



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**“BACTERIAS METANOGÉNICAS EN SUELO CON INFLUENCIA DE
LIXIVIADOS PROVENIENTES DE RELLENO SANITARIO”**

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis de Maestría

Para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Ambientales

Presenta:

Erika Cristell Martínez Ramón

Director:

Dra. Sughey López Martínez

Villahermosa, Tabasco, México

Febrero, 2020.



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

FEBRERO 07 DE 2020

**C. ERIKA CRISTELL MARTÍNEZ RAMÓN
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"BACTERIAS METANOGENICAS EN SUELO CON INFLUENCIA DE LIXIVIADOS PROVENIENTES DE RELLENO SANITARIO"**, asesorado por la Dra. Sugely López Martínez, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por el Dr. José Rodolfo Velázquez Martínez, Dra. Ana Rosa Rodríguez Luna, Dr. Eduardo Salvador López Hernández y Dra. Liliana Pampillón González.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

CARTA AUTORIZACIÓN

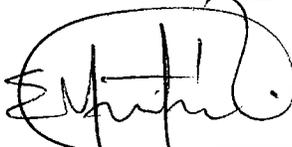
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“BACTERIAS METANOGÉNICAS EN SUELO CON INFLUENCIA DE LIXIVIADOS PROVENIENTES DE RELLENO SANITARIO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día 07 de febrero del dos mil veinte.

AUTORIZO



ERIKA CRISTELL MARTÍNEZ RAMÓN

DEDICATORIA

Al gran roble, a mi gran heroína de cabellos plateados...inicié esto pensando en darle un motivo más de alegría. Desafortunadamente se fue antes de que yo llegara a la meta. Mi fuerza provendrá siempre del ejemplo de una gran mujer que ha sido mis raíces. A tí abuelita... Mi mariquita.

A mi madre, que ha superado tantas pruebas y protegerá a sus hijos aunque usen bastón. Entendí que todo el dolor que viviste y me tocó atestiguar fue para hacerme fuerte, que yo te elegí antes de nacer porque era una misión para que ambas creyéramos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fuerzas, familia, trabajo, amigos y todo el amor que un padre bondadoso no se cansa de dar.

A la Dra. Sugey López Martínez, agradezco por brindarme la confianza, las herramientas, el apoyo, la paciencia en todo momento y facilitar el duro proceso de ser profesionista y jefe de familia.

A la Beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de la convocatoria 291237 CONACYT-SENER Hidrocarburos 2017, Tipo B, segundo periodo con CVU. No. 859984, otorgado en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT).

Al Dr. José Quinatzin García Maldonado por permitirme trabajar en el laboratorio de patología acuática del CINVESTAV Mérida y a la MCA. Lucero Vázquez Cruz por permitirme practicar en el laboratorio de microbiología de la UJAT.

A mi padre y hermanos que se preocupan por mí, por ser ese lugar al que siempre regreso, por ser mi refugio con calor de hogar.

A ese grupo de amigos de posgrado bastante disperso ideológicamente que encontré unión entre tantas diferencias. Porque pese a que haya distancia siempre están presentes.

A la empresa Promotora Ambiental S. A., de C.V. por permitirme entrar a sus instalaciones para la tomas de muestra.

I. CONTENIDO

CAPÍTULO 1	7
1. INTRODUCCION	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. ANTECEDENTES	12
4. OBJETIVOS.....	16
4a. Objetivo General:.....	16
4b. Objetivos Específicos:.....	16
CAPÍTULO 2	17
5. ARTICULO: METHANOGENIC BACTERIA IN SOIL FROM LEACHATE SOILS FROM LANDFILLS.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSIÓN	25
CAPÍTULO 3	29
6. CONCLUSIONES.....	30
7. RECOMENDACIONES	30
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31
8. ANEXOS.....	35

Tabla de figuras

Fig. 1. Top 20 con la clasificación de resultados por nivel taxonómico del relleno de Villahermosa.	23
Fig. 2. Top 20 con la clasificación de resultados por nivel taxonómico del Pozo 104 de León, Guanajuato. ...	24
Fig. 3. Top 20 con la clasificación de resultados por nivel taxonómico del Pozo 81 de León, Guanajuato.	25
Fig. 4 Diagrama resumen del método de trabajo.	35
Fig. 5 Relleno Sanitario de Villahermosa, Tabasco.	35
Fig. 6 Relleno sanitario de León, Guanajuato.	36
Fig. 7 Colecta de Lixiviados en León, Guanajuato.	36
Fig. 8 Colecta de Lixiviados en León, Guanajuato.	37
Fig. 10 Extracción de adn de las muestras de león, guanajuato.	39
Fig. 11 Extracción de adn de las muestras de león, guanajuato.	39

Tabla de Cuadros

Tabla 1. Datos de Gases y Salinidad en los pozos de León, Guanajuato.	23
Tabla 2. Índice de Diversidad en los diferentes Pozos.	25
Tabla 3.- Géneros diagnosticados en los diferentes pozos.	39
Tabla 4.- Especies diagnosticadas en los diferentes pozos.	40

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCION

Un relleno sanitario se define como una obra de infraestructura que involucra métodos y obras de ingeniería para la disposición final de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) y Residuos de Manejo Especial (RME) con el fin de controlar los impactos ambientales (NOM-083-SEMARNAT-2003).

Los residuos al ser depositados en los rellenos, inician su descomposición mediante una serie de procesos químicos complejos en presencia ó ausencia de Oxígeno. Los productos principales de esta descomposición son los líquidos lixiviados y los gases (ATSDR, 2001)

Los líquidos lixiviados se forman por la infiltración de líquidos (como p. e. agua de lluvia) a través de las sustancias en proceso de descomposición. El líquido, al fluir disuelve algunas sustancias y arrastra partículas y otros compuestos químicos. Los ácidos orgánicos como el ácido acético, láctico o fórmico, contenidos en el lixiviado, de acuerdo a ciertas etapas de la descomposición disuelven los metales en los residuos dejándolos disponibles en el lixiviado (Friends of the Earth, 1996).

Si bien en los lixiviados se encuentran metales pesados, el principal componente y en mayor proporción de los gases emanados en los rellenos sanitarios es el metano, seguido por el dióxido de carbono ambos unidos en una mezcla denominada Biogás. (Environmental Research Foundation, 1998)

La producción de metano (CH₄) se debe a la actuación de microorganismos como bacterias, que mediante procesos biológicos degradan los residuos, emitiendo éste y otros gases, liberando otras sustancias químicas. El metano es uno de los seis gases de efecto invernadero regulados por el Protocolo de Kyoto. Este gas atrapa 21 veces más el calor que el dióxido de carbono (CO₂), considerado el principal GEI (Altamirano, Freire y Gallegos, 2012).

La producción de biogás actualmente es uno de los procesos ambientales que generan energías limpias, debido a que utilizan materia orgánica para su producción. A nivel mundial, los rellenos sanitarios ocupan el tercer lugar en producción de energía eléctrica (Marland *et al.*, 2003)

De acuerdo a Arvizu y Huacuz (2003) no es cuestionable la posibilidad técnica de convertir los gases de un relleno sanitario en electricidad; existe la tecnología comercial, pero su aplicación aún no está difundida en nuestro país. Los rellenos sanitarios que se estudiaron aquí se originan de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) por lo que cabe la

necesidad de conocer las bacterias metanogénicas que puedan estar presentes para un futuro inóculo nativo del biorreactor.

La importancia de identificar los consorcios de bacterias metanogénicas existentes en el área y que también fijen nitrógeno reside en el hecho de que la acumulación de amonio y ácidos grasos volátiles denominados inhibidores traen como consecuencia procesos ineficaces en la producción de metano, los microorganismos son la parte medular de los digestores debido a que la digestión anaerobia es un proceso bioquímico que involucra una gran variedad de grupos microbianos (Wang *et al.*, 2017).

En los rellenos sanitarios de Villahermosa, Tabasco y León, Guanajuato pertenecientes a a empresa Promotora Ambienta S. A de C.V. (PASA) se emplea a la planta Vetiver (*Chrosopogon zizanioides*) cuyas raíces pueden alcanzar 5 m de profundidad con la intención de traslocar los metales pesados del suelo de las celdas. En el suelo y la laguna de oxidación de ambos rellenos también pueden existir bacterias metanogénicas que se pueden ubicar en la fase anóxica del lixiviado con emisión de gas de diferente calidad, ya que el relleno de León, Guanajuato ya se encuentra en etapa madura de producción de gas para cogeneración mientras que en el relleno sanitario de Villahermosa, las celdas son recientes con emisiones de gas (10-15% de CH₄) aún no aprovechables para producción.

Por tanto, el objetivo del presente proyecto es identificar los grupos microbianos presentes en lixiviados, sedimento de dos rellenos sanitarios ubicados en Villahermosa, Tabasco y León, Guanajuato. La identificación de estos consorcios permitirá a los administradores de los rellenos sanitarios usarlos como bioestimuladores para potenciar la producción de biogás en un generador eléctrico.

2. JUSTIFICACIÓN

Álvarez (2016) en el relleno sanitario de León, Guanajuato y Morales (2016) en el relleno sanitario de Villahermosa identifican en los lixiviados y en suelo rizosférico de vetiver los metales pesados: As, Cd, Cu, Li, Mn, Ni, Pb y Tl. Concluyendo Morales (2016) que hace falta analizar las interacciones microbianas asociadas a la rizósfera de vetiver.

Por otra parte, FIRCO (Fideicomiso de Riesgo Compartido) reporta que la producción de biogás en México 2010 alcanza una cifra de 721 biodigestores, de los cuales el 78% son financiados bajo el subsidio del Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL) y 4 biodigestores en la iniciativa metano a mercados. Para plantas de biogás a partir de rellenos sanitarios, el caso más importante (primero a nivel nacional y latinoamérica) es el de Monterrey, Nuevo León inaugurado el 22 de septiembre de 2003 con un financiamiento de cinco millones de dólares por parte del fondo mundial para el medio ambiente a través del Banco Mundial. (Fuente: Red Mexicana de bionergía. <http://rembio.org.mx>).

Sin embargo, menciona Arvizu y Huacuz (2003) que pese al proyecto de Monterrey y a su capacidad nominal de 8MW no se compara con el beneficio si toda la basura actualmente fuera confinada en rellenos sanitarios, la capacidad de generación eléctrica por medio del biogás resultante llegaría a 400 MW para todo el país tal y como se plantea en el relleno sanitario de León, Guanajuato.

Otro aspecto de importancia social es el creciente interés por el Gobierno Federal por la producción de tecnologías limpias y energías alternativas a través del Plan Nacional de Desarrollo 2013-2018, del cual se deriva a partir de las estrategias transversales el Programa para democratizar la productividad 2013-2018 publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de agosto de 2013, donde menciona que para combatir el uso ineficiente de recursos energéticos se observan 2 estrategias: promover instrumentos financieros que contribuyen al crecimiento verde y promover un mayor uso de energías limpias.

