapa a bajas presiones así como materiales mesoporosos multicapa a altas presiones cerca de la saturación sin histéresis (Al-Ghouti *et al.*, 2020). No obstante, de acuerdo a la clasificación de la IUPAC, la TRA y las zeolitas naturales reportadas por Favvas *et al.*, 2016 y Contreras, 2017; presentan curvas de adsorción con histéresis H3.

Para el caso de la TRA el fenómeno de histéresis se puede observar en el rango de 0.5 – 1.0 P/Po que aparece la curva de adsorción de la Figura 9. Este fenómeno es característico de rocas ígneas compuestas por clinoptilolita, y puede atribuirse a la adsorción multicapa y a la condensación capilar en mesoporos con impurezas (feldespatos, cuarzo, etc.) (Favvas *et al.*, 2016).

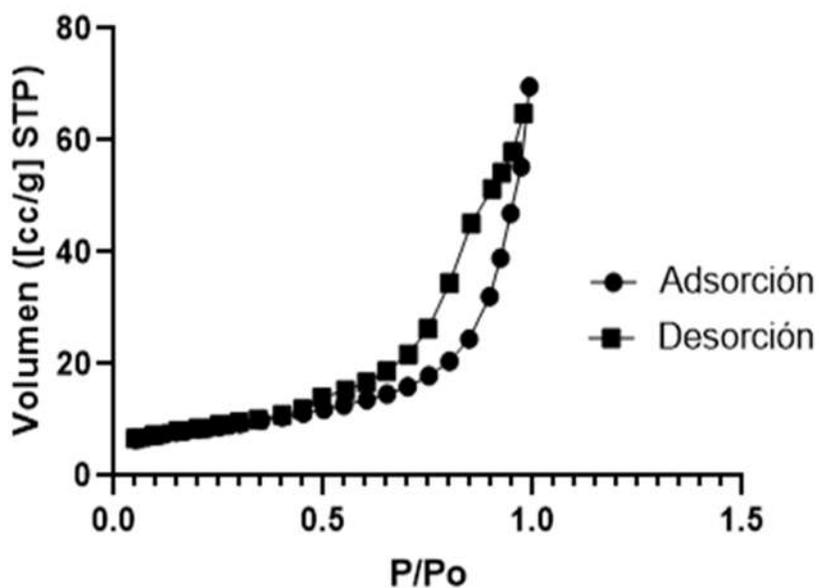


Figura 11. Isoterma de adsorción-desorción de la TRA con nitrógeno a 77 K.

8.1.2. Análisis de superficie y composición semicuantitativa de la TRA

En las Figuras 12 y 13, se muestran las micrografías de la microscopía electrónica de barrido que se le realizó a la TRA. Teniendo en cuenta que cada micrografía fue tomada a partir de diferente área de la muestra para garantizar una observación homogénea, en estas figuras se puede observar que la superficie de área de la TRA es altamente cristalina, con configuraciones en forma de escama, esto se debe a la cantidad de impurezas que contiene, por su origen mineral. Este resultado es equiparable a las micrografías obtenidas por Hernández *et al.*, 2010; Favvas *et al.*, 2016 y Ates, 2018; quienes reportan que este tipo de configuraciones son consistentes en zeolitas compuestas por clinoptilolita.

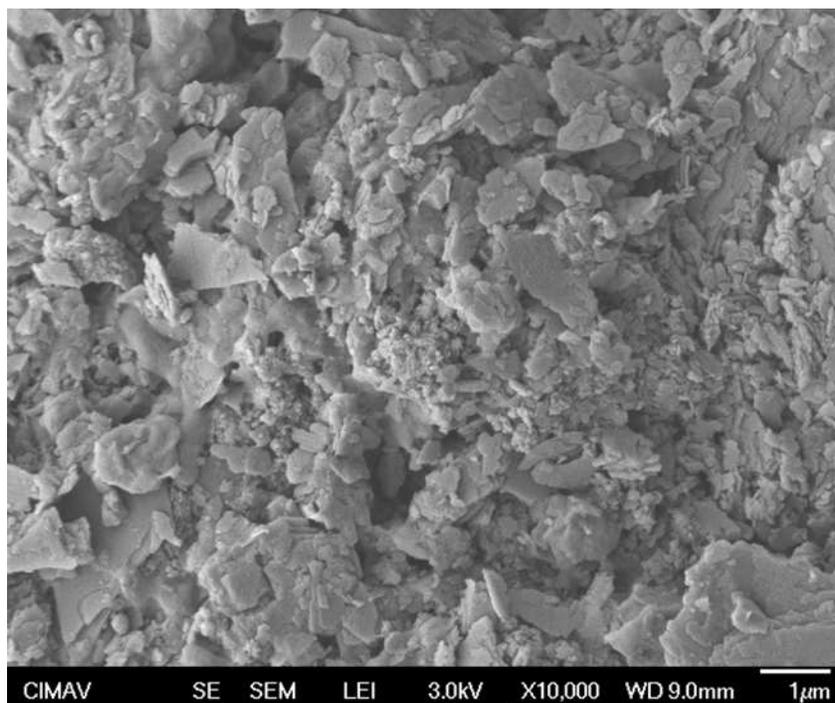


Figura 12. Micrografía de la TRA vista a 10,000X.

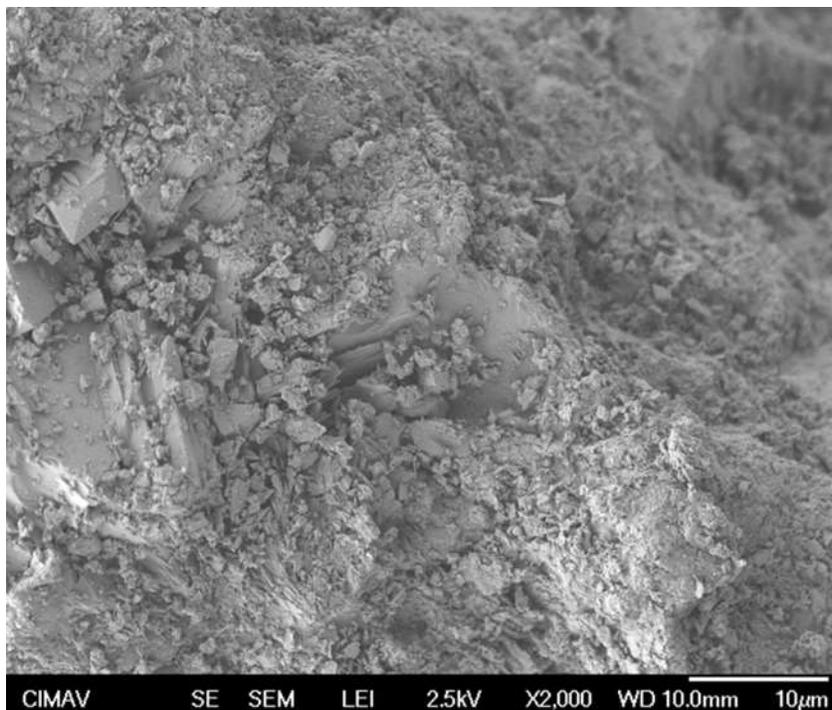


Figura 13. Micrografía de la TRA vista a 2,000X.

8.1.3. Microscopía de dispersión de energía (EDS)

Mediante el análisis EDS, se obtuvo la composición elemental (%) de los elementos presentes en la TRA. En la Figura 14 se muestran la proporción de los elementos presentes en la TRA, en donde el oxígeno, silicio, aluminio y carbono se encuentran en mayor proporción. Estos resultados no fueron los mismos a los reportados por Díaz-Nava *et al.*, 2005, quienes trabajaron con un lote de toba rica en clinoptilolita obtenida de la veta de Cerro Prieto ejido San Miguel de los Anchondo, localizada a 7 km de Parral, Chihuahua ($106^{\circ}9'$ longitud Oeste y $28^{\circ}17'$ altitud Norte); se encontraron altas concentraciones de sodio, hierro, magnesio y titanio. No obstante, los resultados obtenidos para el lote de TRA de esta investigación, es similar a la composición de la TRA reportada por López *et al.*, 2016; quienes reportan aluminio, oxígeno y silicio. Es importante destacar que la composición elemental de una mina puede llegar a ser diferente de otra por los procesos geológicos que se dieron en cada caso, incluso dicha composición varía de acuerdo a las zonas de muestreo de una misma veta. Por lo que las diferencias con lo reportado por Díaz-Nava *et al.* (2005) no son extraños.

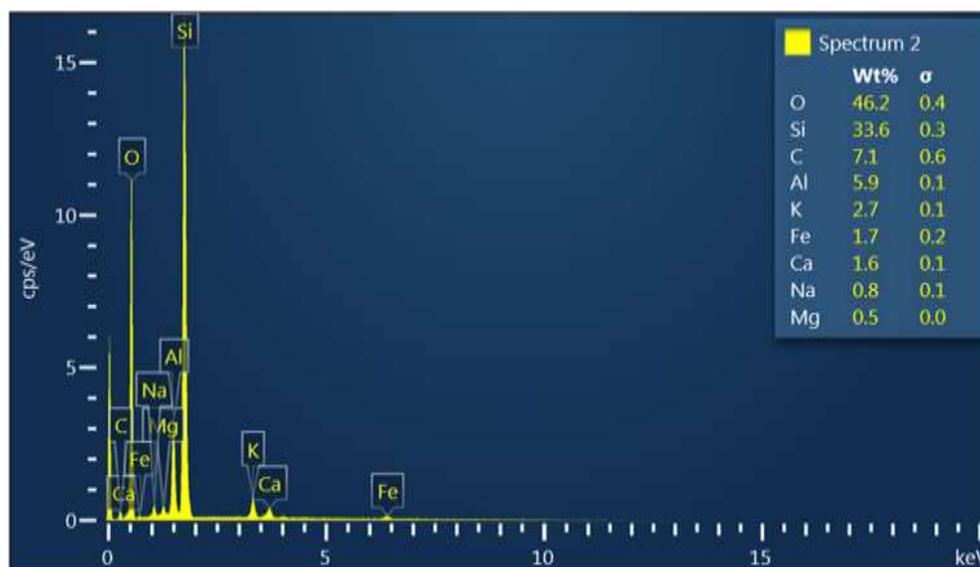


Figura 14. Espectro del análisis EDS y tabla de composición porcentual elemental de la TRA.

8.1.4. Difracción de Rayos X de la TRA

A través de esta técnica se determinaron las fases presentes en la TRA, así como la cristalinidad presente en la roca. En la Figura 15 se muestra el difractograma de la TRA. Con base a los resultados se demuestra que la TRA posee una estructura cristalina. Los patrones de difracción de la TRA son típicos a los patrones de difracción de zeolitas; en ellos se identificó la clinoptilolita, óxido de silicio y heulandita, siendo la clinoptilolita en componente principal seguido por el óxido de silicio. Conforme a este resultado, la composición de la TRA, es similar a la composición de otras zeolitas naturales regionales reportadas por Díaz-Nava *et al.*, 2005 y López *et al.*, 2016. A nivel mundial, también se reconoce a los minerales de zeolita tipo heulandita-clinoptilolita como componentes principales de las zeolitas naturales, según lo reportado por Ciceralli *et al.*, 2019.

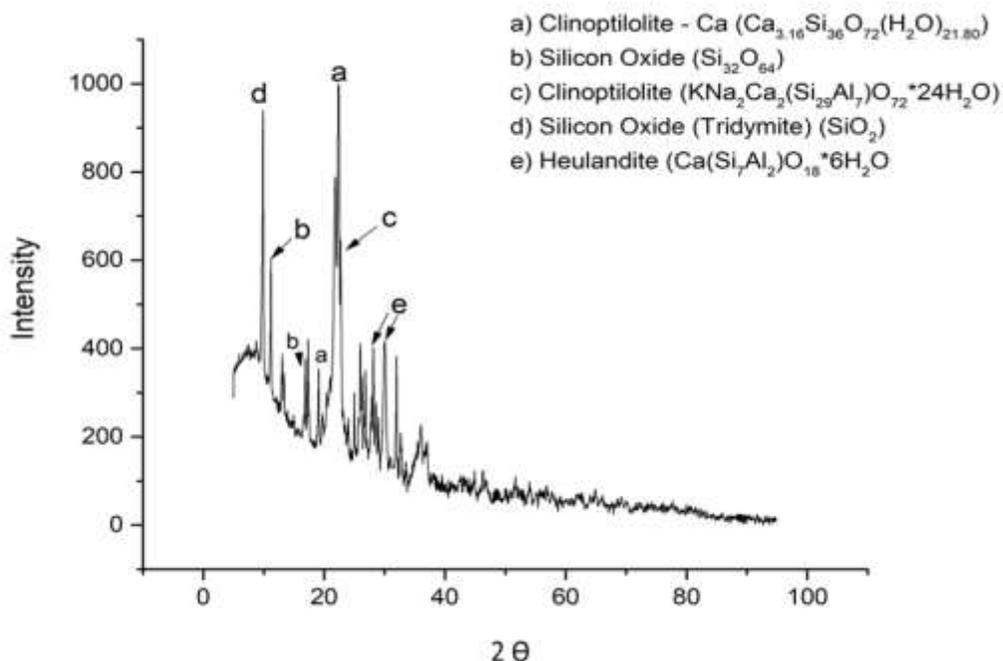


Figura 15. Patrón de difracción de la TRA.

