



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

# **MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

## **AISLAMIENTO DE BACTERIAS METANÓTROFAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)**

**Autor: D. Juan Gancedo Verdejo**

Tutor: D<sup>a</sup>. Rebeca Pérez Fernández

Tutor: D. Raúl Muñoz Torre

Valladolid, septiembre 2018



## RESUMEN

---

En la actualidad el metano en emisiones diluidas supone un gran problema medioambiental, con gran influencia sobre el efecto invernadero y el cambio climático. Su eliminación y aprovechamiento para la fabricación de productos de alto valor añadido está cobrando especial interés en el campo de la investigación actual. Entre estos productos encontramos el polihidroxibutirato (PHB), un polihidroxicanoato sintetizado por algunas bacterias metanótrofas bajo limitación de nutrientes y con el que se pueden fabricar plásticos biodegradables. Muchas de esas bacterias aún no han sido aisladas y catalogadas. En este ámbito se centra nuestro estudio, que busca aislar, identificar e investigar nuevas cepas de bacterias metanótrofas productoras de PHBs.

Partiendo de *Sphagnum* mixto y lodo de depuradora se realizó un enriquecimiento selectivo a 37°C de bacterias metanótrofas capaces de sintetizar PHB. Se obtuvieron un total de 28 aislados, de los cuales solo 17 fueron capaces de crecer en presencia de metano a 37°C. La secuenciación del gen rRNA 16S de 11 aislados reveló la existencia de 2 cepas puras.

El presente estudio ha logrado obtener cepas puras de *Cupriavidus metallidurans* y *Cupriavidus plantarum*.

**Palabras clave:** Aislamiento, *Cupriavidus metallidurans*, *Cupriavidus plantarum*, Metanótrofo, PHB, *Sphagnum*.

---



---

## ABSTRACT

---

Nowadays, methane in diluted emissions represents a huge environmental problem with influence on greenhouse effect and climate change. CH<sub>4</sub> abatement and valorization to produce high added value products is attracting an increasing relevance among the scientific community. One of these products is the polyhydroxybutyrate (PHB), a polyhydroxyalkanoate synthesized by some methanotrophic bacteria under nutrient limiting conditions that can be used to produce biodegradable plastics. Many of these PHB-accumulating bacteria have not been yet isolated and identified. Therefore, this study focused on the isolation, identification and investigation of new strains of PHB producer bacteria.

Based on a mixed *Sphagnum* and sewage sludge, a selective enrichment of PHB producer methanotrophic bacteria was carried out at 37 °C. Subsequently, 28 strains were isolated in solid medium, 17 of them being able to grow in the presence of methane at 37°C. The sequencing of the 16S rRNA gen of 11 isolates revealed the presence of 2 pure bacterial strains.

The current study successfully obtained pure strains of *Cupriavidus metallidurans* and *Cupriavidus plantarum*.

**Key words:** *Cupriavidus plantarum*, *Cupriavidus metallidurans*, isolation, methanotrophs, PHB, *Sphagnum*.

---



## **DEDICATORIA**

---

*A Sara Sánchez García*

---



## **AGRADECIMIENTOS**

---

A Rebeca Pérez Fernández y Raúl Muñoz Torre por su tiempo y acertada dirección del presente Trabajo Fin de Máster.

A Elisa Rodríguez Rodríguez y Sergio Bordel Velasco por su estrecha colaboración en la realización del mismo.

Y a todos los compañeros del Máster, en especial a Sandra Pastor Gutiérrez y María Eugenia Tapia Martín, por su inestimable apoyo.