La estrategia nacional de energía 2013-2027 menciona que el consumo de energía en el país de 2000 a 2011 aumentó en un promedio anual de 2.08% superior al PIB (1.82%), fue necesario invertir en plantas de “ciclos combinados” por lo que la generación de energía eléctrica en el país se basa en un 50% de gas natural. Aunado a esto existe un mandato legal de generar el 35% de la electricidad en el país a partir de energías no fósiles en el 2024 ya que de esta estrategia se desprende la última Medida de Política denominada “Transición Energética”. En este tenor el relleno Sanitario de León proyecta el

aprovechamiento del biogás generado por los pozos del relleno para generación de energía eléctrica.

En el relleno sanitario de León, Guanajuato ya se produce metano para cogeneración y presenta suelos con influencia salina a diferencia del relleno de Villahermosa, Tabasco que aún no llega a producir gas con porcentaje de metano aprovechable.

Por otro lado, de acuerdo a los trabajos de García- Maldonado *et al.* (2018) el cual estudió la diversidad microbiana en ambientes hipersalinos de Baja California Sur, México, encuentra que las comunidades metanogénicas estaban dominadas por miembros de los órdenes *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* y *Methanococcales*, asimismo observa que el orden *Methanomicrobiales* aumenta su abundancia bajo concentraciones más bajas de salinidad y sulfato. También identifica abundancia de la clase *Thermoplasmata* prospera en ambientes ácidos y alta temperatura en sus experimentos de microcosmos al adicionar Trietilamina, lo que sugiere la capacidad potencial de estos microorganismos para usar la trimetilamina en ambientes hipersalinos.

Este proyecto se limitó a identificar la composición de las comunidades relacionadas a la condición de temperatura y salinidad para confirmar ó descartar la presencia de arqueobacterias de los órdenes hidrogenotróficos en condición de salinidad baja en Villahermosa, Tabasco contra arqueobacterias de los órdenes acetotróficos en condiciones más salinas como las presentadas en León, Guanajuato. La información generada sobre los consorcios microbianos identificados podrán ser utilizados para estimular la abundancia y ruta metabólica de generación del gas en ambos rellenos sanitarios en una nueva propuesta técnica.

3. ANTECEDENTES

La tecnología emergente de la biología molecular que ha evolucionado a la genómica de hoy, dió lugar a una publicación de 1977 de Carl Woese donde demostró que un grupo de microbios poco conocido llamado arqueobacteria estaba en realidad más relacionado con el eucaria que con la bacteria verdadera. Woese se fundamentó en el ARN mitocondrial 16s que es una secuencia altamente conservada, es decir que se puede usar para buscar los cambios evolutivos porque ha evolucionado lento. Posteriormente Woese en 1990 propuso dividirlos en un documento titulado "Hacia un sistema natural de organismos: propuestas para los dominios de Archeae, Bacteria y Eucarya" (Morrison, 2003).

Los estudios metagenómicos para arqueas se realizan mediante el análisis del gen del ribosoma 16S procariótico (16SARN r), que tiene aproximadamente 1.500 pb de longitud y contiene nueve regiones variables intercaladas entre las regiones conservadas. Las regiones variables de 16S rRNA se utilizan con frecuencia en las clasificaciones filogenéticas, tales como el género o la especie en diversas poblaciones microbianas así fue como en 1993, el Departamento de Energía (DOE) financió la secuenciación de tres genomas completos de arqueas: *Methanococcus Jannaschii*, como una colaboración entre el Instituto para la Investigación del Genoma (TIGR) y la Universidad de Illinois en Champaign; *Thermoautotrophicum Methanobacterium*, como una colaboración entre Genome Therapeutics y la Universidad Estatal de Ohio; y *Furiosus pyrococcus*, en la Universidad de Utah y la Universidad de Mayland. Las dos primeras secuencias del genoma archaeal fueron descifrados en 1996 y 1997, respectivamente, y pronto se complementaron con la liberación de las secuencias del genoma de *Fulgidus Archaeoglobus* por TIGR y *Pyrococcus horikoshii* por la Universidad de Tokio, y NITE NIBHT en Japón (Gaasterland, 1999).

García, Patel y Olliver, (2000) realizan la revisión más referenciada actualmente sobre taxonomía, filogenética y diversidad ecológica de las arqueas metanogénicas donde se resume características ecológicas de las 5 órdenes propuestas por Boone en 1993. Este autor destaca la necesidad de conocimiento del metabolismo y la bioquímica de cultivos puros sobre los cultivos mixtos de metanogénicos esenciales para futuras aplicaciones.

Luton *et al.*, (2002) desarrollaron métodos para permitir el análisis de poblaciones de metanógenas en rellenos sanitarios utilizando el gen *mcrA* como objetivo. Se examinaron dos vertederos y se analizaron sesenta y tres clones de un sitio en Essex, y ciento dos de un sitio en Odcombe, Somerset. El análisis reveló una diversidad mucho mayor en la población de metanógenas dentro del material de relleno sanitario de lo que se ha visto anteriormente.

Conklin *et al.*, (2006) realiza un estudio sobre cinética de crecimiento y competencia entre los géneros *Methanosaeta* y *Methanosarcina* en 2 digestores a escala laboratorio hallando que el crecimiento de *Methanosarcina* aumenta en concentraciones más altas de acetato, mientras que el crecimiento de *Methanosaeta* domina en concentraciones más bajas.

Ferrer y Pérez (2010) propone una hipótesis sobre la relación de inóculos a base de excreta de cerdo con los problemas de rendimiento de metano, debido la competencia por el acetato de las bacterias reductoras de sulfatos y las arqueas metanógenas acetoclásticas. Este autor enfatiza que una buena selección de cepas, garantiza el mejor aprovechamiento de las plantas de biogás existentes en Cuba y un diseño más eficaz de reactores futuros, al identificar inóculos altamente productores de metano.

La innovación en técnicas moleculares para agilizar la identificación de metanógenas a nivel de comunidades se puede observar en Kim, Kyung y Cho (2014) con la comparación de PCR por goteo y el PCR en tiempo real en muestras de digestores a gran escala y también en los estudios de Kim y Lee (2014) donde presentan una rápida toma de huellas digitales de comunidades metanogénicas mediante análisis de fusión de alta resolución. En contraste a nivel género Stantscheff *et al.*, (2014) identificaron metanogénicas de cinco plantas de biogás agrícola a gran escala con secuencias de genes ARNr 16S parciales, las cepas aisladas de cultivos de enriquecimiento se relacionaron con *Methanoculleus bourgensis*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosaeta concilii* y *Methanobacterium formicicum*.

Tejerizo *et al.*, (2017) secuenció por completo del genoma de la novedosa cepa Buetzberg de *Methanobacterium congolense*, una arquea hidrogenotrófica, metanogénica, aislada de una planta de biogás mesófila a escala industrial que utilizó biorresiduos. El análisis de la arquitectura del cromosoma *M. congolense* Buetzberg reveló una alta colinealidad con el cromosoma *Methanobacterium paludis*.

Por último, Wang *et al.*, (2017) habla sobre las características microbianas en el proceso de digestión anaerobia a partir de restos alimenticios para la producción de metano y destaca que los microorganismos pueden ser indicadores de la estabilidad o falla del proceso de digestión anaerobia. Finalmente indica que en futuros trabajos se requieren esfuerzos de investigación sobre las reglas de sucesión dinámicas de los microorganismos dominantes mediante el control de las condiciones de fermentación.

Las plataformas de secuenciación de segunda y tercera generación que vienen a complementar a la tradicional secuenciación por el método Sanger, permiten analizar un gran número de individuos obteniendo una profundidad de secuenciación significativa de sus genomas o transcriptomas (Meneses, Rozo y Franco, 2011)

Después del método sanger vino la pirosecuenciación usada p.e. por Sahm *et al.*, (2013) para determinar la composición de las comunidades de 2 manantiales hidrotermales. Usando pirosecuenciación, investigó 93,576 secuencias parciales del gen 16S rRNA amplificadas con cebadores específicos V2 / V3 para Bacteria y Archaea y se compararon con las secuencias del gen 16S ARNr de secuenciación directa de metagenoma sin amplificación previa finalmente concluyó que En el manantial ácido, la diversidad procariota fue menor que en el manantial caliente, ligeramente alcalino. La comunidad del manantial ácido estuvo dominado por organismos quimio-quimioautotrófico del género Acidithiobacillus (43%), con el heterotrófico Acidicaldus (38%) y con Anoxybacillus (7,8%).

Actualmente las plataformas de Secuenciación masiva consiguen secuenciar simultáneamente millones de fragmentos de ADN de múltiples individuos, lo cual se traslada en menos costos y tiempo. Una de las mayores condiciones es el manejo de grandes volúmenes de datos generado en cada proyecto, que requiere un buen manejo de técnicas bioinformáticas avanzadas y de una adecuada herramienta computacional. Las técnicas que se benefician de la secuenciación masiva deben abordar necesariamente dos fases: La primera fase (*in vitro*) consiste en la construcción de bibliotecas genómicas, seguida de la subsiguiente secuenciación de dichas bibliotecas en una plataforma de secuenciación. La segunda fase (*in silico*) comprende el **análisis bioinformático** de los archivos de lecturas generadas por las distintas plataformas de secuenciación masiva. (López de Heredia, 2016).

Un ejemplo del uso de esta secuenciación masiva para mejorar las condiciones de una planta municipal de biogás termofílica es la de Weiss *et al.*, (2009) quien muestreó

dos veces al mes y clasificó la microbiota residente mediante el análisis de los genes 16S ARNr, descubriendo que la mayoría de las secuencias bacterianas eran bacterias no identificadas o no cultivadas de hábitats similares. El 78,4% de las secuencias arqueales, pertenecían al género Methanoculleus, que se sabe que utiliza eficientemente H₂ y CO₂. Finalmente, esta información indujo la extracción de amoníaco del agua de proceso de la planta a través de la cual el amoníaco ingresa al reactor de biogás reactor pudo reducirse a la mitad, lo que aumentó la producción de energía de la planta de biogás en casi un 20%.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. OBJETIVOS

4a. Objetivo General:

- Identificar los consorcios asociados a los grupos metanogénicos presentes en lixiviados de los rellenos sanitarios de Villahermosa, Tabasco y León, Guanajuato mediante técnicas moleculares.

4b. Objetivos Específicos:

1. Extraer ADN del total de los consorcios microbianos del lixiviado o sedimento de los pozos emitiendo metano para identificar arqueobacterias metanogénicas a partir de la técnica molecular: análisis 16rs.
2. Caracterizar molecularmente mediante secuenciación masiva y comparación con bases de datos al grupo de arqueobacterias metanógenas en cada sitio relacionándolos con los parámetros físico-químicos de temperatura, % metano y pH
3. Comparar la diversidad de consorcios de ambos rellenos mediante la diversidad y composición de especies.

Hipótesis: Se espera cambios en la diversidad de bacterias en los consorcios presentes en lixiviados y sedimentos de los rellenos sanitarios de Villahermosa, Tabasco y León, Guanajuato.