8.1.5. Densidad y capacidad de retención de agua de la TRA

Conforme la metodología reportada por Jaber *et al.* (2017) se determinó la densidad y la capacidad de retención de agua de la TRA por triplicado. En este estudio se obtuvo que la capacidad de retención de agua de la TRA fue de 0.137 ± 1.70 g H₂O/ g TRA, este valor se encuentra cercano al valor reportado por Wahono *et al.*, 2019, quienes reportan una capacidad de retención de agua de 0.148 g H₂O/ g de zeolita natural; en este sentido, el valor de la capacidad de retención de agua se ve influenciada por la relación Si / Al, a medida que esta aumenta afecta negativamente la hidrofilia del material y, por lo tanto, sus propiedades de adsorción de agua. Mientras tanto, la densidad de la TRA a 20°C fue de 1.9124 ± 0.2100 g/cm³, no obstante Zendelska *et al.*, 2018 reportan una densidad de 1.72 g/cm³. En este caso la diferencia es mínima, siendo las condiciones de experimentación o la relación Si / Al, los factores que pudiesen influir en dicha diferencia.



8.2. Desarrollo de la biopelícula microbiana sobre TRA

Con el propósito de aumentar la cantidad de biomasa, así como evaluar el desarrollo de la biopelícula sobre la TRA (tomando en cuenta parámetros como temperatura, pH y uso de sustrato así como donador de electrones), se llevaron a cabo fermentaciones sucesivas con medio sulfato reductor y un consorcio microbiano sulfato reductor/ sulfato oxidante aislado de los lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales por Epitacio (2016), estos cultivos fueron incubados en diferentes condiciones; para la proliferación de biomasa, en el laboratorio a temperaturas entre 29 y 30°C (Figura 16); el desarrollo de la biopelícula sobre la TRA se llevó a cabo a temperatura del exterior con máximo registrado de 54°C y un mínimo de 3°C (Histórico mensual: weather.com), los cultivos fueron expuestos a horas luz así como a horas sombra (Figura 17). Se pudieron observar cambios en los medios de cultivo así como en la TRA, producto de la actividad metabólica microbiana así como de las propiedades físico química de la TRA.

Durante la proliferación de biomasa y formación de la biopelícula, de manera cualitativa, se lograron identificar cambios en el metabolismo microbiano. Entre dichos cambios destaca la detección de gas con olor a “huevo podrido”, lo cual es indicativo de la formación de H_2S , producto de la reducción de compuestos de azufre, en este caso los sulfatos presentes en el medio de cultivo. En las Figuras 16 y 17 se muestra el cambio de color del medio de cultivo sulfato reductor. El medio de contenía sulfato de hierro amoniacal (solución I), siendo el hierro en esta sal, también el indicador del metabolismo sulfato reductor, debido a la formación de precipitados de sulfuro de hierro (FeS), virando así el color del medio de cultivo de amarillo a negro. De acuerdo a Wisniewski *et al.*, 2018 el H_2S tiene un efecto tóxico sobre las células bacterianas, inhibiendo su crecimiento; esto se debe a que el gas H_2S producido durante la sulfato reducción, es altamente soluble en agua logrando así difundir a través del citoplasma. González (2007) demuestra que la presencia de hierro en solución en los medios de cultivo, provoca la atenuación del efecto inhibitorio del H_2S , debido a la precipitación del hierro con el sulfuro biogénico al formarse FeS .



Figura 16. Medios de cultivo inoculados con un consorcio bacteriano sulfato reductor/ sulfuro oxidante, incubados en el laboratorio para la proliferación de biomasa; **a)** tiempo 0 de incubación; **b)** quinta semana de incubación, nótese el cambio de color de amarillo a negro debido a la formación de FeS.

El uso de donadores de electrones, es esencial para asegurar la tasa de reproducción celular. Comúnmente los donadores de electrones son de bajo peso molecular; se han empleado varios sustratos orgánicos como donares de electrones y fuentes de carbono, entre ellos; lodos residuales, hojas, virutas de madera, estiércol animal, compost vegetal, aserrín, compost de hongos, suero y otros desechos agrícolas. Sin embargo, los compuestos orgánicos sintéticos también se han utilizado como donadores de electrones, especialmente compuestos de bajo peso molecular, como lactato, acetato, propionato, piruvato y butirato (Liamleam y Annachhatre, 2007). Para obtener una mayor concentración de células, se utilizó el lactato de sodio como sustrato, ya que es considerado como un buen donador de electrones para un mayor rendimiento en la producción de biomasa. En este estudio, además de la obtención de una mayor concentración de biomasa, también fue importante disminuir la producción de H_2S durante la sulfato reducción y evitar así la inhibición del desarrollo de la biopelícula. Para evitar la sobreproducción de H_2S , se requiere la manipulación de la tasa de carga orgánica o de sulfato (donante de electrones o receptores, respectivamente).



Es por esta razón que el lactato de sodio fue una elección prometedora. De acuerdo con Oyekola *et al.*, 2010, el lactato es una fuente potencial de carbono y donador de electrones, que ofrece ventajas en el proceso de la sulfato reducción. Favorece el crecimiento de un amplio espectro de bacterias reductoras de sulfato, fomentando la diversidad microbiana. Se ha informado que el uso de lactato como sustrato para BSR disminuye la toxicidad del sulfuro (un reto importante para la tecnología de bioprocesos). Además, la oxidación completa de 1 mol de lactato da como resultado la producción de 3 moles de alcalinidad de bicarbonato, en este sentido se regula el pH alcalino. El pH fue otro de los parámetros a evaluar durante la formación de la biopelícula sobre la TRA, este fue de 5.9 ± 0.5 , manteniendo el medio ligeramente ácido.

En base a los resultados de registros de temperaturas y pH, esto indica la capacidad que tiene el consorcio de tolerar amplios rangos de temperaturas así como de regular el pH del medio.

Esta misma capacidad de tolerancia a diversos factores ambientales, la demuestran Tian *et al.*, 2017, quienes después de secuenciar los genes *srB*, *soxB* de bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidantes respectivamente, provenientes de distintos reservorios de petróleo con rangos de temperaturas de 22°C-66°C y pH 5.8-7.8.; demostraron que las comunidades de BSR y BSO ejercieron especificidad de nicho y mostraron fuertes relaciones con los factores fisicoquímicos del reservorio que juegan un papel importante en el cambio de la comunidad microbiana, como la temperatura, el pH y la concentración de varios iones.

Hasta el momento se ha descrito que factores como el tipo de sustrato del medio del cultivo, así como las características propias del metabolismo microbiano, participan en los mecanismos de regulación de tolerancia a los factores ambientales por parte del consorcio. No obstante los materiales de soporte, en este caso la TRA; por sus propiedades físico químicas descritas en la sección 8.1., influyen en la disponibilidad de sustratos, mecanismos de adsorción de compuestos tóxicos para las comunidades microbianas así como en la regulación

de parámetros de temperatura y pH. En la Figura 18 se muestra como después de 4 semanas de incubación del consorcio microbiano sobre la TRA, ésta retiene partículas de sulfuro de hierro en sus poros (fragmentos negros), siendo esto positivo para la proliferación de la biopelícula, evitando su crecimiento por la inhibición de ciertos iones citotóxicos disueltos en el medio de cultivo.

Arif *et al.* (2018) reportan que la inmovilización y retención de comunidades microbianas por diferentes tipos de materiales de empaque (minerales arcillosos y zeolitas) son utilizados para estabilizar y reducir la inhibición de la producción de biomasa, además estos pueden proporcionar diferentes micronutrientes por la presencia de iones como Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , etc. Los cuales pueden ser cofactores de enzimas en diversos procesos metabólicos.



Figura 17. Formación de la biopelícula sobre TRA, durante 4 semanas de incubación a temperatura ambiente; nótese la acumulación de FeS sobre la TRA, producto del metabolismo sulfato reductor.



Figura 18. Fragmentos de TRA inoculada con el consorcio bacteriano sulfato reductor/ sulfuro oxidante, después de 4 semanas de incubación.

8.3. Instalación, monitoreo y evaluación del BLE

Se vaciaron ~100 kg de TRA de ½ pulg sin activar en el BLE, mismo que se instaló en el establo “Los Arados” (Figura 19). Una vez empacado, se llenó con parte del inóculo obtenido por Domínguez, 2017 y el inóculo obtenido durante el desarrollo de la biopelícula sobre TRA (sección 8.2.); las condiciones operacionales se muestran en la Tabla 9. Los componentes del diseño del BLE, se muestran en las Figuras 19, 20, 21 y 22. El medio de cultivo sulfato reductor, fue recirculado a través del BLE para el desarrollo de la biopelícula sobre la TRA; durante 4 semanas se adaptó el microbioma para promover el metabolismo sulfato oxidante. Considerando la temporada de menor producción de biogás en el digester anaerobio de “los Arados”, se detectó a la entrada del BLE una carga másica de 50 ppm H_2S en la corriente de biogás. Después del periodo de adaptación, se comprobó la capacidad sulfato oxidante de la biopelícula al aumentar la carga másica de H_2S en el biogás 1000 ppm y detectar a la salida 3 ppm; teniendo un 99% de remoción de H_2S . Sun *et al.*, 2019, trabajaron con sistemas de BLE para la remoción de H_2S así como compuestos orgánicos volátiles sulfurados, reportan un periodo de adaptación de 20 días con una carga

másica de $127.3 \text{ mg/m}^3 \text{ H}_2\text{S}$ en la entrada del sistema teniendo posteriores eficiencias de remoción del 90%. Con lo anterior se deduce que para asegurar la eficacia de la remoción de H_2S , es importante el periodo de adaptación, ya que por sí mismo el H_2S tiene la característica de ser citotóxico.

Tabla 7. Condiciones operacionales y de diseño del BLE.

PARÁMETRO		VALOR	UNIDADES
Flujo (<i>Domínguez, 2017</i>)	Q	943.33	mL/min
Altura	h	120	cm
Diámetro	D	35.5	cm
Volumen	V	118775.76	cm^3
Tiempo de retención hidráulica	TRH	43.32	s
Recirculación de medio de cultivo		5 L	min
pH		6.05 ± 0.1	

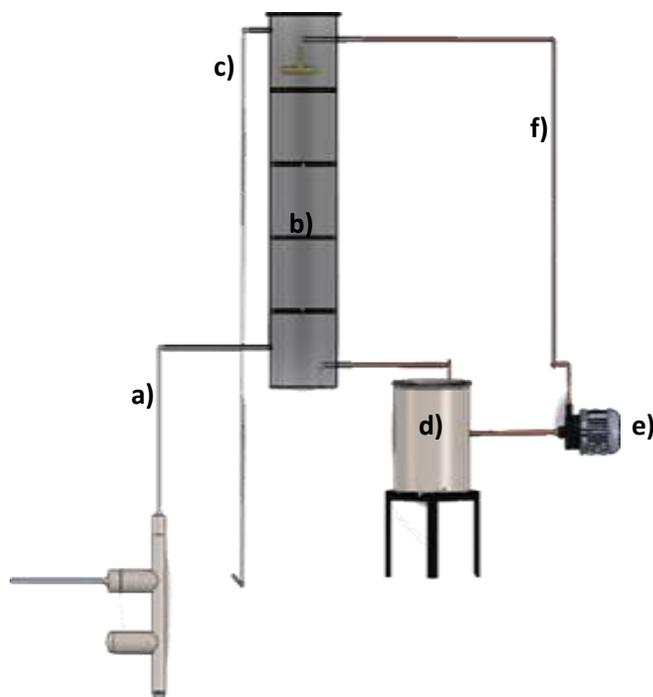


Figura 19. Esquema del prototipo de BLE; **a)** entrada de biogás; **b)** soporte para TRA de acero inoxidable; **c)** salida de biogás; **d)** contenedor de medio de cultivo; sistema de recirculación de medio de cultivo: **e)** bomba peristáltica y **f)** sistema de riego homogéneo.



a)



b)

Figura 20. Vista frontal del BLE **a)**, Contenedor de medio de cultivo *, sistema de recirculación de medio de cultivo →; Vista lateral del BLE **b)**, entrada de biogás ◀, salida de biogás ▼.



a)



b)

Figura 21. Vista al interior del BLE **a)**; parte superior de la biocolumna y estructura de PVC para el sistema de recirculación de medio de cultivo **b)**.



Figura 22. Sistema electrónico de detección de gases: CO₂ (%), H₂S (ppm) y O₂ (%). El sistema estuvo compuesto por electroválvulas V2 (entrada de biogás), V1 (salida de biogás); detectores infrarrojos así como de celdas electroquímicas. La detección de gases se midió por hora: siendo la hora “par” la entrada de biogás y la hora “non” el registro de la salida de biogás.

Después del periodo de incubación y conforme se alimentaba el DA de “los Arados”, se realizaron los registros de las entradas y salidas de algunos componentes de biogás al BLE, entre ellos H₂S (ppm) CO₂ (%) y O₂ (%); en el periodo de Febrero-Julio de 2019. Por cuestiones técnicas, el monitoreo no pudo realizarse de manera continua, sin embargo las condiciones de trabajo presentadas permitieron evaluar el porcentaje de remoción de H₂S, así como cambios en las concentraciones porcentuales de CO₂ y O₂ durante el proceso de oxidación del H₂S. El sistema electrónico de detección de gases estaba enlazado a una red inalámbrica de banda ancha, en donde todas las lecturas se recopilaban en la aplicación ThingSpeak®, para luego ser procesados en Microsoft Excel 2010 y el software GraphPad Prism 8.0.1. Otros de los factores técnicos a considerar por las condiciones climáticas, es la evaporación del medio de cultivo en días calurosos. Para evitar que el sistema se secase, el contenedor de medio de cultivo era rellenado cada mes con 10L de medio de cultivo sulfato reductor.