---



# ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. El metano: problemática medioambiental.....	1
1.2. Bacterias metanótrofas .....	2
1.2.1. Oxidación del metano.....	3
1.2.2. Crecimiento de metanótrofos.....	5
1.3. Aislamiento de metanótrofos.....	6
1.4. Polihidroxi alcanoatos (PHAs).....	8
1.4.1. Producción de PHAs.....	8
1.4.2. Tipos de PHAs .....	10
1.4.3. Polihidroxi butirato (PHB).....	11
1.5. Perspectiva .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1. Medios minerales de cultivo .....	17
3.1.1. Medio Whittenbury A. ....	17
3.1.2. Medio Whittenbury B. ....	18
3.2. Generación y seguimiento de las atmósferas .....	19
3.2.1. Desplazamiento con oxígeno.....	19
3.2.2. Desplazamiento con mezcla de metano y oxígeno.....	20
3.2.3. Seguimiento de la atmósfera .....	20
3.3. Inóculo .....	21
3.4. Enriquecimiento y cultivo del inóculo. ....	21
3.5. Crecimiento en placas .....	22
3.6. Obtención de un aislado.....	22
3.7. Enriquecimiento de los aislados .....	23
3.8. Secuenciación .....	24
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.1. Seguimiento de los aislados en placa .....	27
4.1.1. Contaminación de los cultivos.....	28
4.1.2. Cuarto pase.....	29
4.1.3. Quinto pase: Aislados .....	30
4.2. Degradación del metano y producción de CO <sub>2</sub> .....	34
4.3. Producción de PHB .....	36
4.4. Secuenciación de los aislados.....	36
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>45</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>51</b>
8.1. ANEXO 1. Calibrado cromatógrafo de gases .....	51
8.2. ANEXO 2. Controles abióticos.....	53

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resumen de la ruta catabólica de oxidación del metano y conexión con la ruta anabólica ...	4
<b>Figura 2.</b> Ruta anabólica de la ribulosa monofosfato (Metanótrofos Tipo I).....	4
<b>Figura 3.</b> Ruta anabólica de la serina (Metanótrofos Tipo II).....	5
<b>Figura 4.</b> Proceso general de aislamiento de microorganismos que forman colonias aisladas .....	7
<b>Figura 5.</b> Esquema de acumulación de PHA ante situaciones de estrés .....	9
<b>Figura 6.</b> Fotografía al microscopio electrónico de unos gránulos de PHA de <i>Alcaligenes eutrophus</i> .10	
<b>Figura 7.</b> Granulo de PHA.....	10
<b>Figura 8.</b> Formula genérica de los polihidroxicanoatos .....	10
<b>Figura 9.</b> Formula del Polihidroxibutirato (PHB). .....	11
<b>Figura 10.</b> PHB extraído de <i>Azotobacter sp.</i> crecido en medio con 3% glucosa y de <i>E. Coli</i> recombinante (contiene los genes de PHA de la <i>Azotobacter sp.</i> ) crecida en medio con 2.5% de lactosa .....	12
<b>Figura 11.</b> Proceso de gelificación del medio mineral sobre placas Petri. ....	18
<b>Figura 12.</b> Esquema del desplazamiento del espacio de cabezas de los botes con oxígeno.....	20
<b>Figura 13.</b> Esquema del desplazamiento del espacio cabezas de las cámaras con una mezcla previamente preparada. ....	20
<b>Figura 14.</b> Reactor y cámara usados en el crecimiento de los cultivos .....	22
<b>Figura 15.</b> Sembrado por agotamiento sobre placa Petri con medio sólido.....	23
<b>Figura 16.</b> Botes de 120 ml empleados en el enriquecimiento de los aislados .....	24
<b>Figura 17.</b> Pellet de biomasa tras la centrifugación en tubo Falcon .....	24
<b>Figura 18.</b> Programa del termociclador.....	25
<b>Figura 19.</b> Fotografía de la contaminación en el quinto pase de los Aislados 1 (A), 4 (B), 14 (C) y 25 (D).....	29
<b>Figura 20.</b> Fotografías al microscopio de la placa 18 en el cuarto pase.....	30
<b>Figura 21.</b> Fotografía al microscopio del aislado 16. ....	30
<b>Figura 22.</b> Fotografías al microscopio del aislado 7.....	31
<b>Figura 23.</b> Fotografías al microscopio del aislado 8.....	31
<b>Figura 24.</b> Fotografías al microscopio del aislado 10. ....	31
<b>Figura 25.</b> Fotografías al microscopio del aislado 9.....	32
<b>Figura 26.</b> Fotografías al microscopio del aislado 20. ....	32
<b>Figura 27.</b> Fotografías al microscopio del aislado 11. ....	32
<b>Figura 28.</b> Fotografías al microscopio del aislado 4.....	33
<b>Figura 29.</b> Fotografías al microscopio del aislado 22. ....	33
<b>Figura 30.</b> Fotografías al microscopio del aislado 26. ....	33
<b>Figura 31.</b> Evolución del CO <sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 1 al 7. ....	34
<b>Figura 32.</b> Evolución del CO <sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 8 al 14. ....	35
<b>Figura 33.</b> Evolución del CO <sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 15 al 21.....	35
<b>Figura 34.</b> Evolución del CO <sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 22 al 28.....	35
<b>Figura 35.</b> Resumen del informe del gen que codifica la enzima MMO en <i>Cupriavidus necator</i> . Captura de pantalla del NCBI.....	40
<b>Figura 36.</b> Recta de calibrado del cromatógrafo para el metano. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas. ....	51
<b>Figura 37.</b> Recta de calibrado del cromatógrafo para el dióxido de carbono. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas. ....	51
<b>Figura 38.</b> Recta de calibrado del cromatógrafo para el oxígeno. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas. ....	52
<b>Figura 39.</b> Evolución del espacio de cabezas del control abiótico 1. ....	53
<b>Figura 40.</b> Evolución del espacio de cabezas del control abiótico 2. ....	53