De acuerdo a las condiciones climáticas se podría observar el predominio en León, Guanajuato de las metanógenas metilotróficas del orden de methanosarcinales (géneros metanosarcinas y metanosetas) a 35 °C, mientras que a temperaturas mayores (aprox . 55°) como en Villahermosa se podría esperar el predominio de metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes methanomicrobiales y methanobacteriales.

CAPÍTULO 2

5. ARTICULO: METHANOGENIC BACTERIA IN SOIL FROM LEACHATE SOILS FROM LANDFILLS

Revista:



MEXICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

ISSN: 2448-6590

Indexed in:

SCOPUS (<https://suggestor.step.scopus.com/progressTracker/?trackingID=2D97C6A560EAA045>)

**Sistema de CRM CYT-
CONACYT** (<http://www.revistascytconacyt.mx/busqueda/res/mexican%20journal%20of%20biotechnology>)

Área: VI. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

La revista obtuvo 45.70 pts.

Se considera:

De 49.90 pts. a 68.29 pts.	Competencia Internacional
De 42.25 pts. a 49.89 pts.	En Competencia Nacional
De 34.25 pts. a 42.24 pts.	En Proceso de Consolidación
De 20.60 pts. a 34.24 pts.	En desarrollo

Methanogenic bacteria in soil from leachate soils from landfills

Bacterias metanogénicas de suelos con lixiviados provenientes de rellenos sanitarios

Erika Cristell Martínez-Ramón¹, José Rodolfo Velazquez-Martínez², Lucero Vázquez-Cruz¹, Rosa Martha Padrón-López¹, Sugely López-Martínez¹.

¹División académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Cárdenas km. 0.5 S/N Entronque a, Bosques de Saloya, 86150 Villahermosa, Tab.

²División académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa- Teapa Km 25+2 Ranchería la Huasteca 2da seccion, 86298 Villahermosa, Tab.

*Corresponding author

Email: sugeylo@hotmail.com (S. López-Martínez)

ABSTRACT

Landfill's waste starts its decomposition through complex chemical processes in the presence or absence of oxygen. From this process, products such as leached liquids and gases are obtained. Of the mixture called Biogas, the main component is methane, followed by carbon dioxide. To identify the methanogenic consortiums associated with the soils of two landfills, sediments and leachates were collected. Leached in wells of 25 meters deep methane producers for cogeneration in saline soil of León, Guanajuato and sediments from 16m wells in thermophilic conditions without methane production in Villahermosa, Tabasco. Identification was performed by metagenomic sequencing. The wells of León with saline influence had sequences of 68.73% Archaeas and 31.27% of Bacteria against the wells of Villahermosa with 90.25% of Bacteria and 3.61% of Archaeas. In the wells of León, hydrogenotrophic methanogens of the order *methanobacterial* dominated over the acetotrophic ones of the order of *methanosarcinales* (genus *methanosaeta*). In the wells of Villahermosa the methane genesis phase is not yet present, the presence of hydrogenotrophic methanogens of the methanomicrobial orders being incipient. The León landfill had 165 species against 38 of the Villahermosa landfill and a higher diversity index including non-methanogens.

Keywords: Archaeas, landfill, leachate, metagenomic sequencing, methanogens, saline.

RESUMEN

Los residuos depositados en rellenos sanitarios inician su descomposición mediante procesos químicos complejos en presencia o ausencia de Oxígeno. De este proceso se obtienen productos como los líquidos lixiviados y gases. De la mezcla denominada Biogás el principal componente es el metano, seguido por el dióxido de carbono. Para identificar

los consorcios metanogénicos asociados a suelos de dos rellenos sanitarios se colectaron sedimentos y lixiviados. Lixiviados en pozos de 25 mts de profundidad productores de metano para cogeneración en suelo salino de León, Guanajuato y sedimentos en pozos de 16 m en condiciones termófilas sin producción de metano en Villahermosa, Tabasco. La identificación se realizó mediante secuenciación metagenómica. Los pozos de León con influencia salina presentan secuencias de 68.73% Arqueas y 31.27% de Bacterias contra los pozos de Villahermosa con 90.25% de Bacterias y 3.61% de Archaeas. En los pozos de León dominan metanogénicas hidrogenotróficas del orden methanobacteriales sobre acetotróficas del orden de *methanosarcinales* (género *Methanosaeta*). En los pozos de Villahermosa aún no se presenta la fase de metanogénesis siendo incipiente la presencia de metanógenas hidrogenotróficas del orden methanomicrobiales. El relleno de León presenta 165 especies contra 38 del relleno de Villahermosa y mayor índice de diversidad incluyendo no metanógenas.

Palabras clave: Arqueas, Relleno sanitario, lixiviado, secuenciación metagenómica, metanógenos, salina.

1. INTRODUCCIÓN

La producción natural de metano se debe a la actuación de microorganismos como bacterias, que mediante procesos biológicos degradan los residuos, emitiendo éste y otros gases, y liberando otras sustancias químicas. El metano (CH₄) es uno de los seis gases de efecto invernadero regulados por el Protocolo de Kyoto. Este gas atrapa 21 veces más el calor que el dióxido de carbono (CO₂), considerado el principal Gas Efecto Invernadero (GEI). Los rellenos sanitarios son la tercera fuente a nivel mundial aplicándose en producción de energía eléctrica (Marland *et al.*, 2003). De acuerdo con Arvizu y Huacuz (2003) en México se tiene el potencial técnico comercial para convertir los gases de un relleno sanitario en electricidad; sin embargo, su aplicación aún es baja. Los rellenos sanitarios de este estudio son de origen de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) con condiciones distintas de salinidad, madurez y temperatura por lo que existe la necesidad de conocer las bacterias metanogénicas que puedan estar presentes para ubicar las rutas metabólicas y las interacciones entre consorcios. La importancia de identificar los consorcios de bacterias metanogénicas reside en el hecho de que la acumulación de amonio y ácidos grasos volátiles (denominados inhibidores) traen como consecuencia procesos ineficaces en la producción de metano, los microorganismos son la parte medular de los digestores debido a que la digestión anaerobia es un proceso bioquímico que involucra una gran variedad de grupos microbianos (Wang *et al.*, 2017). Un ejemplo de influencia de parámetros fisicoquímicos ambientales sobre la composición de diversidad bacteriana es el trabajo de García-Maldonado *et al.*, 2018 en ambientes hipersalinos de Baja California Sur, México, donde las comunidades metanogénicas estaban dominadas por miembros de los órdenes Methanosarcinales, Methanobacteriales y Methanococcales, y donde la salinidad y el sulfato bajan, se observa abundancia del orden Methanomicrobiales. Otro ejemplo de interacción es la competencia por el acetato de las bacterias reductoras de sulfatos y las arqueas metanógenas acetoclásticas mencionada por Ferrer y Pérez (2010). Por tanto este proyecto se orientó a identificar la composición de las comunidades relacionadas a la condición de salinidad para confirmar o descartar la presencia de arqueobacterias en condición de salinidad baja de Villahermosa, Tabasco contra arqueobacterias en condiciones más salinas de León, Guanajuato que pueden ser indicadores de la estabilidad o falla del proceso de digestión anaerobia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso completo se dividió en cuatro fases:

Fase 1 de Gabinete: se seleccionó los pozos en cada sitio (Villahermosa, Tabasco y León, Guanajuato) en función del estado de mantenimiento, método de muestreo, condiciones de preservación y envío de muestras. Se contó con los análisis de salinidad reglamentarios del relleno por el Laboratorio del grupo Microanálisis S. A. de C...v. acreditado ante el EMA por medio del método de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo "Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo".

Fase 2 de Campo: Se tomó la decisión de coleccionar muestras con lixiviado y/o sedimentos en base a la factibilidad en cada sitio. Los pozos tienen profundidades de 6 a 20 m y con diámetro reducido (3" de ϕ aprox.) por lo que la forma de llegar al fondo fue extendiendo un nucleador, pero se determinó *in situ* si el fondo era completamente líquido o si se podía obtener material térreo que es lo ideal para el análisis molecular debido a que el lixiviado debe procesarse para obtener una muestra concentrada.

Fase 3 de Laboratorio: Se realizaron pruebas para determinar el kit de extracción de ADN más adecuado y las concentraciones de la extracción para el PCR.

Fase 4 de Gabinete: En esta fase del análisis bioinformático contó con la plataforma de Illumina la cual automáticamente arroja en comparación con una base de datos de genes desde los reinos hasta las especies halladas.

2.1. Colecta de muestras

2.1.1. Colecta de Lixiviados: Las muestras se tomaron con uso de guantes y envases estériles (en autoclave a 121° por 15 min) y se conservaron en nevera con hielo a 4°C hasta llevar a refrigeración en el laboratorio, las muestras se procesaron dentro de las 24 h siguientes de acuerdo con la NMX-AA-003-1980. Aguas residuales. - Muestreo.

En León, Guanajuato se colectó lixiviados en el Pozo 81 y 104.

2.1.2. Colecta en sedimentos: Se realizó muestreo por duplicado con nucleador de PCV de 16-20 m de profundidad, introduciendo el nucleador en cada pozo por debajo del espejo de agua. Las muestras se mantuvieron en condiciones anaerobias en frascos y bolsas estériles cerrando inmediatamente el contenedor y manteniendo a 4°C.

En Villahermosa se colectó sedimento en el pozo 5.

Al momento de la colecta se midió el % de CH₄, CO₂, O₂ y Balance de N con el Analizador De Gases De Relleno Sanitario Marca Gem 2000 Landtec.

2.2. Extracción de ADN

Preparación del lixiviado:

Se tomaron aprox. 300 ml de los lixiviados, se depositaron en botellas estériles de 0.5 L, se centrifugaron a 10000 xg durante 20 min a una temperatura de 4°C. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante, metiéndolo en tubos estériles, el pellet obtenido se re-suspendió con agua estéril y se pasó a tubos Eppendorf para realizar otra centrifugación a 12,000 rpm por 5 min. El pellet obtenido se usó en la extracción de ADN siguiendo el protocolo específico de los kits.

Preparación del sedimento:

1. Se centrifugó a 10000 xg durante 20 min a una temperatura de 4°C para eliminar todo líquido. Se transfirió la muestra a un tubo de polipropileno de 50 ml. Adicionar 10 ml de regulador de lisis y se mezcló con vortex por 1 min.

2. Se incubó a 65 °C por 15 min con agitación, y adicionó 10 ml de cloruro de bencilo, se mezcló con vortex por 3 min. Continuó la incubación a 65 °C por 15 min con agitación. Se

adicionaron 10 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) pH 8. Se Mezcló con vortex por 1 min y colocar en hielo por 10 min.

3. Se centrifugó a 8,500 xg por 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con un volumen igual de isopropanol. Enseguida se incubó a $-20^{\circ}C$ por 2h y centrifugó a 8,500 xg por 15 min.

4. Se descartó la fracción acuosa, se lavó la pastilla o pellet con etanol al 70%, se secó al aire, y disolvió en 100 μl de agua desionizada estéril. Para asegurar alta calidad del ADN se usó un kit de extracción para suelos (Herran, *et al.*, 2015).