A continuación en la Figura 23 se muestra el gráfico de entradas y salidas de H_2S en el BLE, durante el periodo febrero-julio de 2019, abarcando un total de 112 días de monitoreo. Durante este periodo las concentraciones de H_2S son dependientes a la cantidad de biogás producido durante la DA. Y la cantidad de biogás producido así como la tasa de remoción de H_2S , fue dependiente de la temperatura ambiental. En la Tabla de 10 se muestra el histórico del clima de la ciudad Delicias, Chihuahua; durante el periodo de evaluación del BLE (Periodo Febrero-Julio 2019). En base a esto se puede demostrar como la concentración de H_2S es baja en los primeros meses de registro de lecturas, sin embargo, conforme avanza el tiempo y con él el incremento de la temperatura ambiental, la producción de biogás aumenta en la DA al igual que la carga másica de H_2S . Siendo los meses de febrero-marzo en donde la concentración de H_2S oscila entre 100 y 1000 ppm, mientras que en el mes de mayo las lecturas de H_2S a la entrada del BLE comienzan a incrementarse en un máximo de 4000 ppm; los meses de junio y julio presentan un incremento en las temperaturas máximas y mínimas, las lecturas de H_2S en promedio fueron entre 8000 y 9000 ppm respectivamente para cada mes.

Como se observa en la Figura 23, la remoción de H_2S se acerca a la totalidad durante el periodo Febrero- Mayo, sin embargo durante el transcurso de los meses Junio-Julio la tasa de entrada de H_2S al BLE es casi equivalente a la salida del mismo. Cabe resaltar que aunque el porcentaje de remoción en los meses de Junio-Julio (Figura 24) es baja, alrededor del 60% - 40%, a excepción del mes de Junio en donde la carga másica de H_2S se ve ligeramente aumentada a la salida del BLE; la concentración de H_2S a la salida del BLE en el mes de Julio no aumenta pese a la disminución de la eficiencia de remoción, sin embargo como se ilustra en las figuras 23 y 24 la eficiencia del porcentaje de remoción vuelve a aumentar conforme transcurre el tiempo, esto pudiese ser indicativo de la capacidad de la biopelícula en condiciones sulfato oxidantes, de lograr la homeostasis frente condiciones ambientales extremas, en este caso las altas concentraciones de H_2S en la corriente de biogás.

Tabla 8. Histórico del clima de la ciudad Delicias, Chihuahua (Periodo Febrero-Julio 2019) (Datos tomados de weather.com)

<i>Periodo</i>	<i>Máxima (°C)</i>	<i>Mínima (°C)</i>
Febrero-Marzo	21	6
Mayo	36	8
Junio	36	14
Julio	36	17

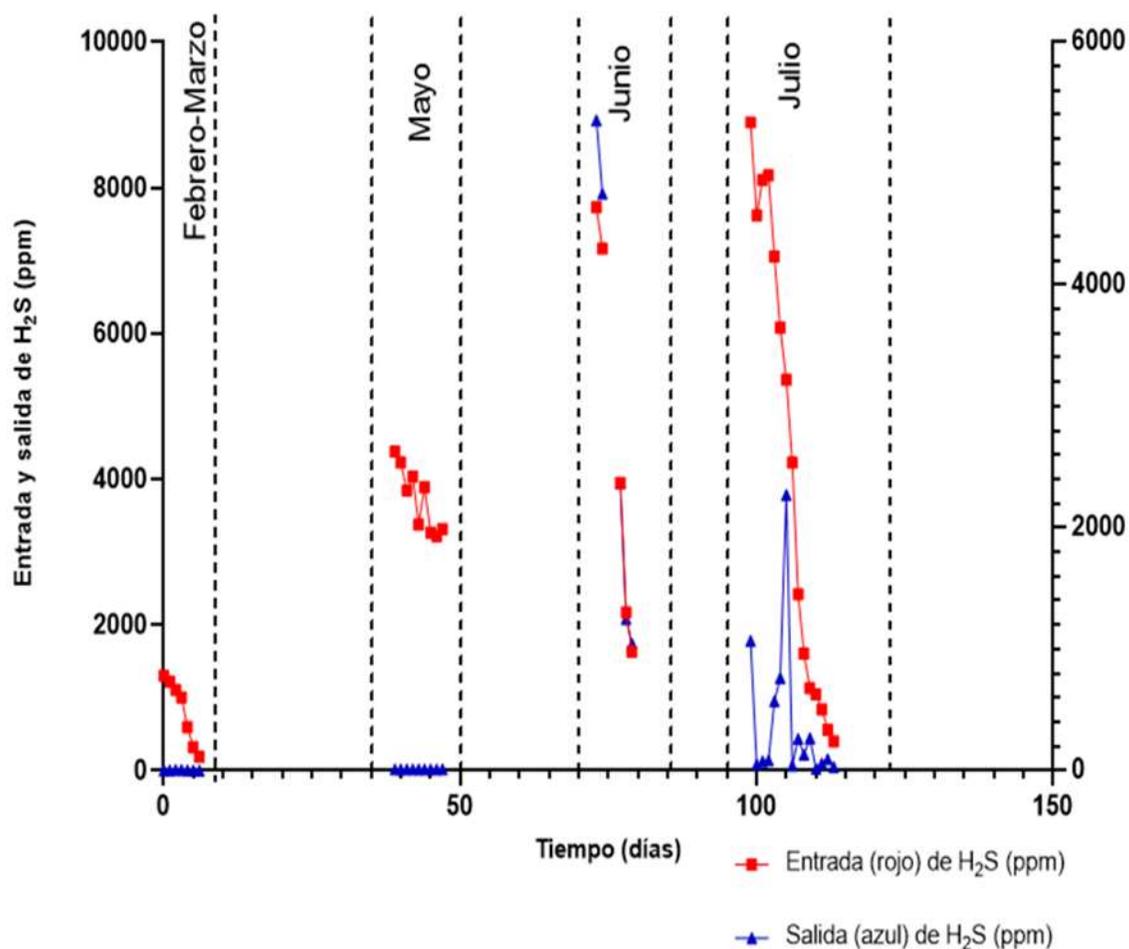


Figura 23. Entrada (rojo) y salida (azul) de H₂S en la corriente de biogás (periodo Febrero-Julio 2019)

De Arespacochaga *et al.*, 2014, reportan que las temperaturas superiores a 35 ° C comprometen la estabilidad biológica de los sistemas de BLE, además el rendimiento observado a 30 ° C y 35 ° C no mostraron variaciones. Sin embargo en este estudio se observó lo contrario. En la figura 24 se muestran los porcentajes de remoción de H₂S en la corriente de biogás, aunque este porcentaje de eficiencia de remoción haya disminuido durante los días 72 al 80, el BLE gracias a la actividad bacteriana, tuvo la capacidad de autorregularse frente a altas concentraciones de H₂S y variaciones de pH, así como tolerar las fluctuaciones de las temperaturas ambientales (Tabla 10), de tal manera que se mantuvo la remoción de H₂S. Estos fenómenos de autorregulación metabólica también fueron reportados en estudios realizados por Rattanapan *et al.*, 2009 y Chen *et al.*, 2014. Lo cual confirma la naturaleza del metabolismo extremófilo de las especies bacterianas presentes en la biopelícula para adaptarse.

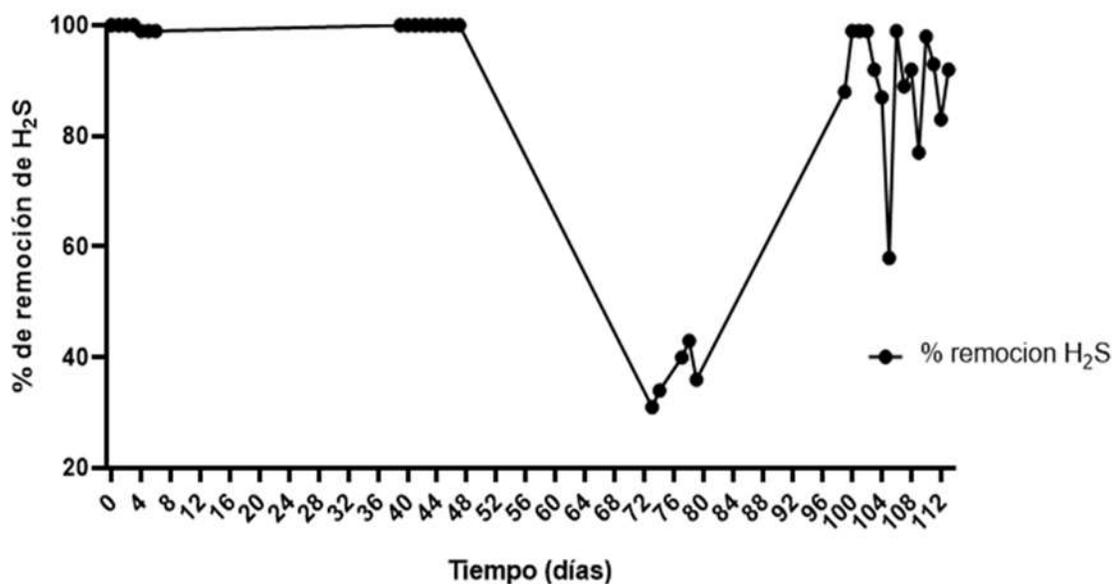


Figura 24. Evaluación del porcentaje de remoción de H₂S en la corriente de biogás (periodo Febrero-Julio 2019)



De acuerdo a Chaiprapat *et al.*, 2015, los factores clave a considerar en la biofiltración son el pH del medio de cultivo, la tasa de recirculación del medio de cultivo, la temperatura así como el TRH, ya que estos parámetros influyen en la oxidación bioquímica del H₂S. En base a esto en la Tabla 11 se comparan BLE con diferentes condiciones de operacionales así como el porcentaje de remoción de H₂S.

Como se puede observar en la Tabla 11, la mayoría de los sistemas de BLE presentan buenos porcentajes de remoción de H₂S. Esto se debe principalmente a que los BLE tienen la particularidad de recircular el medio de cultivo, con ello se hacen fluir los micro y macro nutrientes que preservan la estabilidad de las poblaciones microbianas sobre los materiales de empaque. La fluidización proporciona una gran área de superficie para la formación y crecimiento de biopelículas. El reciclaje del efluente también puede aplicarse para asegurar una fluidización uniforme y una velocidad de carga de sustrato adecuada. Por su fácil diseño y operación los BLE son buenas alternativas para tratar el H₂S en la corriente de biogás (Ercan *et al.*, 2013).

Las condiciones operacionales (Tabla 9) del BLE de esta investigación, permitieron remover concentraciones entre 1000 y 9000 ppm de H₂S en la corriente de biogás con un 87% de eficiencia, en un periodo de seis meses. Si se comparan las cargas másicas reportadas en la Tabla 11 así como los porcentajes de remoción, el porcentaje de remoción obtenido supera 50% más que la eficiencia de remoción de los porcentajes reportados (Tabla 11).

La biopelícula y el material de empaque son la parte medular de la biofiltración, ya que influyen en la regulación de fenómenos complejos como el crecimiento y la actividad microbiana, la transferencia de masa, la absorción y la adsorción (Rajamanickam *et al.*, 2017). Además de las características fisicoquímicas (alta porosidad, alta superficie específica, alta resistencia mecánica y capacidad de retención de humedad), el material de empaque debe tener una alta capacidad de amortiguación (para evitar la fluctuación del pH) y abundantes nutrientes (Singh *et al.*, 2017).

Aunque los materiales de empaque reportados en la Tabla 11 fueron diferentes a los utilizados en el sistema de BLE de este estudio, la TRA, por sus propiedades físico químicas, permitió el desarrollo de la biopelícula con capacidad oxidante, además de influir de manera positiva en la fluidización del biogás y el medio de cultivo, y la cinética de remoción de H₂S.

Tabla 9. Reportes de condiciones operacionales de BLE y porcentaje de remoción de H₂S.

<i>Autor</i>	<i>Tipo de reactor</i>	<i>Material de empaque</i>	<i>pH del medio de cultivo</i>	<i>Tasa de carga del medio de cultivo</i>	<i>TRH</i>	<i>Carga másica de H₂S</i>	<i>Porcentaje de remoción de H₂S</i>
Amaury Courtois, <i>et al.</i> , 2014	BLE (laboratorio)	Roca expandida	2.0 -6.7	1.5 m ³ h ⁻¹	19 s	300 ppm	100%
Pirolli <i>et al.</i> , 2016	BLE (campo)	Esferas de polipropileno	6.9	1.17 L/min	54 - 107.5 min	518-1705 ppm	99.8%
Watsuntorn <i>et al.</i> , 2019	Batch	Poliuretano	7-8	-	-	4000 ppm	100%
Chen <i>et al.</i> , 2014	BLE (piloto)	Carbón activado de bambú	3.49 - 7.45	2 m ³ h ⁻¹	25 s	5 g m ⁻³ h ⁻¹	99%
De Arespacochaga <i>et al.</i> , 2014	BLE (piloto)	Polipropileno HD Q-PAC®	1.5 - 2	800–1000 L/h	80 - 85 s	2200 – 4350 ppm	90%
Watsuntorn <i>et al.</i> , 2020	BLE (laboratorio)	Espuma de poliuretano	7	2.5 L/h	3 min	~4000 ppm	100%

Además de la evaluación de la remoción de H_2S en la corriente de biogás, durante el periodo Febrero-Julio 2019; se monitorearon las entradas y salidas porcentuales de CO_2 y O_2 . En la Figura 25 se muestra la tasa promedio de CO_2 a la entrada del BLE, la cual fue del 32% mientras que a la salida se reportó un 23%; no obstante en el mes de Mayo la entrada promedio de CO_2 al sistema fue de 23%, 0% a la salida del BLE. En los otros meses, la concentración de CO_2 a la entrada y salida del BLE fueron similares. En otro escenario, en el gráfico de la Figura 26 se muestran las concentraciones de O_2 a la entrada y a la salida del BLE, siendo del 2% y 9% respectivamente durante el periodo de monitoreo del BLE. Sin embargo, durante los meses de Febrero a Mayo se observó que en el sistema no se registraron altas entradas de O_2 al sistema, si no que hubo generación de O_2 al registrarse una concentración del 20% a la salida del BLE.