# 1. INTRODUCCIÓN

---

La ingeniería y biotecnología ambiental tratan de subsanar los efectos antropogénicos sobre el medio ambiente que desequilibran los ciclos biogeoquímicos de la biosfera. Uno de los ciclos más importantes es el de los compuestos carbonados, con gran influencia sobre el efecto invernadero y el cambio climático. En los últimos años diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda y mejora de tecnologías que transformen desechos carbonados en derivados policarbonados de alto valor añadido (Blasco y Castillo, 2014; Cantera *et al.*, 2017).

## 1.1. EL METANO: PROBLEMÁTICA MEDIOAMBIENTAL.

Entre estos residuos carbonados se encuentra el metano, un gas producido por la digestión anaerobia de materia orgánica. Posee un gran potencial de efecto invernadero (25 veces superior al del dióxido de carbono en un horizonte de 100 años), contribuyendo entre un 15 y 20% al total de los gases de efecto invernadero (Cantera *et al.*, 2017; Desai y Harvey, 2017). Su concentración atmosférica ha aumentado en un 162% en los últimos 250 años (Desai y Harvey, 2017), siendo actualmente de 0,2-1% su tasa de crecimiento anual (Rusmana y Akahadiya, 2009; Cantera *et al.*, 2017). La concentración atmosférica resulta del balance entre el metano que se emite de forma natural (metanogénesis) y antropogénica (que representa el 60%); y el que se oxida biológicamente (metanótrofos) y químicamente (Rodríguez Plaza; 2017).

El metano es un gas con alto valor energético que se puede emplear como combustible. Sin embargo, solo es inflamable a concentraciones entre 5 y 15%v de metano en aire (Cashdollar *et al.*, 2000). Para que su aprovechamiento energético sea rentable, debe presentar concentraciones superiores al 30-45%, y, aun así, se suelen emplear procesos de purificación para alcanzar valores superiores al 95% (Al Seadi *et al.*, 2008; Cantera *et al.*, 2017). En la actualidad diversas investigaciones se centran en tratamientos físicos, químicos o biológicos para la purificación y concentración del metano de forma que sea factible su aprovechamiento energético (Girard *et al.*, 2011).

No obstante, el 56% de las emisiones de CH<sub>4</sub> son diluidas, con concentraciones inferiores a las inflamables, por lo que habitualmente son liberadas

a la atmósfera sin tratamiento previo (Cantera *et al.*, 2016). En estos bajos intervalos de concentración la oxidación microbiana por parte de bacterias constituye una herramienta de gran relevancia, pues se convierte en la principal forma de regulación y eliminación del metano. Diversas investigaciones se centran en el aprovechamiento microbiológico del metano. Esto es debido a que gran cantidad de bacterias consumen metano. A modo de ejemplo, los organismos metanótrofos del suelo pueden llegar a consumir entre un 1 y 10% de las emisiones naturales (Dianou y Adachi, 1999), y son potencialmente utilizables para transformarlo en compuestos de alto valor añadido bajo determinadas condiciones de crecimiento (Cantera *et al.*, 2017). Por consiguiente, el aislamiento y caracterización de este tipo de bacterias presentan un gran interés en el ámbito de la biotecnología ambiental e industrial (Blasco y Castillo, 2014).