Se eligió el kit de suelo NucleoSpin® de MOBIO que está diseñado para el aislamiento de ADN genómico alto peso molecular de microorganismos como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, arqueas, hongos y algas en muestras de suelos, lodos y sedimentos.

Para una útil extracción de ADN se requirió una adecuada ruptura celular para evitar que el ADN pueda contaminarse con ácidos húmicos del suelo. La ruptura celular se logró con fuerte agitación de las muestras en un regulador de lisis, el cual contiene altas concentraciones de detergente, sales, o perlas de vidrio. El ADN se separó del lixiviado por medio de centrifugación, del concentrado del lixiviado y del sedimento se usó 0.25 g de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit.

2.3. Amplificación ADN por PCR

La PCR tomó tres pasos térmicos:

A. La desnaturalización de la doble cadena de ADN (Etapa 1), con temperaturas entre $92^{\circ}C$ y $96^{\circ}C$. B. Templado o hibridación de los cebadores a un sitio complementario de la plantilla (Etapa 2), a una temperatura entre $45^{\circ}C$ y $72^{\circ}C$. Extensión del cebador a $72^{\circ}C$ (Etapa 3). Para este caso se utilizó el termociclador Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific – AR con un programa de tiempo total de 45' distribuido en Etapa 1= 3' a $95^{\circ}C$, Etapa 2= paso 1_30'' a $95^{\circ}C$, paso 2_30'' a $55^{\circ}C$, paso 3_30'' a $72^{\circ}C$; Etapa 3= 5' a $72^{\circ}C$ y enfriamiento a $4^{\circ}C$.

2.4. Análisis 16S R ARN

Los fragmentos del gen 16S ARNr de 1.254 pb de longitud se amplificaron a partir de extractos de ADN de muestras y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se aplicó el protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation que describe un método para preparar muestras para secuenciar las regiones V3 y V4 variables del gen 16S ARNr. Este protocolo combinado con un sistema de secuenciación de laboratorio, proporciona un flujo de trabajo completo para la secuenciación de amplicón de ARNr 16S.

Resumen del flujo de trabajo:

1. Se preparó y mezcló los cebadores de amplicones: el protocolo incluye las secuencias de pares de cebadores para la región V3 y V4 que crean un único amplicón de aproximadamente ~ 460 pb. Se preparó la biblioteca: el protocolo describe los pasos para amplificar la región V3 y V4 y utilizando una PCR de ciclo limitado, se agrega los adaptadores de secuencia Illumina y los códigos de barras de doble índice al objetivo del amplicón.

2. Se leyó la Secuencia en MiSeq: utilizando lecturas emparejadas de 300 pb, y reactivos MiSeq v3, los extremos de cada lectura se solapan para generar lecturas de alta calidad y longitud completa de la región V3 y V4 en una única ejecución de 65 horas.

3. Se analizó en MSR o BaseSpace. El flujo de trabajo de Metagenomics realiza una clasificación taxonómica utilizando la base de datos de genes Green que muestra clasificación del nivel de género o especie en un formato gráfico.

2.5. Primers

De acuerdo con Narihiro y Sekiguchi (2015) algunos cebadores se desarrollaron para descifrar poblaciones completas metanogénicas en ecosistemas de interés por lo que proporcionan una tabla de cebadores. La tabla incluye cebadores dirigidos a los genes 16S ARNr debido a que los organismos de arqueas metanotróficas anaeróbicas no cultivadas (ANME) toman parte en la oxidación anaerobia de metano (AOM) mediante el empleo de enzimas relacionadas a la metanogénesis incluyendo *mcr*. En este caso se usaron los primers Archea 519F y 1041R de Illumina mencionados por Klindworth *et al.*, (2012), quien evaluó el espectro de cobertura global y phylum de 175 cebadores y 512 pares de cebadores *in silico* con respecto al conjunto de datos de referencia SILVA 16S / 18S ADNr, encontrando que este par de cebadores específico a Archaea logra un espectro de phylum completo. SD-Arch0519-AS-15 / SD-Arch-1041-AA-18 (A: 76.6%, B: 0.0%, E: 0.0%) muestra los mejores resultados con respecto a una cobertura relativamente alta en general. Este par de cebadores cubre dos de cada ocho phyla (crenarchaeota y Euryarchaeota), pero el espectro phylum aumenta notablemente a seis phyla detectados si se permite una falta de coincidencia (A: 92.8%, B: 0.0%, E: 0.0%). En resumen, SD-ARCH-0519-AS-15 / S-DARCH-1041-AA-18 es el par de cebadores más adecuado con una región de alta tensión 540 pb de amplificación que abarcan 4-6 y excelente dominio específico.

2.6. Secuenciación

Se realizó la secuenciación masiva. Las plataformas de secuenciación de segunda y tercera generación que vienen a complementar a la tradicional secuenciación por el método Sanger, permiten analizar un gran número de individuos obteniendo una profundidad de secuenciación significativa de sus genomas o transcriptomas. Por lo tanto se contó con el secuenciador modelo Miseq de la compañía Illumina Inc. Los secuenciadores de Illumina utilizan la tecnología de secuenciación por síntesis y pueden conseguir lecturas de 2 x300 pb hasta 15 Gb y 25 millones de lecturas (ML).

3. RESULTADOS

En el relleno sanitario de Villahermosa se presentó dominancia del reino bacteria con 90.25%, contra 3.61% de Archeas y 6.14% de muestras sin poder clasificar. El 14.29% de las lecturas clasificadas a nivel de especies pertenecieron a *Ruegeria lacuscaerulensis*.

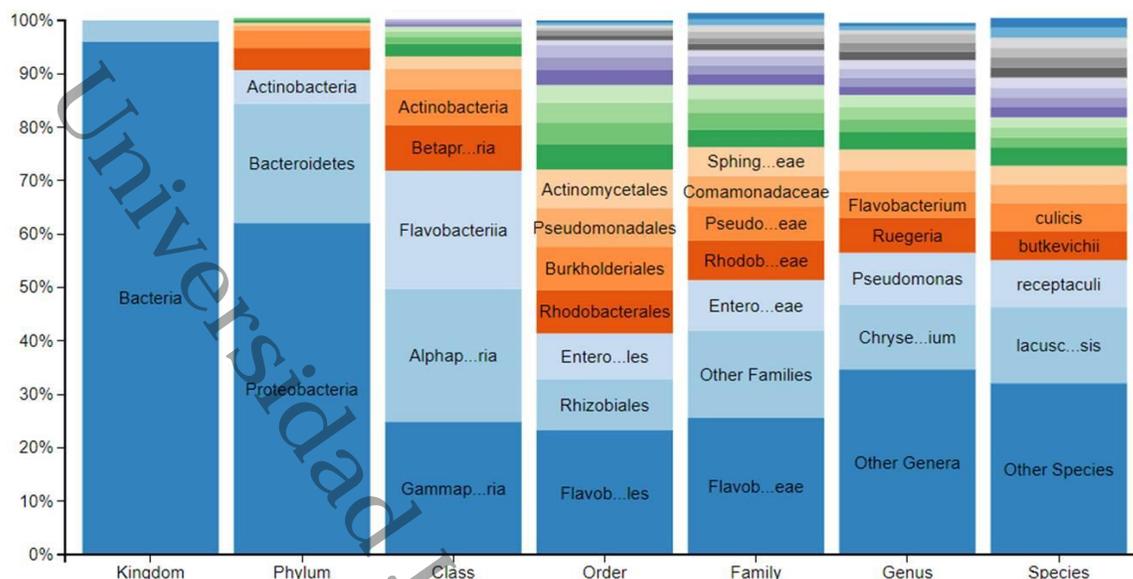


FIG. 1. TOP 20 CON LA CLASIFICACIÓN DE RESULTADOS POR NIVEL TAXONÓMICO DEL RELLENO DE VILLAHERMOSA.

FIGURE 1. TOP 20 OF THE RESULTS FROM THE VILLAHERMOSA LANDFILL CLASSIFIED BY TAXONOMIC LEVELS

El Relleno de León presentó biogás con % de metano del 49.6% al 56.3% lo que lo colocó en estatus de buena calidad, en cuanto a salinidad con 13,299 mg/L se diagnosticó como hipersalino.

% GAS	AJUSTADO	INICIAL	AJUSTADO	INICIAL
CH ⁴	49.6	49.6	56.3	55.3
CO ²	37	37.5	42.8	42.0
O ²	2.0	2.0	0.7	2.6
BALANCE DE NITROGENO	10.9	10.9	0.0	0.0
SALINIDAD	13,299.2 mg/L			

TABLA 1. DATOS DE GASES Y SALINIDAD EN LOS POZOS DE LEÓN, GUANAJUATO.

TABLE 1. GASES AND SALINITY DATA FROM THE WELLS SAMPLED IN LEÓN, GUANAJUATO.

Fuente: Gem 2000 Landtec Analizador De Gases De Relleno Sanitario

En el Pozo 104 (parte cima de la celda) del relleno sanitario de León, Guanajuato presentó dominancia del reino Arquea con 68.73%, contra 31.27% de Bacterias. El 58.98% de las lecturas clasificadas a nivel de especies pertenecieron a *Methanocollus receptaculi* y 17.84 % de *Methanocollus palmolei*.

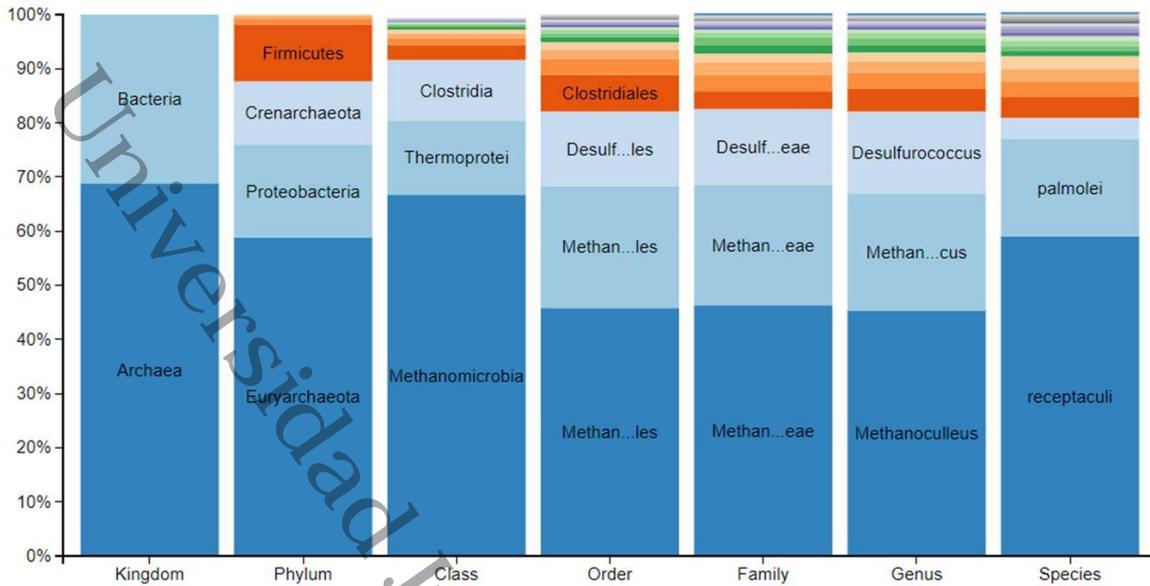


FIG. 2. TOP 20 CON LA CLASIFICACIÓN DE RESULTADOS POR NIVEL TAXONÓMICO DEL POZO 104 DE LEÓN, GUANAJUATO.