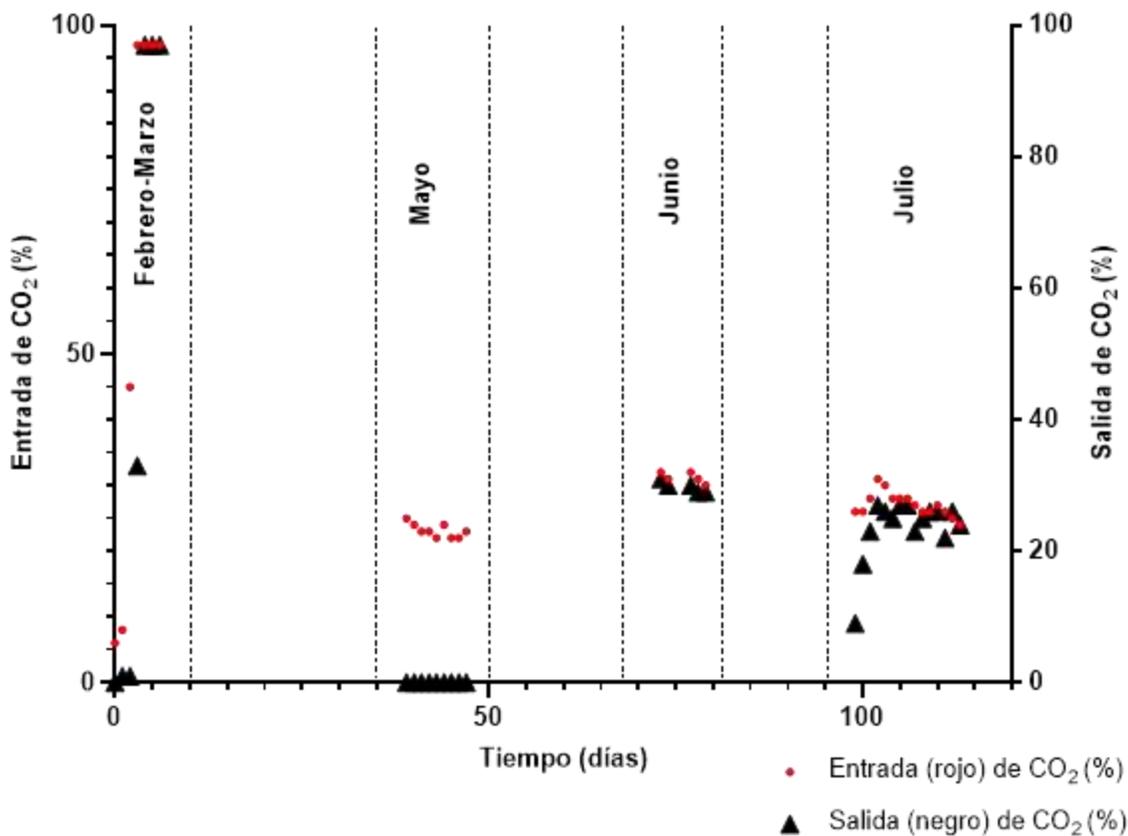


Figura 25. Entrada (rojo) y salida (negro) de % CO_2 en la corriente de biogás

(Periodo Febrero-Julio 2019)



En términos de los requisitos de crecimiento, estos microorganismos difieren mucho incluso en las diferentes especies de un mismo género. Sus temperaturas óptimas son de 4 a 90 ° C y los valores de pH están en el rango de 1-9. La mayoría de las bacterias quimiolitotróficas estudiadas prosperan mejor en condiciones mesofílicas o termofílicas (por ejemplo: *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*).

8.4. Extracción de ADN genómico directamente de la TRA

La metagenómica, es el estudio del acervo genético de una comunidad entera de microorganismos en un nicho particular. Esto proporciona información valiosa sobre la funcionalidad de la interacción huésped-microorganismo en un ecosistema biológico (Gaur *et al.*, 2019). Una comprensión profunda de las composiciones microbianas, la diversidad / similitud, las redes metabólicas, los patrones genéticos funcionales y las relaciones entre la biodiversidad así como las funciones del sistema a nivel del genoma, podrían ayudar a optimizar la productividad microbiana y contribuir a mejorar diversos bioprocesos de interés (Zhang L. *et al.*, 2019).

En este apartado se presentan los resultados preliminares, de la propuesta de un nuevo protocolo de extracción de ADN genómico, independiente de técnicas de cultivo, es decir, directamente de la TRA como muestra ambiental arcillosa.

Parte de la validación del protocolo de extracción de ADN que se propone, se basó en la obtención de un control positivo, obtenido mediante técnicas dependientes de cultivo; haciendo uso del medio de cultivo sulfato reductor (**Anexo I**), se inoculó con la biomasa presente en la TRA para asegurar una mayor concentración de biomasa. De acuerdo con Burlage *et al.*, (1998) uno de los factores que afectan la obtención de ácidos nucleicos, es la cantidad de biomasa. En la mayoría de las muestras ambientales, la baja concentración de biomasa, es uno de los principales problemas que se presentan.

Mediante la adaptación de la técnica de extracción de ADN fenol- cloroformo- alcohol isoamílico de Bhagat *et al.*, (2012), se obtuvo el ADN genómico del control positivo (Figura 27).

En la Figura 27 se observa la comprobación de la extracción del control positivo, en un gel de agarosa al 0.8%. Las bandas obtenidas fueron de una intensidad aceptable, basándose en el bandeo del marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III, las bandas obtenidas de los controles positivos pesan alrededor de 23 000 pb.

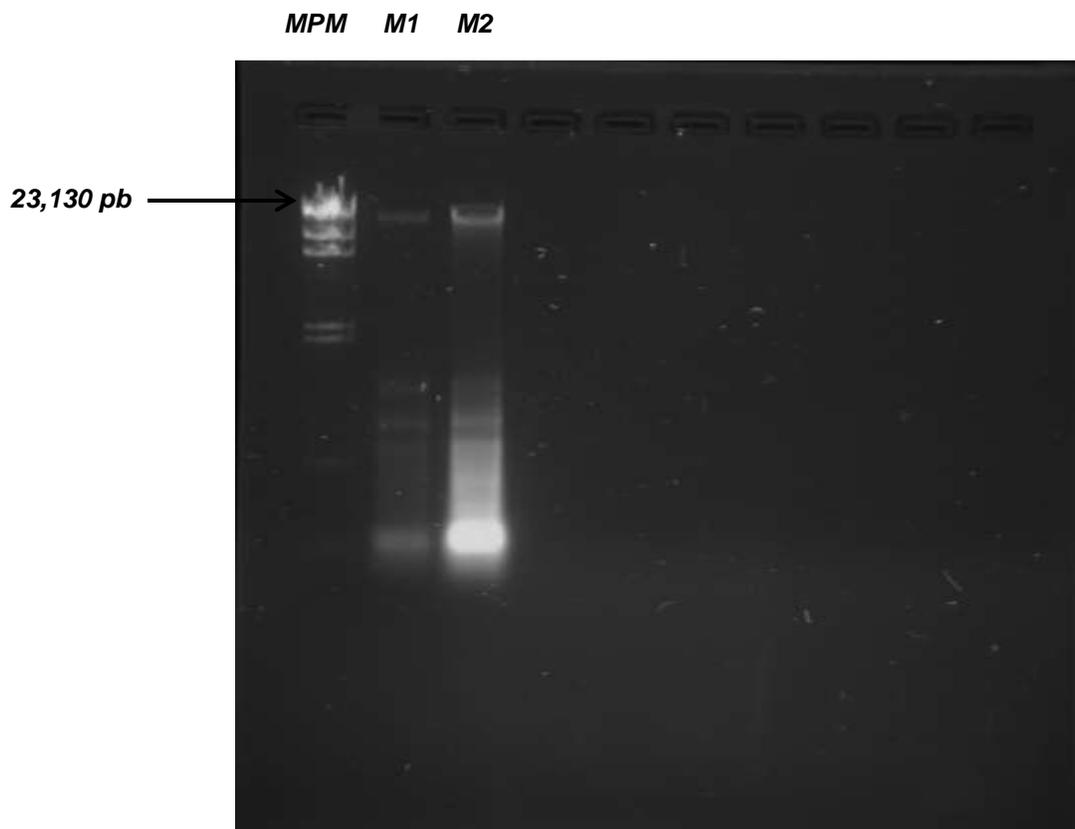


Figura 27. Electroforesis de gel de agarosa al 0.8% del control positivo de ADN genómico. **MPM:** marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III (23,130 pb); **M1:** muestra 1; **M2:** muestra 2. Nótese que las bandas obtenidas con la técnica de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico de ambos controles positivos, pesan alrededor de 23,000 pb

En la Figura 28 se muestra la comprobación del método de extracción de ADN genómico independiente de cultivo, en un gel de agarosa al 0.8%. En esta imagen se puede observar que la intensidad de la banda de la muestra problema tiene mayor intensidad en comparación con la intensidad de la banda obtenida del control positivo. Esto podría ser indicativo de que se ha extraído una alta concentración de ADN genómico directamente de la TRA. En base al tamaño de la banda del control positivo, la banda de la muestra problema también se encuentra alrededor de los 23,000 pb.

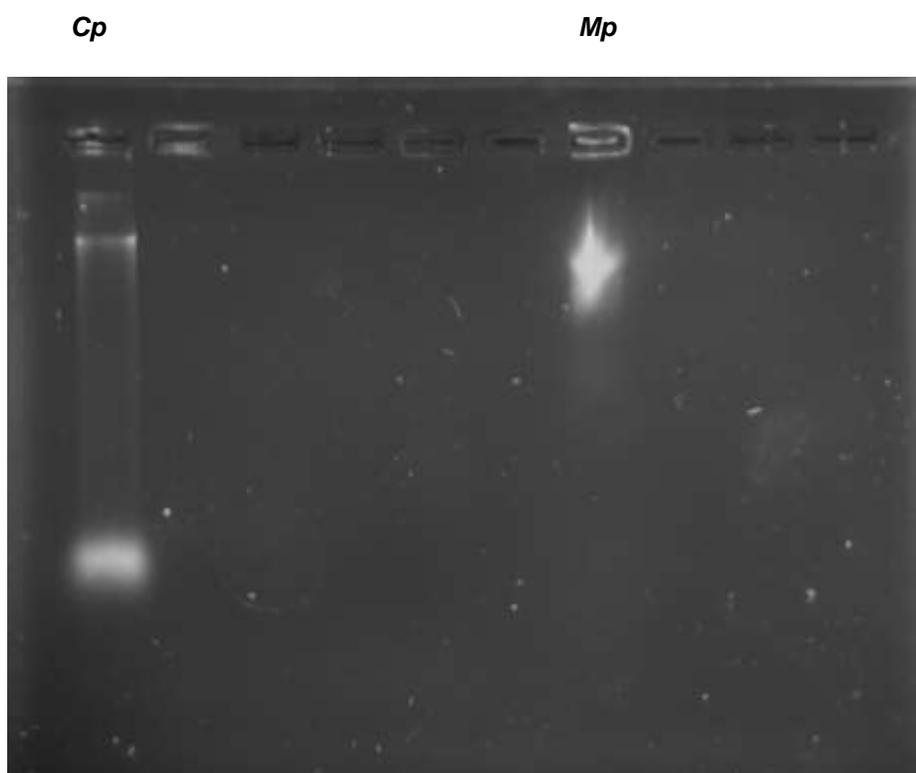


Figura 28. Electroforesis de gel de agarosa al 0.8% de la extracción de ADN genómico directamente de la TRA. **Cp:** Control positivo; **Mp:** muestra problema. En esta imagen se puede observar la alta intensidad y el gran tamaño de la banda obtenida de la **Mp**. La presencia de residuos en las bandas obtenidas, es mas evidente en el control positivo.



La extracción de ADN en muestras ambientales es técnicamente desafiante, aún y con el uso de kits comerciales de extracción disponibles en el mercado, estos kits se limitan principalmente a las muestras comúnmente estudiadas, como el suelo y las heces (Gaur *et al.*, 2019). Para efectos de esta investigación, la TRA es un material arcilloso, en la que su composición química (**apartado 8.1.4.**) interacciona fuertemente con los EPS producidos por el consorcio microbiano, mediante interacciones electroestáticas. Lo que hace difícil la obtención del ADN genómico aún y utilizando protocolos basados en métodos físicos como: centrifugación, sonicación, calentamiento; químicos: formaldehído y calor, formaldehído e hidróxido de sodio, etanol (D'Abzac *et al.*, 2010); enzimáticos: lisozima y proteinasa k (Govil *et al.*, 2019).