## 1.2. BACTERIAS METANÓTROFAS

Los metanótrofos son un grupo de bacterias con la capacidad exclusiva de utilizar el metano como fuente de carbono y energía. Se engloban dentro de las metilótrofas, aquellas que consumen compuestos orgánicos reducidos de un solo átomo de carbono (metano, metanol, halometanos, aminas metiladas...) (Hanson y Hanson, 1996).

Se puede encontrar bacterias metanótrofas en casi cualquier ambiente en el que se propicien condiciones anaerobias o ligeramente anaerobias con producción de metano: zonas encharcadas, humedales, arrozales, diversos tipos de suelos, rizosferas, volcanes, zonas hidrotermales del océano, zonas de musgos, fangos de depuradoras, etc. (Kip *et al.*, 2011).

El primer metanótrofo fue aislado en 1906, pero la verdadera investigación de estas bacterias se remonta a 1970, cuando Whittenbury *et al.* (1970), considerados los padres de los metanótrofos, aislaron, identificaron y caracterizaron más de 100 cepas distintas.

Las bacterias metanótrofas se clasifican atendiendo, entre otros, a la ruta metabólica de fijación del carbono (Dianou y Adachi, 1999):

- Tipo I ( $\gamma$ -Proteobacteria): Siguen ruta de la ribulosa monofosfato. Comprende principalmente los géneros *Methylosomas*, *Methylobacter*, *Methylococcus* y *Methylomicrobium*.

- Tipo II ( $\alpha$ -Proteobacteria). Siguen la ruta de la serina. Incluye fundamentalmente los géneros *Methylosinus*, *Methylocella* y *Methylocystis*.
- Tipo X: Aúnan características de Tipo I y II. Abarca algunas especies de *Methylococcus*.

En general, los Tipo I se muestran más dinámicos y con mayor crecimiento cuando las condiciones son favorables. Los Tipo II, por el contrario, se adaptan mejor a condiciones desfavorables, tales como la carencia de nitrógeno (Shrestha *et al.*, 2010) o a bajas concentraciones de metano (Hanson y Hanson, 1996; Wise *et al.*, 1999; Shrestha *et al.*, 2010).

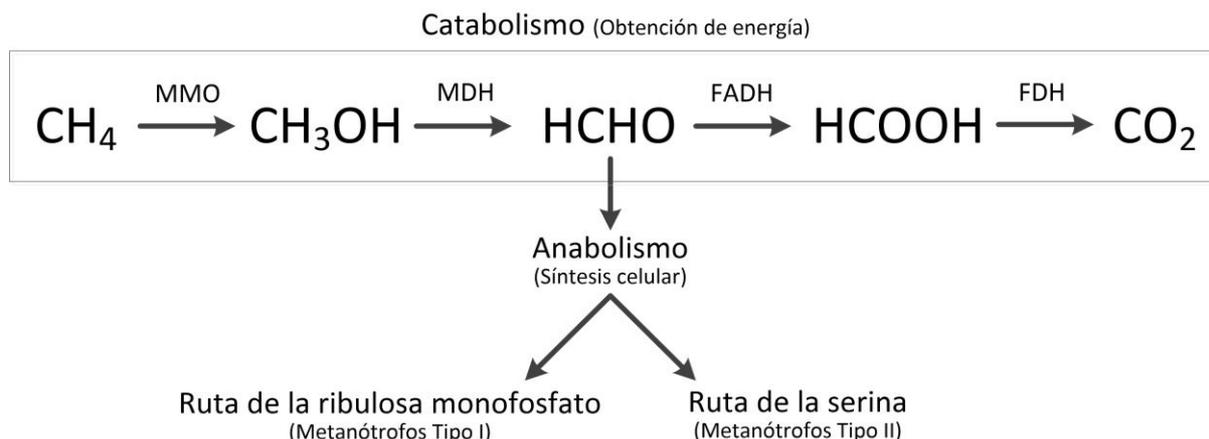
### 1.2.1. Oxidación del metano

Las bacterias metanótrofas son capaces de oxidar el metano a dióxido de carbono y agua para obtener energía a través de reacciones enzimáticas en un metabolismo aerobio obligado: Partiendo del metano ( $\text{CH}_4$ ) lo oxidan a metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), formaldehído ( $\text{HCHO}$ ), ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) y, por último, dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (**Figura 1**).