FIGURE 2. TOP 20 OF THE RESULTS OF WELL 104 FROM LEON, GUANAJUATO, CLASSIFIED BY TAXONOMIC LEVELS.

Mientras que para el pozo 81 (parte baja de la celda) del relleno sanitario de León, Guanajuato dominó el reino Arquea con 52.59%, contra 47.40% de Bacterias. El 42.37% de las lecturas clasificadas a nivel de especies pertenecieron a *Methanobacterium kanagiense*, 25.08% de *Methanosaeta pelágica*, 5.68% de *Methanocolleus recetaculli* y 7.60% de otras especies.

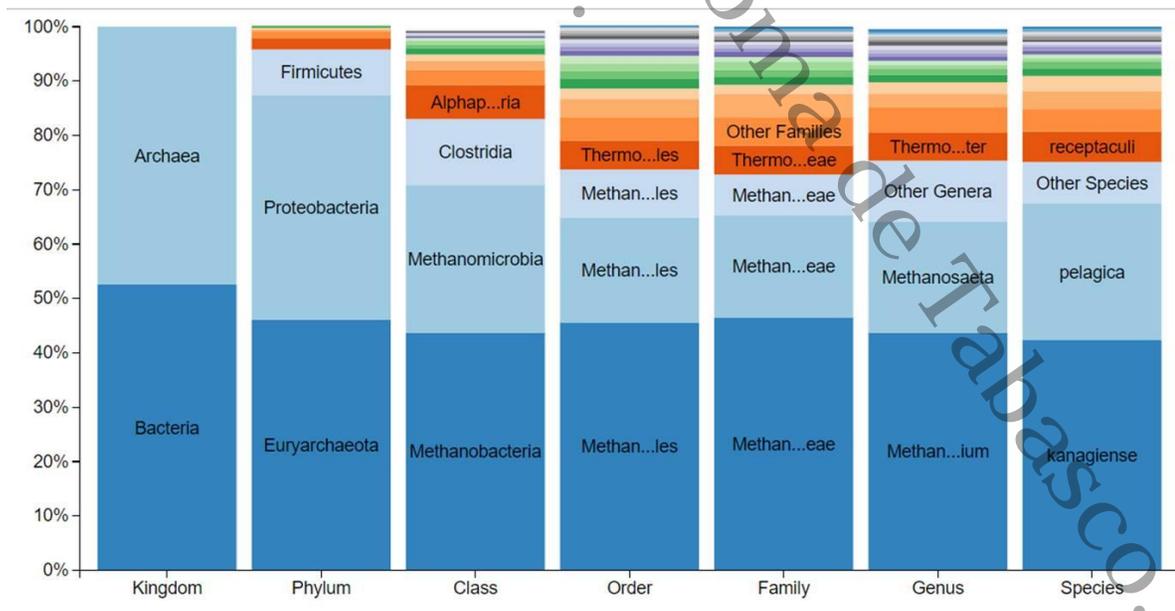


FIG. 3. TOP 20 CON LA CLASIFICACIÓN DE RESULTADOS POR NIVEL TAXONÓMICO DEL POZO 81 DE LEÓN, GUANAJUATO.

FIGURE 3. TOP 20 OF THE RESULTS OF WELL 81 FROM LEON, GUANAJUATO, CLASSIFIED BY TAXONOMIC LEVEL.

La plataforma de Illumina realizó una medición de Diversidad de especies mediante el índice de Shannon el cual mide la entropía de la clasificación a nivel de especies en la muestra obteniéndose los siguientes resultados:

Relleno sanitario	Pozo Muestra	Índice de Diversidad de Especies de Shannon	Número de Especies Identificadas
Villahermosa	P05	1.189	38
León, Guanajuato	P104	1.013	159
León, Guanajuato	P81	1.187	165

TABLA 2. ÍNDICE DE DIVERSIDAD EN LOS DIFERENTES POZOS.

TABLE 2. DIVERSITY INDEXES OF THE SAMPLED WELLS

4. DISCUSIÓN

Cadena *et al.*, 2018 identifica metanogénesis metilótrofa evidenciada por secuencias pertenecientes a la familia Metanosarcinícea (como las especies encontradas en el Pozo 81 del relleno de León, Guanajuato), también estimuló incubaciones suplementadas con acetato y lactato, eliminando sulfato y produjeron CH₄ conducidas por metanógenos hidrogeotróficas.

En el pozo 104, el género *Peptoniphilus* descrito por Rooney *et al.*, (2011) abarca especies de cocos anaerobios grampositivos que pueden utilizar la peptona como única fuente de carbono. En ambos pozos de León también se presenta *Methanobacterium kanagiense* la cual es una Arquea metanogénica, anaeróbica, hidrogenótrofa, crece con hidrógeno y dióxido de carbono como única fuente de energía y carbono.

En el relleno de Villahermosa abunda *Ruegeria lacuscaerulensis* descrita originalmente como *Silicibacter lacuscaerulensis*, es una bacteria mesófila moderadamente halófila pertenece a la familia Rhodobacteraceae. Este organismo puede crecer a temperaturas de hasta 50 °C. Los aislados no crecen sin sal añadida en el medio y pueden crecer hasta un 7% de NaCl (p/v). La salinidad óptima para el crecimiento es 3.5-4% NaCl. (Petursdotirr y Kristjansson 1997) lo que es congruente con este medio termófilo y denota ligera salinidad. La única metanogena encontrada en los pozos de Villahermosa es *Methanoculleus receptaculi* una Metanógena termofílica (50-55°C) estrictamente anaeróbica, utiliza H₂/CO₂ o formiato de sodio como sustrato para la metanogénesis, pero no acetato de sodio, trimetilamina, monometilamina, etanol, sulfuro de dimetilo, isopropanol, isobutanol, butan-2-ol o H₂/CO₂. (Lei *et al*; 2008). Otras bacterias menos abundantes pero que denotan ligera salinidad son: *Polaribacter butkevichii*: bacteria heterotrófica miembro de la familia Flavobacteriaceae, aeróbica, mesofílica, (Nedashkovskaya *et al*, 2005), *Chryseobacterium culicis*: bacteria Gram negativa y crece en presencia de 0.5–3.0% de NaCl (Kämpfer *et al*, 2010), *Lewinella lutea*: Bacteria marina

que requiere NaCl para crecer. El crecimiento ocurre con NaCl 2–4% (p/v); se observa un crecimiento débil con NaCl al 5% (p/v). El crecimiento no ocurre con NaCl al 6% (p/v) o más (Khan *et al*, 2007). Finalmente tenemos las bacterias tolerantes a contaminantes: *Xanthobacter polyaromaticivorans* la cual degrada los compuestos aromáticos policíclicos y heterocíclicos en condiciones extremadamente bajas de oxígeno. Es capaz de degradar una amplia gama de compuestos aromáticos cíclicos como dibenzotiofeno, bifenilo, naftaleno, antraceno y fenantreno, incluso bajo condiciones extremadamente bajas de oxígeno [oxígeno disuelto (OD) < 0.2 ppm], degradador efectivo de dibenzotiofeno (DBT), un compuesto aromático heterocíclico que contiene azufre modelo en petróleo crudo (Hirano *et al*, 2004). La *Thiomona thermosulfata* es una bacteria Gramnegativa presenta movilidad, tiobacilos como la mayoría de las proteobacterias exhiben un crecimiento óptimo en condiciones mixotróficas, se adaptan y responden al arsénico ya que pueden usar As (III) como donante de electrones o pueden obtener energía de la oxidación de los compuestos de azufre inorgánicos reducidos (RISC). Orden: Burkholderiales, Familia: Comamonadaceae (Moreira *et al*, 1997).

Finalmente, en los Pozos de León, Guanajuato se confirma Metanogenas hidrogenotróficas del género *methanobacterium* y metilotróficas del género *methanosarcinales*. En los pozos de Villahermosa, Tabasco aún no inicia la fase de metanogénesis sin embargo de forma prematura se encuentran methanomicrobiales como es el caso de *Methaocolleus receptaculi* que pertenece a los microbiaceas. Por otra parte en los pozos de León Guanajuato pese a la alta salinidad es incipiente la reducción de sulfato debido a que no es dominante la presencia de las bacterias reductoras de sulfato (BRS) por lo tanto aún no limitan la disponibilidad de estos sustratos a los metanógenos.

AGRADECIMIENTOS

A la Beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) de la convocatoria 291237 CONACYT-SENER Hidrocarburos 2017, Tipo B, segundo periodo con CVU. No. 859984, otorgado en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Al Dr. José Quinatzin García Maldonado por permitirme trabajar en el laboratorio de patología acuática del CINVESTAV Mérida y a la MCA. Lucero Vázquez Cruz por permitirme practicar en el laboratorio de microbiología de la UJAT. A la Promotora Ambiental SA de CV de León, Guanajuato y Villahermosa, Tabasco por abrir sus puertas para la toma de muestra.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Arvizu F, J. L., & Huacuz V, J. M. (2003). Biogás de rellenos sanitarios para producción de electricidad. Boletín IIE, 118–123.

Cadena S., García-Maldonado J.Q., López-Lozano N.E. & Cervantes F.J.2018. Methanogenic and Sulfate-Reducing Activities in a Hypersaline Microbial Mat and Associated Microbial Diversity. Environmental Microbiology. 75:930–940

Ferrer, Y.; Pérez, H. (2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el

rendimiento. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA. vol. 43, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 9-20.

García-Maldonado, J. Q; Escobar-Zepeda A.; Raggi, L; Bebout, B.; Sanchez-Flores, A. y A. López-Cortés. 2018. Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporites, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments. *Extremophiles* (2018) 22:903–916.

Herrán, Jaime & Garcia, C. (2015). Técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos. Fundación Produce Sinaloa A.C. ISBN 978-607-8347-34-6.

Hirano Shin-ichi , Fumiya K., Mitsuru H., Tadayuki I., Masaaki M. & Shigenori K. (2004) Isolation and Characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W That Degrades Polycyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds under Extremely Low Oxygen Conditions, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68:3, 557-564,

Kämpfer, P; Chandel, K; Prasad, GB; Shouche, YS; Veer, V. 2010. "*Chryseobacterium culicis* sp. Nov., Aislado del intestino medio del mosquito *Culex quinquefasciatus*". *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva* . 60 (Pt 10): 2387–91.