Al trabajar con muestras de biopelículas, los dos factores importantes que dificultan la extracción de ADN son: 1) la unión del ADN a la matriz y 2) la presencia de diversidad microbiana en una comunidad de biopelículas con diferentes tipos de paredes y membranas celulares (Govil *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que es crucial el pretratamiento de muestras ambientales; esto se basa en la idea de que el lavado debe promover la eliminación de cationes covalentes, así como compuestos orgánicos que se disuelven fácilmente y que promueven la dispersión y homogeneidad de la muestra, además de disminuir la posible adsorción de ADN por los componentes de los EPS (D'Abzac *et al.*, 2010; Govil *et al.*, 2019).

Para inhibir la interacción del ADN con la matriz, este nuevo protocolo hace hincapié en el pretratamiento de la TRA. Este consistió en secuestrar la mayoría de los iones metálicos presentes en las sales contenidas en la TRA, haciendo uso de un agente quelante, como lo es el EDTA, bajo condiciones alcalinas. De esta manera como proponen D'Abzac *et al.*, (2010) y Govil *et al.*, (2019), se evita que el ADN con carga neta negativa (por los grupos fosfatos) y los cationes presentes en la TRA interaccionen entre sí, dejando libre al ADN.



Lisar todas las células microbianas presentes en una muestra, para la obtención de ADN, es de suma importancia para recabar información concreta de las comunidades microbianas presentes en un nicho ecológico. Es por ello que en este protocolo además de utilizar el choque térmico en condiciones alcalinas, fue importante el empleo de la lisozima como método enzimático.

Aunque aún faltan estudios para corroborar que se está abarcando en su totalidad, la lisis del microbioma presente en la TRA, Morono *et al.*, (2014) sugieren que los tratamientos térmicos y alcalinos para muestras ambientales, tienen un rendimiento de lisis celular (alrededor del 80%) y un rendimiento de extracción de ADN 52 veces mayor que los métodos convencionales basados en kits comerciales.

En este apartado se presentó una técnica de extracción de ADN genómico dependiente de cultivo, para la validación de una técnica de extracción de ADN genómico directamente de la TRA. Los tamaños de las bandas obtenidas (Figura 28), podrían sugerir que no hay diferencia entre las técnicas de extracción utilizadas. Sin embargo, aún faltan ensayos posteriores para determinar la calidad del ADN extraído en cada técnica además del alcance en la obtención de todo el genoma presente en el microbioma.

De acuerdo con lo reportado por Dyda *et al.*, (2018), el aislamiento e identificación de microorganismos se basan en los métodos cultivables clásicos, los cuales permiten la caracterización bioquímica y la cuantificación de las cepas aisladas, sin embargo estas técnicas presentan limitaciones en la microbiología ambiental, ya que es probable que menos del 1% de las bacterias de las muestras ambientales sean cultivables. Aunque estos autores hayan reportado similitud entre técnicas cultivables e *in situ* con técnicas de biología molecular, para la identificación de la biocenosis presente en superficies de monumentos históricos, aún siguen existiendo diferencias a la hora de identificar en su totalidad las especies del microbioma presente en un nicho ecológico

8.5. Evaluación de la formación de la biopelícula microbiana sobre la TRA

Finalizada la evaluación de la remoción de H_2S en el BLE, se tomaron muestras de TRA inoculada, por triplicado, abarcando los 4 niveles del biofiltro. Basándose en las metodologías reportadas por Amaya *et al.*, (2015) y Kenjikida *et al.*, (1990) las rocas de TRA fueron procesadas para la subsecuente observación en el SEM. En las Figuras 27 y 28 se muestran las micrografías de la microscopía electrónica de barrido que se le realizó a la TRA inoculada. Teniendo en cuenta que cada micrografía fue tomada a partir de diferente área de la muestra para garantizar una observación homogénea, en estas figuras se puede observar la superficie de área de la TRA inoculada con el consorcio microbiano.

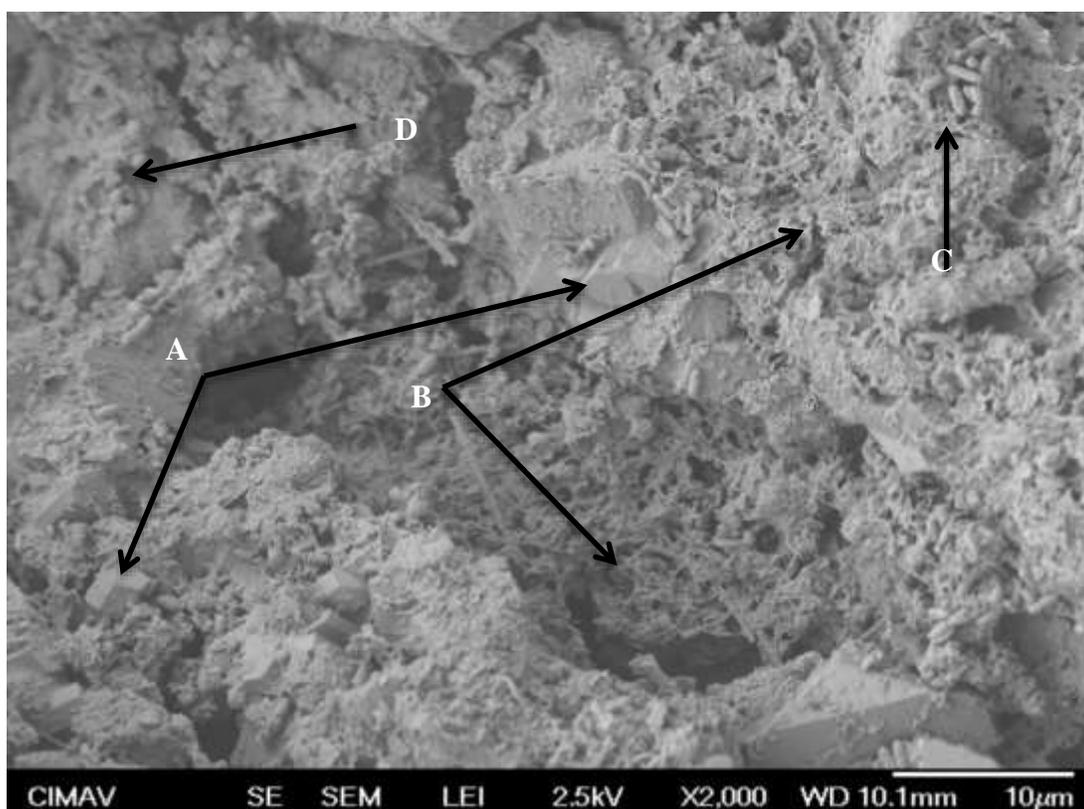


Figura 29. Micrografía de la TRA inoculada vista a 2,000X. En esta micrografía se puede observar la superficie de área de la TRA (**A**) filamentos de EPS (**B**) que forman redes en donde se encuentran atrapadas estructuras en forma de bastones (**C**) y cocos (**D**) propias del consorcio microbiano con capacidad sulfato oxidante.

Los EPS juegan un papel crucial en la formación de biopelículas. Los EPS, son producto de la excreción bacteriana activa y lisis celular; se componen de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y forman una capa de matriz tridimensional similar a un gel. Como se muestra en las Figuras 27 y 28, los EPS tienen la función de mantener las células juntas en disposición espacial, además protegen a las células de condiciones ambientales adversas; cambios de pH, temperatura así como la exposición a altas concentraciones de H_2S , ocurridos en el sistema de BLE de esta investigación, y también pueden contribuir como reservas de carbono y energía (Cheng *et al.*, 2011).

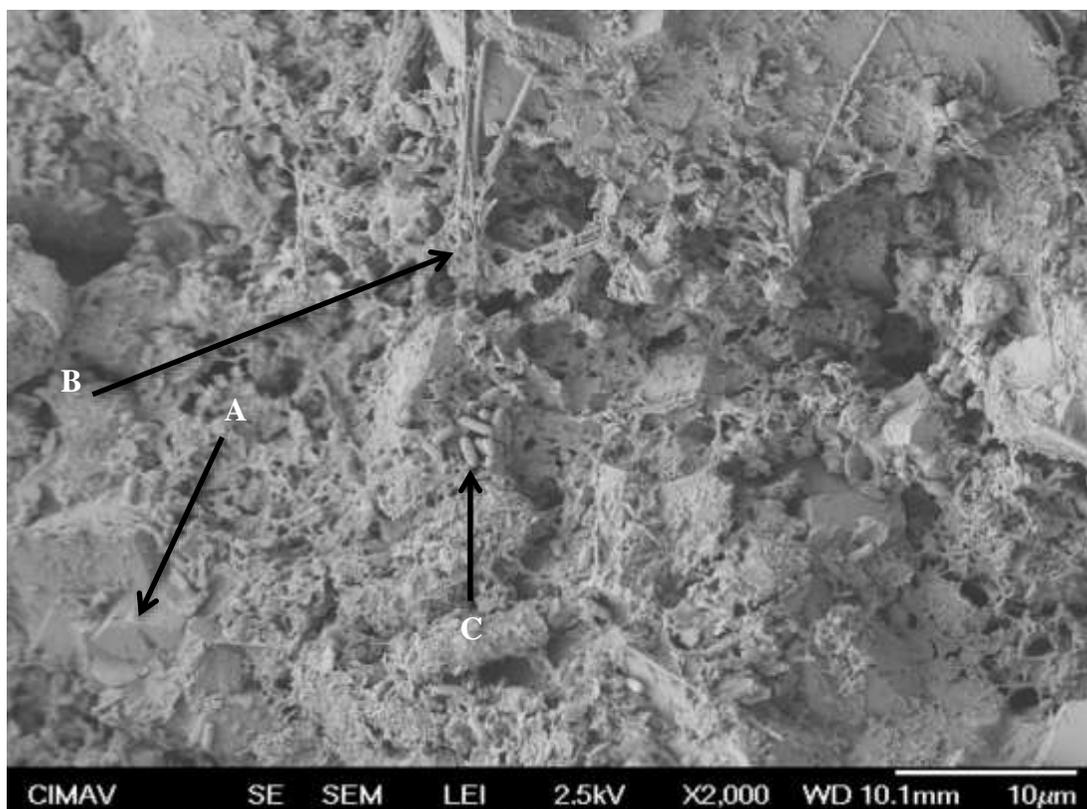


Figura 30. Micrografía de la TRA inoculada vista a 2,000X. En esta micrografía se puede observar la superficie de área de la TRA (A) filamentos de EPS (B) que forman redes en donde se encuentran atrapadas estructuras en forma de bastones (C).

En base a lo anterior, se entiende que los EPS están conformados principalmente por hidratos de carbono. Por medio del análisis EDS, de manera semi cuantitativa e indirecta se pudo corroborar la presencia de la EPS sobre la TRA después del bioproceso de desulfuración. En la tabla 12 se muestra la composición elemental (%) de la TRA antes y después de ser inoculada. Es evidente el aumento del %C de 7.1 a 11.94 sobre la TRA.

Tabla 10. Tabla de composición elemental (%) de la TRA sin inocular e inoculada

TRA	% C	% O	% Na	% Mg	% Al	% Si	% P	% K	% Ca
Sin inocular	7.1	46.2	0.8	0.5	5.9	33.6	-	2.7	1.6
Inoculada	11.94	44.5	0.79	2.65	2.93	17.53	8.5	1.2	9.9

Los materiales de empaque en los sistemas de biofiltración, proporcionan enriquecimiento selectivo para la formación de biopelículas. La adherencia de los microorganismos depende principalmente de las características fisicoquímicas de los materiales de empaque del biofiltro, como el área superficial específica, la porosidad, la rugosidad de la superficie y el tamaño de los poros (Arif *et al.*, 2018). En base a los resultados obtenidos, es evidente que la TRA como material de soporte para biofiltros lo hacen una opción prometedor.



9. Conclusiones

Las características físico químicas de la toba reolítica alterada (TRA) permitieron la adherencia de los microorganismos a su superficie, formándose así una biopelícula microbiana con capacidad sulfuro oxidante.

De la composición mineral de la TRA, se encontró minerales como carbonatos, cuarzo, óxido de silicio y en mayor proporción la clinoptilolita.

La clinoptilolita es uno de los principales componentes presentes en la TRA y otras zeolitas naturales, la presencia de oxígeno, silicio y alúmina, además de Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} y K^{+} como cationes de intercambio, le confirieron las siguientes propiedades a la TRA:

- a) Medio de protección para el microbioma frente a fluctuaciones de pH y temperatura.
- b) La captura de compuestos e iones que pudiesen ser citotóxicos para el microbioma presente en la biopelícula.

Estas propiedades fueron positivas, al actuar en sinergia con la propiedades de regulación metabólica, propia de la biopelícula, frente a condiciones ambientales adversas.

El tiempo de adaptación de la biopelícula a condiciones sulfuro oxidantes, durante un mes, resultó ser necesario para asegurar la eficiencia de la remoción de H_2S (87-99%).

Moléculas de estructura sencilla como el lactato y el CO_2 resultaron ser apropiados donadores de electrones y permitieron al sistema de biofiltración la producción biomasa capaz de remover H_2S .

Las concentraciones porcentuales obtenidas de CO_2 (23% entrada/ 0% salida) y O_2 (2% entrada/20% salida) en el biofiltro durante el mes de Mayo, proponen que el sistema trabaja en condiciones aerobias, con la presencia de microorganismos quimiolitotróficos. La operación del BLE en condiciones microaerofílicas, promueve mayor producción de microbioma sulfuro oxidante sobre la TRA.