El paso crítico del proceso y, generalmente, el limitante, es la oxidación del metano a metanol, llevada a cabo por la enzima metano-monooxigenasa (MMO), en sus dos posibles formas:

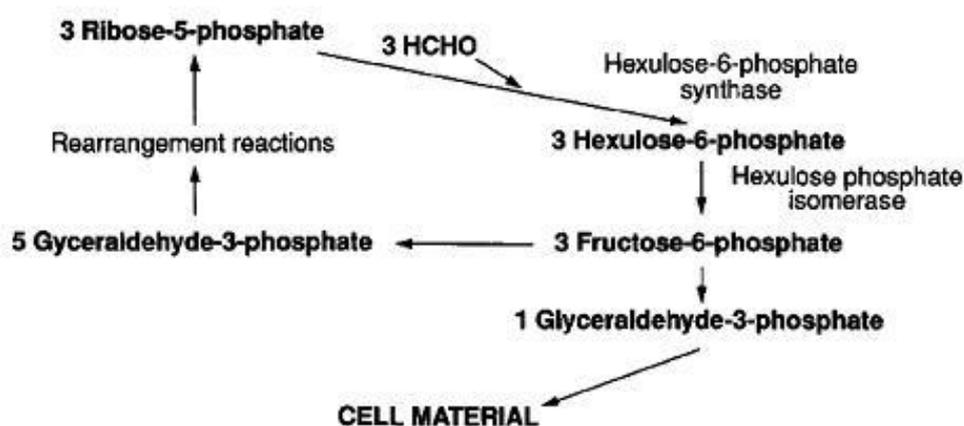
- Ligada a la membrana (pMMO): Se puede encontrar tanto en metanótrofos Tipo I como Tipo II.
- Soluble (sMMO): Se encuentra principalmente en Tipo II, si bien, también ha sido hallada en algunos géneros de Tipo I.

La MMO rompe el enlace del oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ). Uno de los átomos radicales de oxígeno ( $\text{O}^\cdot$ ) se reduce a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), y el otro se liga al metano para formar metanol.



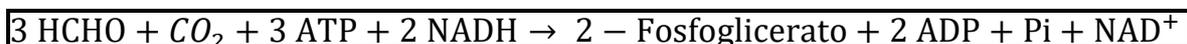
**Figura 1.** Resumen de la ruta catabólica de oxidación del metano y conexión con la ruta anabólica (MMO: Metano-monooxigenasa; MDH: Metanol-deshidrogenasa; FADH: Formaldehído-deshidrogenasa; FDH: Formiato-deshidrogenasa). Basado en Acha *et al.* (2002) y Hanson y Hanson (1996).

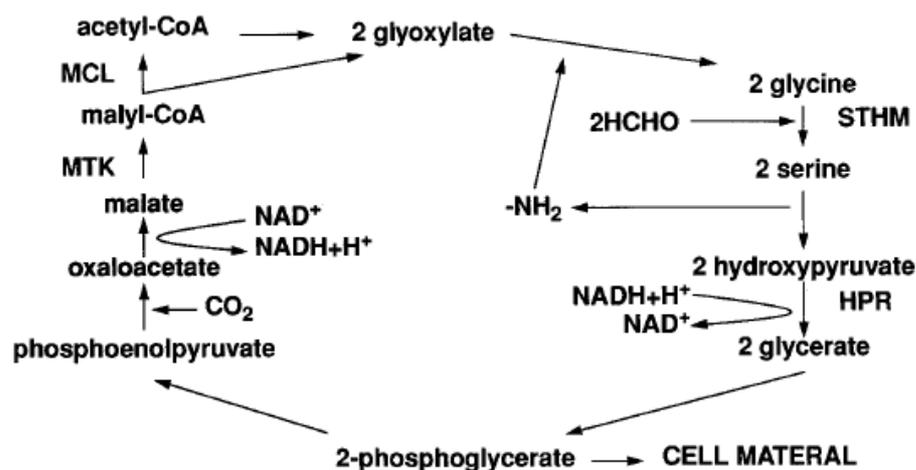
El formaldehído actúa como intermedio de reacción entre el catabolismo y anabolismo. Es en este paso cuando los metanótrofos Tipo I y Tipo II difieren sus rutas de fijación del carbono (Hanson y Hanson, 1996). Los metanótrofos Tipo I siguen la ruta metabólica de la ribulosa monofosfato (**Figura 2**), que se puede resumir en la siguiente reacción:



**Figura 2.** Ruta anabólica de la ribulosa monofosfato (Metanótrofos Tipo I). Extraído de Hanson y Hanson (1996).

Por el contrario, los metanótrofos Tipo II siguen la ruta de la serina (**Figura 3**):





**Figura 3.** Ruta anabólica de la serina (Metanótrofos Tipo II). Extraído de Hanson y Hanson (1996).

### 1.2.2. Crecimiento de metanótrofos

En condiciones experimentales el crecimiento de metanótrofos se realiza en medios minerales con compuestos y concentraciones específicas que favorecen su desarrollo. El compuesto esencial es el nitrógeno. Se puede proporcionar en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Medio NMS, *Nitrate Mineral Salts*), o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Medio AMS, *Ammonium Mineral Salts*) (Whittenbury *et al.*, 1970). Sin embargo, se desaconseja el uso del amonio, pues se trata, también, de un sustrato la MMO, que lo transforma en hidroxilamina, ejerciendo una inhibición competitiva sobre el metano. Concentraciones de cloruro de amonio superiores al 0.5 g/L se consideran inhibitorias. Otras teorías sugieren que la oxidación del metano es un proceso estrechamente relacionado a la reducción del nitrógeno, azufre, hierro o manganeso. Si el nitrógeno se encuentra en forma de amoniaco no se puede emplear como agente oxidante, disminuyendo la actividad metabólica (Blasco y Castillo, 2014). Además, el consumo de amonio del medio conlleva un señalado cambio en el pH, que puede descender hasta valores de 5 e inhibir el crecimiento bacteriano. Los nitratos no poseen influencia sobre el pH, el cual se mantendrá cercano a la neutralidad (Hazeu y Steennis, 1970; Whittenbury *et al.*, 1970).

El crecimiento debe realizarse siempre en presencia de metano. La actividad metabólica de los microorganismos metanótrofos aumenta con la concentración de  $\text{CH}_4$  (Hanson y Hanson, 1996; Cantera *et al.*, 2017). Generalmente se suele aportar metano en exceso para favorecer un rápido crecimiento. En bibliografía podemos encontrar valores muy variables: 50% metano y 50% aire (Rusmana y Akahadiya,

2009); 20% metano, 5% dióxido de carbono, 75% aire (Heyer *et al.*, 2002); 25% de metano (Ho *et al.* 2013); 18% metano (Dianou y Adachi, 1999).

Se han reportado como condiciones óptimas para el crecimiento de metanótrofos temperaturas entre 25 y 35°C y pH's entre 6.6 y 6.8 (Whittenbury *et al.*, 1970), 6.3 y 6.8 (Dianou y Adachi, 1999), aun pudiendo crecer entre 5.8 y 7.4. Para mantener el pH en torno a valores óptimos, se suele hacer uso de buffers o sistemas de control automático de pH.