Khan, ST; Fukunaga, Y .; Nakagawa, Y .; Harayama, S. 2007. Descripciones modificadas del género *Lewinella* y de *Lewinella cohaerens*, *Lewinella nigricans* y *Lewinella persica*, y descripción de *Lewinella lutea* sp. Nov. y *Lewinella marina* sp. Nov. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva* . 57 (12): 2946–2951. d

Klindworth A., Priesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. & Oliver-Glöckner F. 2012. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Published online 28 August 2012 *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 41, No. 1-

Lei Ch., Tian-Lei Q., Xia Li, Wei-Dong W., Yu Deng, Xiao-Bo Y., Zhang H.. 2008. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 285, Issue 1, August 2008, Pages 65–71.

Marland G., Boden T. y B. Andres. 2003. Global, Regional and National CO2 Emissions. Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC). Oak Ridge National Laboratory, U. S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn. Disponible en: <http://cdiac.esd.ornl.gov/UNFCCC> (United Nations Framework Convention on Climate Change). Greenhouse Gas Inventory Database (GHG).

Moreira D, Amils R.1997. Filogenia de *Thiobacillus cuprinus* y otros tiobacilos mixotróficos: propuesta para *Thiomonas* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1997; 47 (2): 522–528.

Narihiro T., Sekiguchi Y. (2015) Primers: Functional Genes and 16S rRNA Genes for Methanogens. In: McGenity T., Timmis K., Nogales B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg

Neashkovskaya, OI, Kim, SB, Lysenko, AM et al. *Curr Microbiol* (2005) 51: 408. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0105-z>

Petursdottir SK, Kristjansson JK (1997). *Silicibacter lacuscaerulensis* gen. nov., sp. nov., una bacteria mesófila moderadamente halófila característica del lago geotérmico Blue Lagoon en Islandia. *Extremófilos* 1 , 94-9.

Rooney A. P. Sweze J. L., Pukall B., Schumann P, & Spring S. 2011. Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z. Y., Zhao, L. & Shu, S. (2011). Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 51, 1521–1528. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2011), 61, 1962–1967

Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., Jiang, B. 2017. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production-A review, Bioresource Technology. doi: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152](http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152)

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO 3

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

6. CONCLUSIONES

En la primera parte de la hipótesis se esperan Metanogenas hidrogenotroficas del genero *methanobacterium* y metilótroficas del género *methanosarcinales* como las *methanosaetas* y *methanosarcinas* en el relleno sanitario de León. La presencia de *methanobacterium* y *methanosaetas* se confirma sin embargo estos géneros pueden ser facultativos para Metanogénesis metilótrofa ó hidrogenotróficas en el Pozo 81 de León, Guanajuato. En tanto en el pozo 104 de León, Guanajuato se observó el dominio metanógenas hidrogenotróficas (*methanobacteriales*) sobre las acetotróficas del orden de *methanosarcinales* (género *metanosaeta*).

En los pozos de León Guanajuato pese a la alta salinidad es incipiente la reducción de sulfato debido a que no es dominante la presencia de las bacterias reductoras de sulfato (BRS) por lo tanto aún no limitan la disponibilidad de estos sustratos a los metanógenos.

En cuanto a la segunda parte de la hipótesis, en Villahermosa aún no se presenta la fase de metanogénesis siendo aún incipiente la digestión de la materia por lo que se descarta el predominio de metanógenas. Sin embargo sí están presentes las metanogenas hidrogenotróficas aunque con poca presencia, éstas pertenecen a los órdenes *methanomicrobiales* y *methanobacteriales* como es el caso de *Methaocolleus receptaculi* que pertenece a los *microbiaceas*. Esto principalmente se debe a la diferencia de profundidad y tipo de muestra en cada sitio.

El pozo de Villahermosa presenta aún etapa previa a la metanogenesis debido a la alta dominancia de bacterias, sin embargo estas bacterias son moderadamente halófilas y con tendencia a tolerancia a contaminantes como hidrocarburos y Arsénico de acuerdo a la presencia de *Xanthobacter* y *Thiomonas*.

Por último el Relleno Sanitario de León Guanajuato presenta mayor número de especies y diversidad incluyendo no metanógenas a diferencia del relleno de Villahermosa.

7. RECOMENDACIONES

Es importante contar con varias alternativas de muestreo y realizar las adecuaciones a la forma de colectar la muestra ya que en el primer muestreo en el relleno sanitario de León se tenía prevista la toma de lixiviado ya que acuerdo a la metodología con 50ml (un tubo falcon podría ser suficiente), sin embargo se tomó >150ml de lixiviado debido a que no se podía extraer material térreo por la abundancia de lixiviado. Sin embargo al procesar las muestras y observar poco material recuperado de la centrifugación del lixiviado se planeó para el sitio de Villahermosa evitar el lixiviado y obtener sedimento por lo que se buscó aplicar un nucleador que alcanzará los 16m de la profundidad promedio. Por tanto a partir de esta experiencia se recomendaría aplicar una tercer forma de obtener la muestra podría incluir más especies mediante una unidad de celda de flujo para el muestreo de microorganismos unidos del agua subterránea es decir concentrar 50 L de agua subterránea mediante filtración por impacto en filtros de disco de membrana Supor de 293 mm de diámetro con poros de 1,2 y 0,2 μm (Pall Life Sciences). Colocando los filtros en bolsas de hidromasaje y congelándose rápidamente en baño de hielo seco de acuerdo al método usado por Holmes et. al., (2018) para extracción de ácido nucleico y preparación de ADNc.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acuña G., P.A.; Ángel G., L.S; Borray M., E; Constanza C.,L; Consuelo S., L. (2008). Aislamiento e identificación de microorganismos del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D.C. NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN: 1794-2470 Vol.6 No. 10 JULIO - DICIEMBRE DE 2008:101-236 D.C. 236: 156-161
- Altamirano G.; Freire A.; Gallegos D. (2012). TESIS DOCTORAL "Producción de Electricidad mediante la captura y Aprovechamiento del Biogás de un Relleno Sanitario". Escuela superior Politecnica del Litoral. Presentación recuperada de: <http://www.slideserve.com/tavarius/produccion-de-electricidad-mediante-la-captura-y-aprovechamiento-del-biogas-de-un-relleno-sanitario>
- Alvarez A, A. (2016). TESIS "Composición química de lixiviados provenientes de Rellenos sanitarios de la empresa promotora ambiental ubicados en: Tabasco y Guanajuato". UJAT. Villahermosa, Tabasco. 84 pp.
- Arvizu F, J. L., & Huacuz V, J. M. (2003). Biogás de rellenos sanitarios para producción de electricidad. Boletín IIE, 118–123. Retrieved from https://scholar.google.com.pe/citations?view_op=view_citation&continue=/scholar?hl=es&as_sdt=0,5&scilib=1025&citilm=1&citation_for_view=DTF_1-sAAAAJ:qjMakFHDy7sC&hl=es&oi=p
- ATSDR. (2001) "Landfill Gas Primer, An Overview for Environmental Health Professionals"; Agencia Norteamericana para las sustancias tóxicas y registro de enfermedades, Estados Unidos. Fuente de Internet: <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/landfill/html/intro.html> (8/06/2004)
- Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Segunda Edición-Springer. New York, USA.2005. 590-596 p.
- Cadena S., García-Maldonado J.Q., López-Lozano N.E. & Cervantes F.J.(2018). Methanogenic and Sulfate-Reducing Activities in a Hypersaline Microbial Mat and Associated Microbial Diversity. *Environmental Microbiology*. 75:930–940
- Conklin, A., Stensel, H. D., & Ferguson, J., (2006). The growth kinetics and competition between methanosarcina and methanosaeta in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research A Research Publication of the Water Environment Federation* 78(5), 486-496.
- Dumont M.G. (2014) Primers: Functional Marker Genes for Methylotrophs and Methanotrophs. In: McGenity T., Timmis K., Nogales B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg
- Environmental Research Foundation, 24 de septiembre de 1998, "Landfills are Dangerous", publicación semanal nº 617 del Semanario "Rachel's Environment and Health News"; Estados Unidos. Fuente de Internet: http://www.rachel.org/bulletin/pdf/Rachels_Environment_Health_News_1149.pdf (8/06/2004)
- Friends of the Earth (FOE), 10 de mayo de 1996, "Citizen's Guide to Municipal Landfills"; Estados Unidos; GAIA (Global Alliance for Incinerator Alternatives); abril 2004, "Resources up in Flames"; Filipinas. Fuente de Internet: <http://www.no-burn.org/RuiF2/Ruifpress.html> (1/07/2004)
- Ferrer, Y.; Pérez, H. (2010). Los microorganismos en la digestión anaerobia y la producción de biogás. Consideraciones en la elección del inóculo para el mejoramiento de la calidad y el rendimiento. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA. vol. 43, núm. 1, enero-abril, 2010, pp. 9-20.
- García Maldonado, J.Q. (2014). Tesis. Producción de Metano en ambientes hipersalinos: Diversidad Microbiana, Estructura y función de la comunidad de Arqueas metanogénas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. 94 p.

- García-Maldonado, J. Q; Escobar-Zepeda A.; Raggi, L; Bebout, B.; Sanchez-Flores, A. y A. López-Cortés. (2018). Bacterial and archaeal profiling of hypersaline microbial mats and endoevaporites, under natural conditions and methanogenic microcosm experiments. *Extremophiles* (2018) 22:903–916. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1047-2>
- Gaasterland T. (1999). Archaeal genomics Review. *Current opinion in microbiology*, ISSN: 1369-5274, Vol: 2, Issue: 5, Page: 542-7 . [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00014-4)
- Gehardt, P., Murray, R., Wood, W., Krieg, N. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Gentile J., Herrera H.; Pico J.F.; del Portal N., Rego, A. (2001). Secuenciador Térmico para laboratorios de Biología Molecular. Memorias de II congreso latinoamericano de Ingeniería biomédica, Habana 200. Artículo 00406. Mayo 23 al 25. La Habana cuba.
- Herrán, Jaime & Garcia, Cipriano. (2015). *Técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos*. Fundación Produce Sinaloa A.C. ISBN 978-607-8347-34-6. Fuente: https://www.researchgate.net/publication/287982212_Tecnicas_de_caracterizacion_de_suelos_y_abonos_organicos?enrichId=rgreq-146c7f10f76f65cdd16f8ab06bb13fbc-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI4Nzk4MjlxMjtBUzozMDk4ODkwNzc4NDE5MjJAMTQ1MDg5NDcyMjAxNQ%3D%3D&el=1_x_2&_esc=publicationCoverPdf
- Hirano Shin-ichi , Fumiya K., Mitsuru H., Tadayuki I., Masaaki M. & Shigenori K. (2004) Isolation and Characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W That Degrades Polycyclic and Heterocyclic Aromatic Compounds under Extremely Low Oxygen Conditions, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68:3, 557-564
- Holmes, D.E., Orelana, R., Giloteaux, L. et al. (2018). Potential for Methanosarcina to Contribute to Uranium Reduction during Acetate-Promoted Groundwater Bioremediation *Microb Ecol* (2018) 76: 660. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1165-5>
- Kämpfer, P; Chandel, K; Prasad, GB; Shouche, YS; Veer, V (octubre de 2010). "Chryseobacterium culicis sp. Nov., Aislado del intestino medio del mosquito *Culex quinquefasciatus*". *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva* . 60 (Pt 10): 2387–91. doi : 10.1099 / ijs.0.019794-0 . PMID 19933582
- Khan, ST; Fukunaga, Y .; Nakagawa, Y .; Harayama, S. (1 de diciembre de 2007). "Descripciones modificadas del género *Lewinella* y de *Lewinella cohaerens*, *Lewinella nigricans* y *Lewinella persica*, y descripción de *Lewinella lutea* sp. Nov. Y *Lewinella marina* sp. Nov". *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva* . 57 (12): 2946–2951. doi : 10.1099 / ijs.0.65308-0 . PMID 18048755
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. & Glöckner F.O. (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Published online 28 August 2012 *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 41, No. 1 e1 doi:10.1093/nar/gks808
- Lei Cheng, Tian-Lei Qiu, Xia Li, Wei-Dong Wang, Yu Deng, Xiao-Bo Yin, Hui Zhang. (2008) Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 285, Issue 1, August 2008, Pages 65–71, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01212.x>
- Levet, P.N. (1991). *Anaerobic Microbiology*.(pp:183-246).Ed. Oxford university Press.New York.
- López De Heredia L., U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. "Munibe Ciencias Naturales", v. 64;pp. 7-31.ISSN 0214-7688. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>.