Factores como la temperatura ambiental, influyó directamente en la carga másica de biogás y H_2S en el afluente del Biofiltro de lecho escurrido (BLE), así como en el proceso de oxidación de H_2S . Presentándose periodos de regulación del microbioma ante altas concentraciones de H_2S en la corriente de biogás.

Se construyó un prototipo de BLE que logró remover entre 1000 y 9000 ppm de H_2S en la corriente de biogás, lo que representa el 87% de eficiencia durante el periodo de evaluación. No obstante, este prototipo logró remover el 99% de H_2S , a concentraciones iguales a 4000 ppm.

La tolerancia de H_2S de la turbina capstone y el motogenerador de pistones en el establo “Los Arados” es de 70,000 mg/L y 200 mg/L respectivamente, siendo el motogenerador de pistones, el mayor productor de energía eléctrica; con los porcentajes de remoción de H_2S obtenidos, pudiesen permitir en un futuro, el uso continuo de la turbina Capstone y el motogenerador de pistones instalados en el establo “los Arados” para la generación segura de energía eléctrica.

Se prueba la hipótesis y cumple el objetivo de esta investigación: La implementación de un BLE para remover H_2S en la corriente de biogás, bajo las condiciones operacionales del digestor anaerobio en el establo “los Arados”, presentó ventajas por su fácil diseño, además de ser considerado una tecnología amigable con el medio ambiente, ya que los residuos generados por el sistema de BLE son inocuos.

Mediante la adaptación de técnicas de pretratamiento para microscopía electrónica de barrido, se logró comprobar el desarrollo de la biopelícula con capacidad sulfato oxidante sobre la TRA.

Los resultados preliminares de una nueva técnica de extracción de ADN genómico propuesta, basada en choque térmico en condiciones alcalinas, resultó ser prometedora para muestras ambientales arcillosas, en este caso la TRA.



10. Recomendaciones

Los resultados de esta investigación son prometedores, sugieren que es posible implementar modelos de optimización para la aplicación de BLE durante periodos prolongados y a gran escala.

El monitoreo de entradas y salidas de gases al BLE, proporcionaron un panorama del funcionamiento de esta tecnología en sinergia con la biopelícula y la TRA. No obstante, es necesario un monitoreo continuo en el tiempo y a intervalos de entre 12 y 24 horas para una mayor comprensión del fenómeno de remoción biológica de H_2S .

Parámetros como $\%CO_2$ y $\%O_2$ a la entrada y salida del BLE, permitieron identificar el metabolismo quimiolitotrófico en el microbioma. Para un mejor entendimiento de los procesos químico-biológicos que ocurren en el sistema, se propone cuantificar de manera continua los productos de la oxidación biológica de H_2S .

La temperatura, el % humedad y el pH son parámetros operacionales importantes. En prototipos semi automatizados como el BLE de esta investigación, se recomienda la implementación de detectores de dichos parámetros en el BLE para su monitoreo continuo.

En base a los buenos resultados preliminares obtenidos, sobre la técnica de extracción de ADN genómico basada en choque térmico en condiciones alcalinas, se propone realizar técnicas purificación y cuantificación del ADN genómico extraído, para la posterior validación de la técnica.



11. Referencias

- Almenglo, F., Ramírez, M., Gómez, J. M., & Cantero, D. (2016). *Operational conditions for start-up and nitrate-feeding in an anoxic biotrickling filtration process at pilot scale. Chemical Engineering Journal, 285*, 83–91. doi:10.1016/j.cej.2015.09.094
- Ates, A. (2018). The modification of aluminium content of natural zeolites with different composition. *Powder Technology*. doi:10.1016/j.powtec.2018.12.018
- Al-Ghouti MA, Da'ana DA, Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review, *Journal of Hazardous Materials*(2020), doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122383
- Arif, S., Liaquat, R., & Adil, M. (2018). *Applications of materials as additives in anaerobic digestion technology. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 97*, 354–366. doi:10.1016/j.rser.2018.08.039
- Aguilera, P. G., & Gutiérrez Ortiz, F. J. (2016). Techno-economic assessment of biogas plant upgrading by adsorption of hydrogen sulfide on treated sewage-sludge. *Energy Conversion and Management, 126*, 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.08.005>
- Azzouz, A., Kailasa, S. K., Lee, S. S., J. Rascón, A., Ballesteros, E., Zhang, M., & Kim, K-H. (2018). Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 108*, 347-369. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.009>
- Bhagat, J., Kaur, A., Sharma, M., Saxena, A. K., & Chadha, B. S. (2012). Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*(3), 963-971
- Ben Jaber, M., Couvert, A., Amrane, A., Rouxel, F., Le Cloirec, P., & Dumont, E. (2016a). Biofiltration of H₂S in air—Experimental comparisons of original packing materials and modeling. *Biochemical Engineering Journal, 112*, 153–160. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.04.020>
- Bhutto, A. W., Abro, R., Gao, S., Abbas, T., Chen, X., & Yu, G. (2016). *Oxidative desulfurization of fuel oils using ionic liquids: A review. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 62*, 84–97. doi:10.1016/j.jtice.2016.01.014
- Beristain-Cardoso, R., Texier, A.-C., Sierra-Álvarez, R., Field, J. A., Razo-Flores, E., & Gómez, J. (2008). Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 83*(9), 1197–1203. <https://doi.org/10.1002/jctb.1921>
- Barona, A., Elías, A., Arias, R., Cano, I., & González, R. (2004). *Biofilter response to gradual and sudden variations in operating conditions. Biochemical Engineering Journal, 22*(1), 25–31. doi:10.1016/j.bej.2004.07.006



- Borhan, M. S., Rahman, S., & Sarker, N. C. (2017). Dry Scrubbing of Hydrogen Sulfide Gas Using Nano Zinc Oxide Coated Glass Beads. *Applied Engineering in Agriculture*, 33(3), 407–418. <https://doi.org/10.13031/aea.12145>
- Broco, M., Rousset, M., Oliveira, S., Rodrigues-Pousada, C., 2005. Deletion of flavoredoxin gene in *Desulfovibrio gigas* reveals its participation in thiosulfate reduction. *FEBS Lett.* 579, 4803–4807.
- Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Sayler, G., & Geesey, G. (Eds.). (1998). *Techniques in microbial ecology*. Oxford University Press on Demand.
- Ben Jaber, M., Couvert, A., Amrane, A., Rouxel, F., Le Cloirec, P., & Dumont, E. (2016a). Biofiltration of H₂S in air—Experimental comparisons of original packing materials and modeling. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 153–160. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.04.020>
- Ben Jaber, M., Couvert, A., Amrane, A., Rouxel, F., Le Cloirec, P., & Dumont, E. (2016b). Biofiltration of high concentration of H₂S in waste air under extreme acidic conditions. *New Biotechnology*, 33(1), 136–143. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2015.09.008>
- Contreras G., A. (2017). Desarrollo de membranas porosas a partir de zeolita natural para la disminución de cadmio contenido en agua. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental, Facultad de ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Qro.
<http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1353>
- Courtois, A., Andrès, Y. and Dumont, É. (2015), H₂S biofiltration using expanded schist as packing material: influence of packed bed configurations at constant EBRT. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 90: 50-56. doi:[10.1002/jctb.4456](https://doi.org/10.1002/jctb.4456)
- Chen, Y., Fan, Z., Ma, L., Yin, J., Luo, M., & Cai, W. (2014). Performance of three pilot-scale immobilized-cell biotrickling filters for removal of hydrogen sulfide from a contaminated air steam. *Saudi journal of biological sciences*, 21(5), 450-456.
- Chaiprapat, S., Charnnok, B., Kantachote, D., & Sung, S. (2015). *Bio-desulfurization of biogas using acidic biotrickling filter with dissolved oxygen in step feed recirculation*. *Bioresource Technology*, 179, 429–435. doi:10.1016/j.biortech.2014.12.068
- Cheng, Y., Yuan, T., Deng, Y., Lin, C., Zhou, J., Lei, Z., Zhang, Z. (2018). Use of sulfur-oxidizing bacteria enriched from sewage sludge to biologically remove H₂S from biogas at an industrial-scale biogas plant. *Bioresource Technology Reports*, 3, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.01.006>



- Cheng, M., Cook, A. E., Fukushima, T., & Bond, P. L. (2011). *Evidence of compositional differences between the extracellular and intracellular DNA of a granular sludge biofilm. Letters in Applied Microbiology*, 53(1), 1–7. doi:10.1111/j.1472-765x.2011.03074.x
- Cicerali, D., Arslan, M., Yazar, E. A., Yücel, C., Temizel, İ., Park, S., & Schroeder, P. A. (2019). Mineralogy, chemistry, and genesis of zeolitization in Eocene tuffs from the Bayburt area (NE Turkey): Constraints on alteration processes of acidic pyroclastic deposits. *Journal of African Earth Sciences*, 103690. doi:10.1016/j.jafrearsci.2019.103690
- Chiappe, C., & Pomelli, C. S. (2017). *Hydrogen Sulfide and Ionic Liquids: Absorption, Separation, and Oxidation. Ionic Liquids II*, 265–289. doi:10.1007/978-3-319-89794-3_10
- Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2018). Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science*, 261, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.005>
- Choudhury, A., Shelford, T., Felton, G., Gooch, C., & Lansing, S. (2019). Evaluation of Hydrogen Sulfide Scrubbing Systems for Anaerobic Digesters on Two US Dairy Farms. *Energies*, 12(24), 4605. <https://doi.org/10.3390/en12244605>
- Cano, P. I., Colón, J., Ramírez, M., Lafuente, J., Gabriel, D., & Cantero, D. (2018). Life cycle assessment of different physical-chemical and biological technologies for biogas desulfurization in sewage treatment plants. *Journal of Cleaner Production*, 181, 663–674. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.02.018>
- Corrales, Lucia Constanza, Antolinez Romero, Diana Marcela, Bohórquez Macías, Johanna Azucena, & Corredor Vargas, Aura Marcela. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-81. Retrieved March 05, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200007&lng=en&tlng=es.
- Cano, P. I., Brito, J., Almenglo, F., Ramírez, M., Gómez, J. M., & Cantero, D. (2019). Influence of trickling liquid velocity, low molar ratio of nitrogen/sulfur and gas-liquid flow pattern in anoxic biotrickling filters for biogas desulfurization. *Biochemical Engineering Journal*, 148, 205–213. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2019.05.008>
- Chaiprapat, S., Mardthing, R., Kantachote, D., & Karnchanawong, S. (2011). *Removal of hydrogen sulfide by complete aerobic oxidation in acidic biofiltration. Process Biochemistry*, 46(1), 344–352. doi:10.1016/j.procbio.2010.09.007
- Cork, D., Mathers, J., Maka, A., & Srnak, A. (1985). Control of Oxidative Sulfur Metabolism of *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 269–272. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346713>



- De Arespacochaga, N., Valderrama, C., Mesa, C., Bouchy, L., & Cortina, J. L. (2014). *Biogas biological desulphurisation under extremely acidic conditions for energetic valorisation in Solid Oxide Fuel Cells*. *Chemical Engineering Journal*, 255, 677–685. doi:10.1016/j.cej.2014.06.073
- Domínguez, V. (2017). Prototipo a escala de laboratorio de un sistema de biofiltración para un biodigestor anaerobio para la remoción de H₂S. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de ciencias Químicas. Chihuahua, Chih. 61p
- D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E., Lens, P. N. L., & Guibaud, G. (2010). *Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1589–1599. doi:10.1007/s00253-009-2288-x
- Ercan, D., & Demirci, A. (2013). *Current and future trends for biofilm reactors for fermentation processes*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 1–14. doi:10.3109/07388551.2013.793170
- Esteves, E. M. M., Herrera, A. M. N., Esteves, V. P. P., & Morgado, C. do R. V. (2019). Life cycle assessment of manure biogas production: A review. *Journal of Cleaner Production*, 219, 411–423. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.02.091>
- El-Bishtawi, R., & Haimour, N. (2004). *Claus recycle with double combustion process*. *Fuel Processing Technology*, 86(3), 245–260. doi:10.1016/j.fuproc.2004.04.001
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). *Insights into the modeling of adsorption isotherm systems*. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 2–10. doi:10.1016/j.cej.2009.09.013
- Feng, C., Tollin, G., & Enemark, J. H. (2007). Sulfite oxidizing enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(5), 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.03.006>
- Fernández, M., Ramírez, M., Gómez, J. M., & Cantero, D. (2014). *Biogas biodesulfurization in an anoxic biotrickling filter packed with open-pore polyurethane foam*. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 529–535. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.10.046
- Favvas, E. P., Tsanaktsidis, C. G., Sapalidis, A. A., Tzilantonis, G. T., Papageorgiou, S. K., & Mitropoulos, A. C. (2016). *Clinoptilolite, a natural zeolite material: Structural characterization and performance evaluation on its dehydration properties of hydrocarbon-based fuels*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 225, 385–391. doi:10.1016/j.micromeso.2016.01.021
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2006. Livestock's long shadow: Environmental issues and options. Available online at <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.htm>