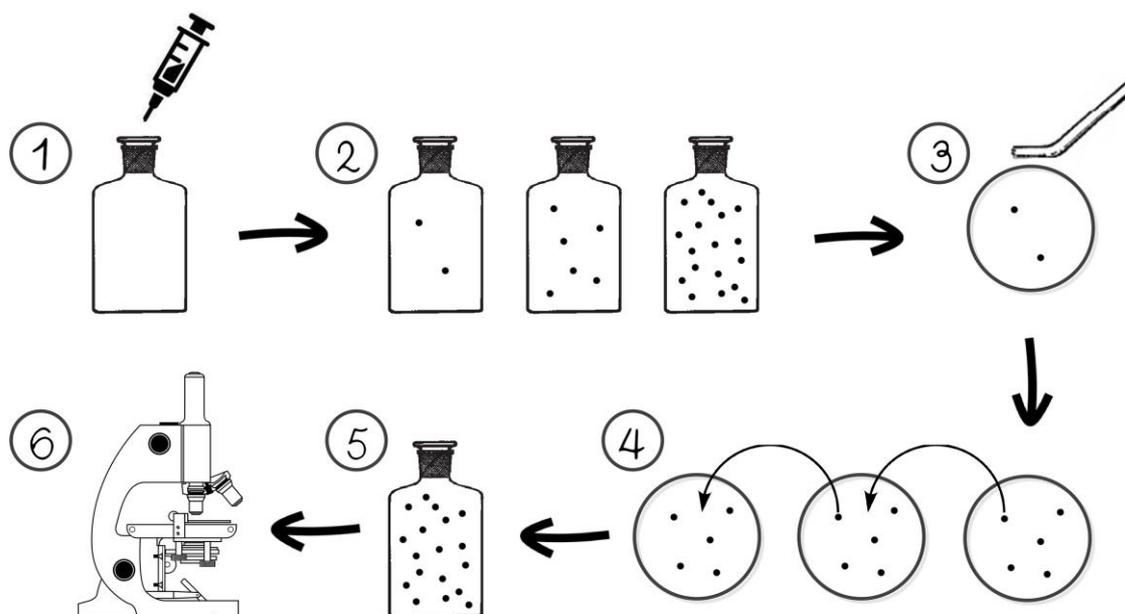
### 1.3. AISLAMIENTO DE METANÓTROFOS

En Microbiología cuando se desea estudiar una especie de microorganismo (identificación, caracterización, estudios bioquímicos, inmunológicos...), como puede ser una bacteria metanótrofa, es preciso hacer crecer, bajo condiciones experimentales específicas, un cultivo puro.

Un cultivo puro o axénico es aquel formado por una sola especie, sin interacción con otras. En un hábitat natural los microorganismos se encuentran formando cultivos mixtos, por lo que es necesario, primeramente, conseguir un aislado.

El aislamiento es el procedimiento de obtención de una cepa pura a partir de una única colonia de un cultivo mixto. Cuando los microorganismos forman colonias discretas sobre medios sólidos (gran variedad de bacterias, arqueas, levaduras, hongos y algas unicelulares), como es el caso de gran cantidad de bacterias metanótrofas, el aislamiento se lleva a cabo por selección y cultivo de colonias sobre placa (Stanier, 1996). El procedimiento consta de las siguientes etapas (**Figura 4**):

1. Inoculación de un consorcio de especies en medio líquido.
2. Enriquecimiento del inóculo (aumento de la biomasa degradadora de un sustrato específico).
3. Cultivo del inóculo sobre placas con medio sólido.
4. Selección de colonias y repiques sucesivos a diversas placas.
5. Enriquecimiento de la colonia presuntamente aislada en medio líquido.
6. Comprobación del aislado, secuenciación del genoma y análisis de resultados.



**Figura 4.** Proceso general de aislamiento de microorganismos que forman colonias aisladas.

En este procedimiento los medios sólidos se emplean para la selección de colonias; y los líquidos para enriquecimiento de cultivos, dado que favorecen un rápido crecimiento bacteriano.

Las probabilidades de lograr un aislado son superiores cuantas más réplicas en placas se efectúen y si se lleva a cabo cuando las colonias son aún pequeñas. De esta forma se evita, en mayor medida, el arrastre de otras colonias. Whittenbury *et al.* (1970) y Dianou y Adachi (1999) aconsejan realizar los pases de bacterias metanótrofas cuando las colonias tengan un diámetro en torno a 0,2 mm, siendo estas visibles entre los 5 y 7 días de incubación. La frecuencia puede variar ligeramente, 8 días (Wise *et al.*, 1999), 5 o 6 días (Rusmana y Akahadiya 2009).