- Luton P; Wayne J; Sharp R, y Riley P. (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148 (11): 3521-3530 doi: 10.1099 / 00221287-148-11-3521. DOI: [10.1099 / 00221287-148-11-3521](https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3521)
- Marland G., Boden T. y B. Andres. (2003). Global, Regional and National CO₂ Emissions. Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC). Oak Ridge National Laboratory, U. S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn. Disponible en: <http://cdiac.esd.ornl.gov/UNFCCC> (United Nations Framework Convention on Climate Change). Greenhouse Gas Inventory Database (GHG). Disponible en: <http://www.unfccc.de/resources/index.html>.
- Meneses E., C. A; Rozo M., L.V, y J. Franco S. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*. Año XVI, No 49, Diciembre de 2011. Universidad Tecnológica de Pereira.pp:116-121. ISSN 0122-1701
- Miller, T.L., Wolin, M.J. (1974). A serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27: p. 985-987.
- Milferstedt K., N. D. Youngblut y R.J. Whitaker.(2010). Spatial structure and persistence of methanogen populations in humic bog lakes. *The International Society for Microbial Ecology Journal* (2010) 4, 764–776
- Montiel C, V. (2016). TESIS “Identificación de metales contaminantes en vetiver expuesta a lixiviados de residuos sólidos urbanos de la Empresa pasa S.A.B. de C.V”. UJAT. Villahermosa, Tabasco. 61 pp.
- Morales H, S. C., (2016). TESIS “Determinación de metales en *Chrysopogon zizanioides* expuesta a lixiviados de Residuos Sólidos urbanos de dos Sitios de Disposición Final”. UJAT. Villahermosa, Tabasco. 91 pp.
- Moreira D, Amils R. (1997). Filogenia de *Thiobacillus cuprinus* y otros tiobacilos mixotróficos: propuesta para *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47 (2): 522–528. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-522>
- Morrison, D. (10 de diciembre de 2003). «Carl Woese and New Perspectives on Evolution». *Astrobiology: Life in the Universe*. NASA. Archivado desde el original el 24 de febrero de 2010. Consultado el 16 de febrero de 2010
- Narihiro T., Sekiguchi Y. (2015) Primers: Functional Genes and 16S rRNA Genes for Methanogens. In: McGenity T., Timmis K., Nogales B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg
- Neashkovskaya, OI, Kim, SB, Lysenko, AM et al. *Curr Microbiol* (2005) 51: 408. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0105-z>
- Nedashkovskaya OI 1, Kim SB, Lysenko AM, Kalinovskaya NI, Mikhailov VV, Kim IS, Bae KS. (2005) *Polaribacter butkevichii* sp. nov., una nueva bacteria mesofílica marina de la familia Flavobacteriaceae. *Curr Microbiol.* Diciembre de 2005; 51 (6): 408-12. Epub 2005 15 de octubre.
- Peter F. D., Yuryev A., Senin P., Smirnova A.V., Stott M.B., Hou Sh., Ly B., Saw J. H, Zhou Z., Ren Y., Wang J., Mountain B. W., Crowe M.A., Weatherby T.M., Bodelier P.L. E., Liesack W., Feng L., Wang L. & Alam M. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. Vol 450|6 December 2007|doi:10.1038/nature
- Petursdottir SK, Kristjansson JK (1997). *Silicibacter lacuscaerulensis* gen. nov., sp. nov., una bacteria mesófila moderadamente halófila característica del lago geotérmico Blue Lagoon en Islandia. *Extremófilos* 1, 94-9.

- Petursdottir, S. y Kristjansson, J. *Extremophiles* (1997) 1: 94. <https://doi.org/10.1007/s007920050020>
- Restrepo F, Restrepo J, Vargas L. (1978). *Química Básica, Medellín Vol 2, Ed Susaeta*,.
- Restrepo F, Restrepo J. (1992). *Química, Medellín Tomo II, Ed Susaeta*,
- Rodríguez, J.; Turmero, A.; Pérez L., M.I.; Hernández, M. ; Molina, J.M.; González-Sitges, J.B.; Costa, J.C.; González-Vila, F.J.; González- Pérez, J.A. y M.E. Arias.(2007). Análisis molecular de la biodiversidad microbiana en suelos de Andalucía afectados por incendios. *Wildfire*. Sevilla, España. 9p.
- Rooney A. P. Sweze J. L., Pukall B., Schumann P, & Spring S. 2011. Ezaki, T., Kawamura, Y., Li, N., Li, Z. Y., Zhao, L. & Shu, S. (2001). Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1521–1528. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2011), 61, 1962–1967
- Sadasivam, B.Y. & Reddy, K.R. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2014) 13: 79. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9325-zv>
- Sahm K., John P., Nacke H., Wemheuer B., Grote R., Daniel R., y G. Antranikian. (2013). High abundance of heterotrophic prokaryotes in hydrothermal springs of the Azores as revealed by a network of 16S rRNA gene-based methods. *Extremophiles* (2013) 17:649–662 DOI 10.1007/s00792-013-0548-2
- Secretaria de Gobernación. 30 de Agosto de 2013. Decreto por el que aprueba el Programa para Democratizar la Productividad 2013-2018. *Diario Oficial de la Federación*. Sexta Edición. Tomo DCCXIX. No.22. México, D.F.pp:93-128.
- SENER, *Estrategia Nacional de Energía 2013-2027*, México. 74p. <https://www.energiaadebate.com/wp-content/uploads/2013/02/ENE2013-2027.pdf>
- Song, L., Wang, Y., Tang, W. et al. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) 99: 6125. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6493-5>
- Subba Rao. (1999). *Soil Microbiology*. Front Cover. Nanjappa Shamanna. Science Publishers, - Technology & Engineering - 407 pages.
- Tokura, M; Ushida, K; Miyasak, K. y Y. Kojima. (1997). Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology*. 22, 137-143.
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., Jiang, B., (2017). Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production-A review, *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>
- Whitby, C; J. Earl; Lanyon, C; Gray,S; Robinson, J; Meadows J. y C. Edwards. (2004). The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP. *Journal of Applied Microbiology* 97, 973–984
- Whitman W.B., Bowen T.L., Boone D.R. (2014) *The Methanogenic Bacteria*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Zakharenko, A.S., Galachyants, Y.P., Morozov, I.V. et al. *Microb Ecol* (2019) 78: 269. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1299-5>

8. ANEXOS

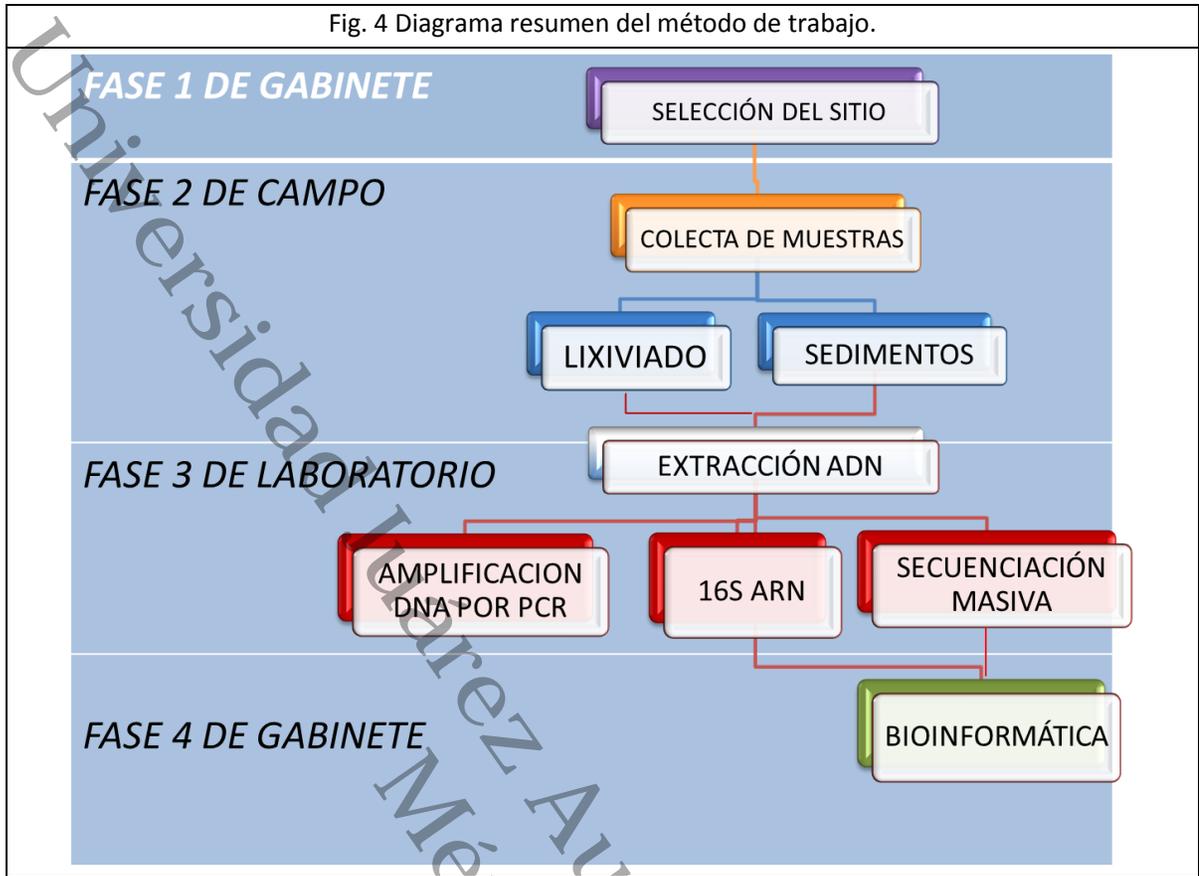


Fig. 5 Relleno Sanitario de Villahermosa, Tabasco.