- Fagbohunge, M. O., Herbert, B. M. J., Hurst, L., Ibeto, C. N., Li, H., Usmani, S. Q., & Semple, K. T. (2017). The challenges of anaerobic digestion and the role of biochar in optimizing anaerobic digestion. *Waste Management*, 61, 236–249. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2016.11.028>
- Gaur, M., Vasudeva, A., Singh, A., Sharma, V., Khurana, H., Negi, R. K., ... & Singh, Y. (2019). Comparison of DNA Extraction Methods for Optimal Recovery of Metagenomic DNA from Human and Environmental Samples. *Indian journal of microbiology*, 59(4), 482-489. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00832-y>
- Giordano, C., Spennati, F., Mori, G., Munz, G., & Vannini, C. (2018). The microbial community in a moving bed biotrickling filter operated to remove hydrogen sulfide from gas streams. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 399–407. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2018.04.001>
- González S. (2007). Determinación de parámetros cinéticos y de inhibición por sulfuro en un reactor UASB sulfato-reductor. Tesis de maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Maestría en Ciencias Ambientales. Sn Luis Potosí, México. 57p. <http://hdl.handle.net/11627/73>
- Govil, T., Sharma, W., Chauhan, N., Kumar, S., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019). “MINES” method for genomic DNA extraction from deep biosphere biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 105730. doi:10.1016/j.mimet.2019.105730
- Hernández, M., Rojas, F., Corona, L., Lara, V., Portillo, R., Salgado, M., Petranoskii, V., (2005). Evaluación de la porosidad de zeolitas naturales por medio de curvas diferenciales de adsorción. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(2),71-81.[fecha de Consulta 7 de Abril de 2020]. ISSN: 0188-4999. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=370/37021203>
- Hernández, M. A., & Rojas, F., & Lara, V. H., & Portillo, R., & Castelán, R., & Pérez, G., & Salas, R. (2010). Estructura porosa y propiedades estructurales de mordenita y clinoptilolita. *Superficies y vacío*, 23(),51-56.[fecha de Consulta 9 de Abril de 2020]. ISSN: 1665-3521. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=942/94248264011>
- Henshaw, P. F., & Zhu, W. (2001). Biological conversion of hydrogen sulphide to elemental sulphur in a fixed-film continuous flow photo-reactor. *Water Research*, 35(15), 3605–3610. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00082-3)
- Filho, J. L. R. P., Sader, L. T., Damianovic, M. H. R. Z., Foresti, E., & Silva, E. L. (2010). Performance evaluation of packing materials in the removal of hydrogen sulphide in gas-phase biofilters: Polyurethane foam, sugarcane bagasse, and coconut fibre. *Chemical Engineering Journal*, 158(3), 441–450. doi:10.1016/j.cej.2010.01.014



FIRCO-SAGARPA. Reporte de inteligencia tecnológica, combustibles (2016).

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/329908/Reporte_Inteligencia_Tecnologica_BIOGAS_Final.pdf

Henshaw, P. F., & Zhu, W. (2001). Biological conversion of hydrogen sulphide to elemental sulphur in a fixed-film continuous flow photo-reactor. *Water Research*, 35(15), 3605–3610. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00082-3)

Hou, J., Li, M., Xia, T., Hao, Y., Ding, J., Liu, D., Liu, H. (2016). Simultaneous removal of ammonia and hydrogen sulfide gases using biofilter media from the biodehydration stage and curing stage of composting. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20628–20636. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7238-4>

Habeeb, O. A., Kanthasamy, R., Saber, S. E. M., & Olalere, O. A. (2019). Characterization of agriculture wastes based activated carbon for removal of hydrogen sulfide from petroleum refinery waste water. *Materials Today: Proceedings*. doi:10.1016/j.matpr.2019.09.194

Jones, K. (2014). Case studies of hydrogen sulphide occupational exposure incidents in the UK. *Toxicology Letters*, 231(3), 374–377. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2014.08.005>

Juntranapaporn, J., Vikromvarasiri, N., Soralump, C., & Pisutpaisal, N. (2019). Hydrogen sulfide removal from biogas in biotrickling filter system inoculated with *Paracoccus pantotrophus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.03.069>

Janssen, A. J. H., Meijer, S., Bontsema, J., & Lettinga, G. (1998). Application of the redox potential for controlling a sulfide oxidizing bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(2), 147–155. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981020\)60:2<147::AID-BIT2>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981020)60:2<147::AID-BIT2>3.0.CO;2-N)

Kailasa, S. K., Koduru, J. R., Vikrant, K., Tsang, Y. F., Singhal, R. K., Hussain, C. M., & Kim, K.-H. (2019). Recent progress on solution and materials chemistry for the removal of hydrogen sulfide from various gas plants. *Journal of Molecular Liquids*, 111886. doi:10.1016/j.molliq.2019.111886

Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*, 35, 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.07.002>

Kurella, S., Bhukya, P. K., & Meikap, B. C. (2017). Removal of H₂S pollutant from gasifier syngas by a multistage dual-flow sieve plate column wet scrubber. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(6), 515–523. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1281690>



- Kim, J. H., Rene, E. R., & Park, H. S. (2008). *Biological oxidation of hydrogen sulfide under steady and transient state conditions in an immobilized cell biofilter*. *Bioresource Technology*, 99(3), 583–588. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.028
- Kida, K., Morimura, S., Sonoda, Y., Obe, M., & Kondo, T. (1990). Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69(6), 354-359.
- Li, K.-T., & Chi, Z.-H. (2001). *Selective oxidation of hydrogen sulfide on rare earth orthovanadates and magnesium vanadates*. *Applied Catalysis A: General*, 206(2), 197–203. doi:10.1016/s0926-860x(00)00603-7
- Llonch, P., Haskell, M. J., Dewhurst, R. J., & Turner, S. P. (2016). *Current available strategies to mitigate greenhouse gas emissions in livestock systems: an animal welfare perspective*. *Animal*, 11(02), 274–284. doi:10.1017/s1751731116001440
- Lin, S., Mackey, H. R., Hao, T., Guo, G., van Loosdrecht, M. C. M., & Chen, G. (2018). Biological sulfur oxidation in wastewater treatment: A review of emerging opportunities. *Water Research*, 143, 399–415. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.051>
- Liu, H., Chang, L., Liu, W., Xiong, Z., Zhao, Y., & Zhang, J. (2019). Advances in mercury removal from coal-fired flue gas by mineral adsorbents. *Chemical Engineering Journal*, 122263. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122263>
- Lora Grando, R., de Souza Antune, A. M., da Fonseca, F. V., Sánchez, A., Barrena, R., & Font, X. (2017). Technology overview of biogas production in anaerobic digestion plants: A European evaluation of research and development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.079>
- Lupitskyy, R., Alvarez-Fonseca, D., Herde, Z. D., & Satyavolu, J. (2018). In-situ prevention of hydrogen sulfide formation during anaerobic digestion using zinc oxide nanowires. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 110–118. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2017.11.048>
- Lestari, R. A. S., Sediawan, W. B., Syamsiah, S., Sarto, & Teixeira, J. A. (2016). Hydrogen sulfide removal from biogas using a salak fruit seeds packed bed reactor with sulfur oxidizing bacteria as biofilm. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(2), 2370–2377. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2016.04.014>
- López-Aguilar, H., Huerta-Reynoso, E., Gómez, J., Olivarez-Ramírez, J., Duarte-Moller, A., & Pérez-Hernández, A. (2016). Life cycle assessment of regional brick manufacture. *Materiales de Construcción*, 66(322), e085. doi:<http://dx.doi.org/10.3989/mc.2016.02315>
- Li, G. L., Zhou, C. H., Fiore, S., & Yu, W. H. (2019). *Interactions between microorganisms and clay minerals: New insights and broader applications*. *Applied Clay Science*, 177, 91–113. doi:10.1016/j.clay.2019.04.025



- Lee, E. Y., Lee, N. Y., Cho, K.-S., & Ryu, H. W. (2006). *Removal of hydrogen sulfide by sulfate-resistant Acidithiobacillus thiooxidans AZ11. Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(4), 309–314. doi:10.1263/jbb.101.309
- Liamleam, W., & Annachhatre, A. P. (2007). *Electron donors for biological sulfate reduction. Biotechnology Advances*, 25(5), 452–463. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.05.002
- Meier, D. V, Pjevac, P., Bach, W., Hourdez, S., Girguis, P. R., Vidoudez, C., ... Meyerdierks, A. (2017). Niche partitioning of diverse sulfur-oxidizing bacteria at hydrothermal vents. *The ISME Journal*, 11(7), 1545–1558. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.37>
- Monge-Amaya, O., Valenzuela-García, J. L., Félix, E. A., Certucha-Barragán, M. T., Leal-Cruz, A. L., & Almendariz-Tapia, F. J. (2013). *Biosorptive Behavior of Aerobic Biomass Biofilm Supported on Clinoptilolite Zeolite for the Removal of Copper. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review*, 34(6), 422–428. doi:10.1080/08827508.2012.705192
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., & Angeles de la la Rubia, M. (2012). *Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. Applied Clay Science*, 58, 125–133. doi:10.1016/j.clay.2012.01.013
- Merino, A. (2017). [Ecodiseño de un sistema de remoción de sulfuro de hidrógeno en un biodigestor pecuario](http://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/830). Tesis de maestría en Ciencias y Tecnología Ambiental, Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), Chihuahua, Chih. <http://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1004/830>
- Milán, Z., Montalvo, S., Ilangovan, K., Monroy, O., Chamy, R., Weiland, P., ... Borja, R. (2010). *The impact of ammonia nitrogen concentration and zeolite addition on the specific methanogenic activity of granular and flocculent anaerobic sludges. Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(7), 883–889. doi:10.1080/10934521003709099
- Montes-Luna, A. D. J., Fuentes-Lopez, N. C., Castruita-de-Leon, G., Perez-Camacho, O., Garcia Rodriguez, S. P., & Perera-Mercado, Y. A. (2019). Modification of zeolite NaY and preparation of hybrid membranes for the separation of mixed gases. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 18(1), 325-337. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/MontesL>
- Malone Rubright, S. L., Pearce, L. L., & Peterson, J. (2017). Environmental toxicology of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide*, 71, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.011>
- Mantecón, E. B. (2018). *Biotechnología Ambiental, ¿ la cenicienta de la Biotechnología?. Ambiociencias*, (12), 81-94.
- Morono, Y., Terada, T., Hoshino, T., & Inagaki, F. (2014). *Hot-Alkaline DNA Extraction Method for Deep-Subseafloor Archaeal Communities. Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1985–1994. doi:10.1128/aem.04150-13



- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Montes-Luna, A. D. J., Fuentes-López, N. C., Perera-Mercado, Y. A., Pérez-Camacho, O., Castruita-de León, G., García-Rodríguez, S. P., & García-Zamora, M. (2015). Caracterización de clinoptilolita natural y modificada con Ca²⁺ por distintos métodos físico-químicos para su posible aplicación en procesos de separación de gases. *Superficies y vacío*, 28(1), 5-11.
- Muyzer, G., Stams, A.J., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 441–454.
- M.T. Madigan, J.M. Martinko, Brock Biology of Microorganisms, 11th edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2006.
- Nielsen AH, Vollertsen J, Hvitved-Jacobsen T. Chemical sulfide oxidation of wastewater—effects of pH and temperature. *Water Sci Technol* 2004;50:185–92.
- Nagendranatha Reddy, C., Bae, S., & Min, B. (2019). *Biological removal of H₂S gas in a semi-pilot scale biotrickling filter: Optimization of various parameters for efficient removal at high loading rates and low pH conditions.* *Bioresource Technology*, 121328. doi:10.1016/j.biortech.2019.121328
- Nassar, I. M., Noor El-Din, M. R., Morsi, R. E., El-Azeim, A. A., & Hashem, A. I. (2016). *Eco Friendly nanocomposite materials to scavenge hazard gas H₂S through fixed-bed reactor in petroleum application.* *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 65, 101–112. doi:10.1016/j.rser.2016.06.019
- Nozue, Y., Amako, Y., Kawano, R., Mizukane, T., & Nakano, T. (2012). Insulating state and metallic phase transition of heavily sodium-doped low-silica X (LSX) zeolites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 73(12), 1538–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jpics.2012.03.012>
- Oyekola, O. O., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. L. (2010). *Kinetic analysis of biological sulphate reduction using lactate as carbon source and electron donor: Effect of sulphate concentration.* *Chemical Engineering Science*, 65(16), 4771–4781. doi:10.1016/j.ces.2010.05.014
- Ozekmekci, M., Salkic, G., & Fellah, M. F. (2015). Use of zeolites for the removal of H₂S: A mini-review. *Fuel Processing Technology*, 139, 49–60. <https://doi.org/10.1016/J.FUPROC.2015.08.015>
- Pirolli, M., da Silva, M. L. B., Mezzari, M. P., Michelon, W., Prandini, J. M., & Moreira Soares, H. (2016). *Methane production from a field-scale biofilter designed for desulfurization of biogas stream.* *Journal of Environmental Management*, 177, 161–168. doi:10.1016/j.jenvman.2016.04.013