Fig. 6 Relleno sanitario de León, Guanajuato



Fig. 7 Colecta de Lixiviados en León, Guanajuato.

Coleccta de 2 Pozos en zon baja en León, Guanajuato. 26 de Junio de 2018.

Pozo 56

Pozo 81

Canales	Ajustado	Inicial	Previo	Unidad	Canales	Ajustado	Inicial	Previo	Unidad
CH4	49.6	49.6	44.8	%	CH4	49.6	49.6	44.8	%
CO2	37.5	37.5	34.0	%	CO2	37.5	37.5	34.0	%
O2	2.0	2.0	3.1	%	O2	2.0	2.0	3.1	%
Bal	10.9	10.9	18.1	%	Bal	10.9	10.9	18.1	%
Static. P.	0.13	-1.73	-2.51	"H ₂ O	Static. P.	0.12	-1.73	-2.51	"H ₂ O
Diff. P.	0.10	1.738	-0.046	"H ₂ O	Diff. P.	0.005	1.738	-0.046	"H ₂ O
Temp	96.1	101.3	0.0	°F	Temp	97.2	101.3	0.0	°F
Flow	5.8	83.1	****	SCFM	Flow	4.0	83.1	****	SCFM
Power	174.8	2499.6	****	E3btu/h	Power	119.8	2499.6	****	E3btu/h



Fig. 8 Colecta de Lixiviados en León, Guanajuato.

Relleno sanitario de León, Guanajuato. 26 de Junio de 2018.

Colecta 3 Pozos Zona Cima

Pozo 104					Pozo 100					Pozo 121				
Canales	AJUSTADO	Inicial	Previo	Unidad	Canales	Ajustado	Inicial	Previo	Unidad	Canales	Ajustado	Inicial	Previo	Unidad
CH4		56.3	55.3	%	CH4		0.2	0.1	%	CH4		5.1	0.1	%
CO2		42.8	42.0	%	CO2		0.0	0.0	%	CO2		31.5	0.0	%
O2		0.7	2.6	%	O2		15.8	15.7	%	O2		3.5	15.7	%
Bal		0.0	0.0	%	Bal		83.9	84.2	%	Bal		14.0	84.2	%
STATIC. P.		0.110	-1.18	"H ₂ O	STATIC. P.		0.08	****	"H ₂ O	STATIC. P.		0.08	****	"H ₂ O
Diff. P.		102.5	0.003	"H ₂ O	Diff. P.		0.018	****	"H ₂ O	Diff. P.		0.016	****	"H ₂ O
Temp		20.3	0.0	°F	Temp		103.7	****	°F	Temp		101.3	****	°F
Flow		697.4	3.7	SCFM	Flow		0.0	****	SCFM	Flow		0.0	****	SCFM
Power			124.7	E3btu/h	Power			****	E3btu/h	Power			****	E3btu/h



Muestras Planta de Tratamiento de Lixiviados



Planta de Tratamiento (PTR) fase:

- Pilareceptora,
- Aireación
- S/Aireación ó ionización



Fig. 9 Colecta de sedimentos en Villahermosa, Tabasco.

Relleno sanitario de León, Villahermosa, Tabasco. 29 de Octubre de 2018.

POZOS TERMINADOS (3 AÑOS, % CH4 10-15%)

Pozo 5

Pozo 6



Pozo A

POZOS EN PROCESO

Pozo B



LAGUNA DE OXIDACIÓN



Fig. 9 Extracción de adn de las muestras de león, guanajuato.

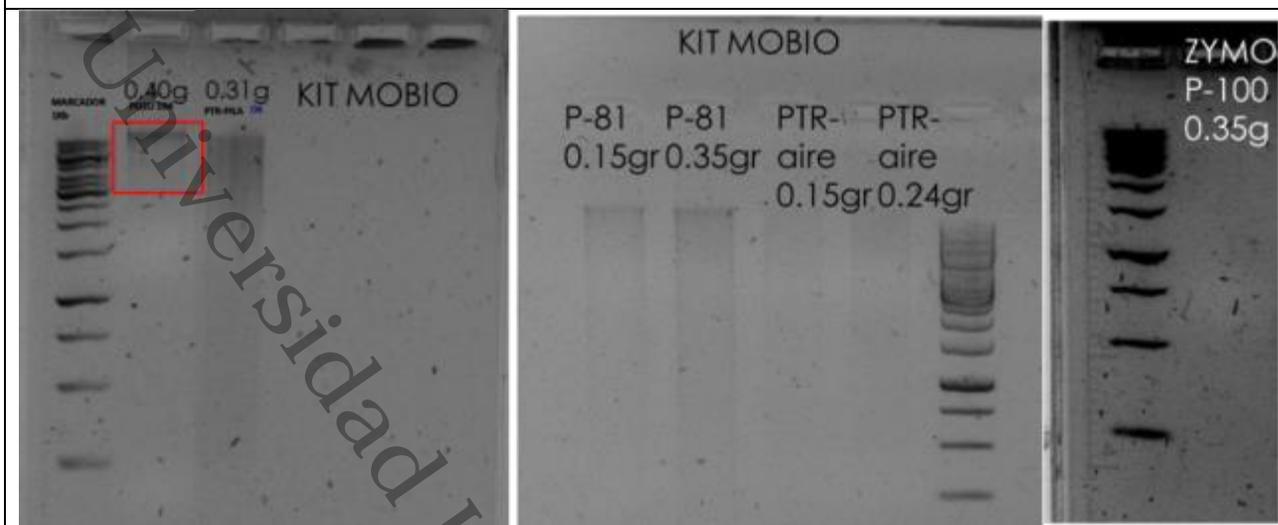


FIG. 10 EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE LEÓN, GUANAJUATO.

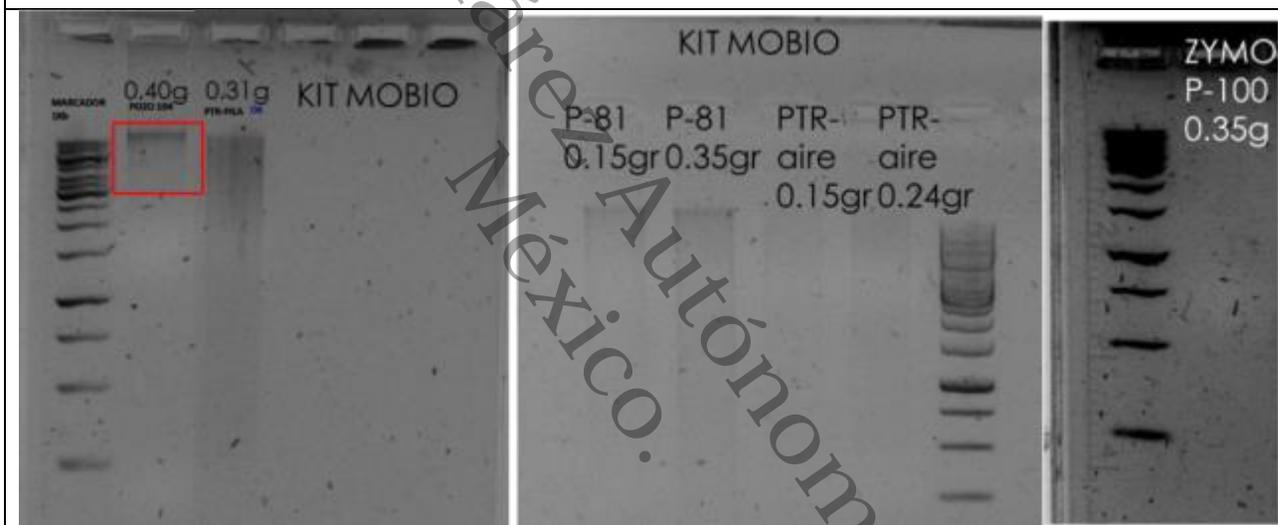


Tabla 3.-Géneros diagnosticados en los diferentes pozos.

POZO 5	% Lecturas totales	POZO 81	% Lecturas totales	POZO 104	% Lecturas totales
<i>Unclassified</i>	55.23 %	<i>Unclassified</i>	65.07 %	<i>Unclassified</i>	48.39 %
<i>Chryseobacterium</i>	5.42 %	<i>Methanobacterium</i>	15.31 %	<i>Methanoculleus</i>	23.35 %
<i>Pseudomonas</i>	4.33 %	<i>Methanosaeta</i>	7.15 %	<i>Methanimicrococcus</i>	11.12 %
<i>Ruegeria</i>	2.89 %	<i>Thermoanaerobacter</i>	1.83 %	<i>Desulfurococcus</i>	7.78 %
<i>Flavobacterium</i>	2.17 %	<i>Methanoculleus</i>	1.62 %	<i>Methanobacterium</i>	1.54 %
<i>Methanoculleus</i>	1.81 %	<i>Methanosphaera</i>	0.90 %	<i>Peptoniphilus</i>	1.03 %
<i>Sphingomonas</i>	1.81 %	<i>Methanofollis</i>	0.76 %	<i>Thermoanaerobacter</i>	0.78 %
<i>Phaeobacter</i>	1.44 %	<i>Desulfurococcus</i>	0.50 %	<i>Dethiosulfovibrio</i>	0.72 %

Tabla 4.- Especies diagnosticadas en los diferentes pozos.

POZO 5	% Lecturas totales	POZO 81	% Lecturas totales	POZO 104	% Lecturas totales
<i>Unclassified</i>	79.78	<i>Unclassified</i>	72.38	<i>Unclassified</i>	74.12
<i>Ruegeria lacuscaerulensis</i>	2.89	<i>Methanobacterium kanagiense</i>	11.70	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	15.27
<i>Methanoculleus receptaculi</i>	1.81	<i>Methanosaeta pelágica</i>	6.93	<i>Methanoculleus palmolei</i>	4.62
<i>Polaribacter butkevichii</i>	1.08	<i>Metanocolleus receptaculi</i>	1.57	<i>Peptoniphilus methioninivorax</i>	1.01
<i>Chryseobacterium culicis</i>	1.08	<i>Methanobacterium uliginosum</i>	1.15	<i>Methanimicrococcus blatticola</i>	0.71
<i>Lewinella lutea</i>	0.72	<i>Methanosphaera cuniculi</i>	0.89	<i>Methanobacterium kanagiense</i>	0.62
<i>Xanthobacter polyaromaticivorans</i>	0.72	<i>Methanofolis ethanolicus</i>	0.76	<i>Peptococcus niger</i>	0.57
<i>Thiomonas thermosulfata</i>	0.72	<i>Methanocorpusculum parvum</i>	0.42	<i>Methanobacterium beingense</i>	0.26