- Pourzolfaghar, H., & Ismail, M. H. S. (2013). Study of H₂S Removal Efficiency of Virgin Zeolite in POME Biogas Desulfurization at Ambient Temperature and Pressure. In *Developments in Sustainable Chemical and Bioprocess Technology* (pp. 295–301). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6208-8_35
- Paolini, V., Petracchini, F., Guerriero, E., Bencini, A., & Drigo, S. (2015). *Biogas cleaning and upgrading with natural zeolites from tuffs*. *Environmental Technology*, 37(11), 1418–1427. doi:10.1080/09593330.2015.1118557
- Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.007>
- Pokrovsky, O. S., Martinez, R. E., Golubev, S. V., Kompantseva, E. I., & Shirokova, L. S. (2008). *Adsorption of metals and protons on Gloeocapsa sp. cyanobacteria: A surface speciation approach*. *Applied Geochemistry*, 23(9), 2574–2588. doi:10.1016/j.apgeochem.2008.05.007
- Poirier, S., Madigou, C., Bouchez, T., & Chapleur, O. (2017). *Improving anaerobic digestion with support media: Mitigation of ammonia inhibition and effect on microbial communities*. *Bioresource Technology*, 235, 229–239. doi:10.1016/j.biortech.2017.03.099
- Pampillon-Gonzalez, L., Luna-Guido, M., Ruíz-Valdeviezo, V. M., Franco-Hernandez, O., Fernandez-Luqueno, F., Paredes-Lopez, O., ... & Dendooven, L. (2017). 489801. Greenhouse Gas Emissions and Growth of Wheat Cultivated in Soil Amended with Digestate from Biogas Production. *Pedosphere*, 27(2), 318-327.
- Puchana-Rosero, M. J., Adebayo, M. A., Lima, E. C., Machado, F. M., Thue, P. S., Vaggetti, J. C. P., ... Gutterres, M. (2016). *Microwave-assisted activated carbon obtained from the sludge of tannery-treatment effluent plant for removal of leather dyes*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 504, 105–115. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.05.059
- Pikaar, I., Likosova, E. M., Freguia, S., Keller, J., Rabaey, K., & Yuan, Z. (2014). *Electrochemical Abatement of Hydrogen Sulfide from Waste Streams*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1555–1578. doi:10.1080/10643389.2014.966419
- Postgate J.R., *The Sulphate Reducing Bacteria*, 2nd ed., University Press, Cambridge, 1984.
- Pramanik, S. K., Suja, F. B., Zain, S. M., & Pramanik, B. K. (2019). The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. *Bioresource Technology Reports*, 8, 100310. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100310>



- Piśtyk, S., & Paszewski, A. (2009). Sulfate permeases phylogenetic diversity of sulfate transport. *Acta Biochimica Polonica*, 56(3).
- Rodríguez P., Juan M., García-López, Juan C., Peña-Avelino, Luz Y., Rendón-Huerta, Juan A., González-González, Cecilia, & Tristán-Patiño, Flor. (2012). Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de América. *Agrociencia*, 46(4), 359-370. Recuperado en 31 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000400004&lng=es&tlng=es.
- Rattanapan, C., Boonsawang, P., & Kantachote, D. (2009). Removal of H₂S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. *Bioresource technology*, 100(1), 125-130.
- Rabbani, K. A., Charles, W., Kayaalp, A., Cord-Ruwisch, R., & Ho, G. (2016). Biofilter for generation of concentrated sulphuric acid from H₂S. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16781–16789. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6858-z>
- Reyes-Carmona, A., Soriano, M. D., López Nieto, J. M., Jones, D. J., Jiménez-Jiménez, J., Jiménez-López, A., & Rodríguez-Castellón, E. (2013). *Iron-containing SBA-15 as catalyst for partial oxidation of hydrogen sulfide*. *Catalysis Today*, 210, 117–123. doi:10.1016/j.cattod.2012.11.016
- Rajamanickam, R., & Baskaran, D. (2017). Biodegradation of gaseous toluene with mixed microbial consortium in a biofilter: steady state and transient operation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(12), 1801–1812. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1834-7>
- Ramírez-Sáenz, D., Zarate-Segura, P. B., Guerrero-Barajas, C., & García-Peña, E. I. (2009). *H₂S and volatile fatty acids elimination by biofiltration: Clean-up process for biogas potential use*. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1272–1281. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.129
- Rattanapan, C., Boonsawang, P., & Kantachote, D. (2009). *Removal of H₂S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater*. *Bioresource Technology*, 100(1), 125–130. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.049
- Rybarczyk, P., Szulczyński, B., Gębicki, J., & Hupka, J. (2019). Treatment of malodorous air in biotrickling filters: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 141, 146–162. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2018.10.014>
- Rochelle, G. T. (2009). *Amine Scrubbing for CO₂ Capture*. *Science*, 325(5948), 1652–1654. doi:10.1126/science.1176731



- San-Valero, P., Peña-roja, J. M., Javier Álvarez-Hornos, F., Buitrón, G., Gabaldón, C., & Quijano, G. (2019). *Fully aerobic bioscrubber for the desulfurization of H₂S-rich biogas*. *Fuel*, 241, 884–891. doi:10.1016/j.fuel.2018.12.098
- Singh, K., Singh, R. S., Rai, B. N., & Upadhyay, S. N. (2010). Biofiltration of toluene using wood charcoal as the biofilter media. *Bioresource Technology*, 101(11), 3947–3951. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.025>
- Sánchez-Ruíz, A., Robles-Gutiérrez, I., & Espejel-Ayala, F. (2018). Preparation of zeolitic material using natural clinoptilolite for CO₂ capture. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(2), 573-585.
<https://doi.org/10.24275/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n2/Sanchez>
- Soreanu, G., Falletta, P., Béland, M., Edmonson, K., & Seto, P. (2008). Study on the performance of an anoxic biotrickling filter for the removal of hydrogen sulphide from biogas. *Water Quality Research Journal*, 43(2-3), 211-218
- Singh, K., Singh, R. S., Rai, B. N., & Upadhyay, S. N. (2010). Biofiltration of toluene using wood charcoal as the biofilter media. *Bioresource Technology*, 101(11), 3947–3951. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.025>
- Singh, K., Giri, B. S., Sahi, A., Geed, S. R., Kureel, M. K., Singh, S., Singh, R. S. (2017). Biofiltration of xylene using wood charcoal as the biofilter media under transient and high loading conditions. *Bioresource Technology*, 242, 351–358. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.02.085>
- Shareefdeen, Z., Herner, B., Webb, D., & Wilson, S. (2003). *Hydrogen sulfide (H₂S) removal in synthetic media biofilters*. *Environmental Progress*, 22(3), 207–213. doi:10.1002/ep.670220319
- Shareefdeen, Z. (2015). Hydrogen sulfide (H₂S) removal using schist packings in industrial biofilter applications. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 15–19. <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0349-z>
- Sahota, S., Shah, G., Ghosh, P., Kapoor, R., Sengupta, S., Singh, P., Thakur, I. S. (2018). Review of trends in biogas upgradation technologies and future perspectives. *Bioresource Technology Reports*, 1, 79–88. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2018.01.002>
- Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). *Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries*. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73–94. doi:10.1016/j.bej.2008.12.011
- Thanakunpaisit, N., Jantarachat, N., & Onthong, U. (2017). Removal of Hydrogen Sulfide from Biogas using Laterite Materials as an Adsorbent. *Energy Procedia*, 138, 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2017.10.215>



- Tian, H., Gao, P., Chen, Z., Li, Y., Li, Y., Wang, Y., ... & Ma, T. (2017). Compositions and abundances of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms in water-flooded petroleum reservoirs with different temperatures in China. *Frontiers in microbiology*, 8, 143.
- Thanakunpaisit, N., Jantarachat, N., & Onthong, U. (2017). Removal of Hydrogen Sulfide from Biogas using Laterite Materials as an Adsorbent. *Energy Procedia*, 138, 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/J.EGYPRO.2017.10.215>
- Ventura Spagnolo, E., Romano, G., Zuccarello, P., Laudani, A., Mondello, C., Argo, A., ... Barbera, N. (2019). Toxicological investigations in a fatal and non-fatal accident due to hydrogen sulphide (H₂S) poisoning. *Forensic Science International*, 300, e4–e8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.04.026>
- Vikromvarasiri, N., Champreda, V., Boonyawanich, S., & Pisutpaisal, N. (2017). Hydrogen sulfide removal from biogas by biotrickling filter inoculated with *Halothiobacillus neapolitanus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(29), 18425–18433. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2017.05.020>
- Vekariya, R. L. (2017). A review of ionic liquids: Applications towards catalytic organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, 227, 44–60. doi:10.1016/j.molliq.2016.11.123
- Vikrant, K., Kailasa, S. K., Tsang, D. C. W., Lee, S. S., Kumar, P., Giri, B. S., ... Kim, K.-H. (2018). Biofiltration of hydrogen sulfide: Trends and challenges. *Journal of Cleaner Production*, 187, 131–147. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.03.188>
- Watsuntorn, W., Ruangchainikom, C., Rene, E. R., Lens, P. N., & Chulalaksananukul, W. (2019). Comparison of sulphide and nitrate removal from synthetic wastewater by pure and mixed cultures of nitrate-reducing, sulphide-oxidizing bacteria. *Bioresource technology*, 272, 40-47.
- Watsuntorn, W., Khanongnuch, R., Chulalaksananukul, W., Rene, E. R., & Lens, P. N. (2020). Resilient performance of an anoxic biotrickling filter for hydrogen sulphide removal from a biogas mimic: Steady, transient state and neural network evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 249, 119351.
- Wang, H., Larson, R. A., & Runge, T. (2019). Impacts to hydrogen sulfide concentrations in biogas when poplar wood chips, steam treated wood chips, and biochar are added to manure-based anaerobic digestion systems. *Bioresource Technology Reports*, 7, 100232. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2019.100232>



- Wahono, S. K., Suwanto, A., Prasetyo, D. J., Hernawan, Jatmiko, T. H., & Vasilev, K. (2019). *Plasma activation on natural mordenite-clinoptilolite zeolite for water vapor adsorption enhancement*. *Applied Surface Science*. doi:10.1016/j.apsusc.2019.04.033
- Wang, Y., Liu, X., Kraslawski, A., Gao, J., & Cui, P. (2019). *A novel process design for CO₂ capture and H₂S removal from the syngas using ionic liquid*. *Journal of Cleaner Production*, 213, 480–490. doi:10.1016/j.jclepro.2018.12.180
- Wang, S., Nam, H., & Nam, H. (2019). Utilization of cocoa activated carbon for trimethylamine and hydrogen sulfide gas removals in a confined space and its techno-economic analysis and life-cycle analysis. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, e13241. doi:10.1002/ep.13241
- Wisniewski K, di BA, Munz G, Oleszkiewicz JA, MakiniaJ, Kinetic characterization of hydrogen sulfide inhibition of suspended anammoxbiomass from a membrane bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*(2018),<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.015>
- Wade, B. D., & Garcia-Pichel, F. (2003). *Evaluation of DNA Extraction Methods for Molecular Analyses of Microbial Communities in Modern Calcareous Microbialites*. *Geomicrobiology Journal*, 20(6), 549–561. doi:10.1080/713851168
- Xue, S., Song, J., Wang, X., Shang, Z., Sheng, C., Li, C., ... Liu, J. (2020). *A systematic comparison of biogas development and related policies between China and Europe and corresponding insights*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109474. doi:10.1016/j.rser.2019.109474
- Zhang, F., Zhang, X., Jiang, G., Sun, Y., Hao, Z., Liu, X., & Qu, S. (2019). *Selective oxidation of H₂S over Fe supported on Zr-intercalated Laponite clay mesoporous composite catalysts at low temperature*. *Catalysis Today*. doi:10.1016/j.cattod.2019.08.026
- Zhang, X., Tang, Y., Qu, S., Da, J., & Hao, Z. (2015). *H₂S-Selective Catalytic Oxidation: Catalysts and Processes*. *ACS Catalysis*, 5(2), 1053–1067. doi:10.1021/cs501476p
- Zhang, C., Li, B. F., & Jiang, Y. H. (2013). Full-Scale Study to Treat Hydrogen Sulfide with Biofilter. *Applied Mechanics and Materials*, 443, 629–633. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.443.629>
- Zhu, R., Li, S., Bao, X., & Dumont, É. (2017). Comparison of biological H₂S removal characteristics between a composite packing material with and without functional microorganisms. *Scientific Reports*, 7(1), 42241. <https://doi.org/10.1038/srep42241>



- Zendelska, A., Golomeova, M., Golomeov, B., & Krstev, B. (2018). *Removal of Zinc Ions from Acid Aqueous Solutions and Acid Mine Drainage Using Zeolite-Bearing Tuff. Mine Water and the Environment*. doi:10.1007/s10230-018-0560-y
- Zhang, L., Loh, K. C., Lim, J. W., & Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 100, 110-126.



Anexos

I. Medio de cultivo sulfato-reductor

El medio de cultivo sulfato reductor, base agua, está constituido por las siguientes tres soluciones estériles (121°C/15psi/15 min):

Solución I: 3.92 g/100 mL de sal de Mohr [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$].

Solución II: 0.05 g/100 mL ascorbato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6$).

Nota: las soluciones I y II se filtran con papel filtro de 0.45 μm

Solución III: 0.05 g/L lactato de sodio ($\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$) 60%, 2.0 g/L de Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 2.0 g/L de Peptona, 1.0 g/L de extracto de carne, 0.5 g/L de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y 0.1 g/L de cloruro de calcio (CaCl_2).

Una vez que se enfría la solución III, se agregan 0.01 mL de la solución I y de la solución II por cada 10 mL a la solución III.

Nota: Para evitar la oxidación del lactato de sodio y la solución I, se agregan a la solución III cuando esta se encuentre fría.

II. SEM: soluciones para el tratamiento de muestras biológicas

Glutaraldehído al 5% (solución fijadora)

Mezclar 0.250 mL de glutaraldehído concentrado con 4.75 mL de agua destilada estéril. Conservar la mezcla entre 2-4 °C hasta su uso.

Etanol al 30%, 40%, 50%, 70%, 90% (solución deshidratadora)

Para la preparación de las soluciones de etanol, se empleó agua destilada estéril. Conservar la mezcla entre 2-4°C hasta su uso.

Solución de glicerol al 70% para la conservación del consorcio bacteriano

Diluir 7 mL de glicerol grado biología molecular en 3 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 minutos.