Su cultivo en placas conviene realizarse por estriados. De esta forma las primeras estrías mostrarán un crecimiento confluyente mientras que las últimas un crecimiento más disperso. Este procedimiento permitirá seleccionar una colonia aislada del resto.

La identificación de un metanótrofo puede llevarse a cabo analizando su gen RNA ribosomal 16S al completo, donde se obtendría la especie concreta. O bien, si solo se quiere determinar si es metanótrofo, a partir de la detención de un gen

funcional, como pueden ser los genes que codifican la enzima metano-monooxigenasa (Kip *et al.*, 2011).

En las últimas décadas, el uso del gen rRNA 16S ha permitido la identificación de microorganismos de forma rápida y precisa, debido al aumento de las bases de datos del gen (Wise *et al.*, 1999).

#### **1.4. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)**

Uno de los productos de alto valor añadido que son capaces de sintetizar algunas bacterias metanótrofas son los polihidroxiálcanoatos o ácidos polihidroxiálcanoicos (PHAs). Los PHAs son poliésteres con multitud de aplicaciones en agricultura, industria de polímeros, medicina, etc. (Koller, 2016).

Una de sus utilidades es la producción de bioplásticos con las mismas propiedades que un plástico convencional proveniente de fuentes no renovables (transparencia, impermeabilidad, flexibilidad, elasticidad, resistencia y estabilidad) pero con la ventaja de ser biodegradables y biocompatibles.

Se han identificado más de 300 especies de bacterias productoras de PHAs, existiendo, todavía, muchas de ellas sin identificar. Se estima que en el suelo podemos encontrar un 30% de bacterias capaces de sintetizar algún tipo de PHA (Lee, 1996; García Hidalgo; 2014).

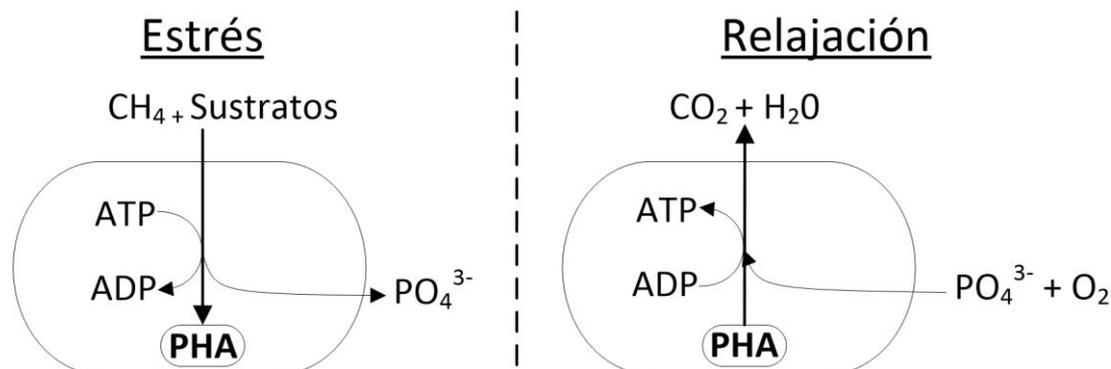
##### **1.4.1. Producción de PHAs**

Algunas bacterias son capaces de almacenar PHA de forma natural (Rodríguez Plaza, 2017). Sin embargo, en su mayoría, las bacterias acumulan PHA como reservorio de energía y fuente de carbono ante situaciones de “estrés”, tales como: condiciones extremas debido a algún factor ambiental o a la falta de algún sustrato vital (nitrógeno, azufre, fósforo o magnesio) (Babel y Steinbüchel, 2001; Scheper *et al.*, 2008; Karthikeyan *et al.*, 2015). Realizan este proceso para emplear más adelante la fuente de carbono que en ese momento no pueden utilizar.

Cuando las condiciones vuelven a ser favorables o de “relajación” degradan el PHA a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O para obtención de energía y precursores para el anabolismo como acetyl-CoA (**Figura 5**). Esto les permite un rápido crecimiento y reproducción al evitar la etapa limitante de su metabolismo (la oxidación de metano a metanol por la MMO). Una bacteria que ha acumulado PHA pueden llevar a cabo hasta dos

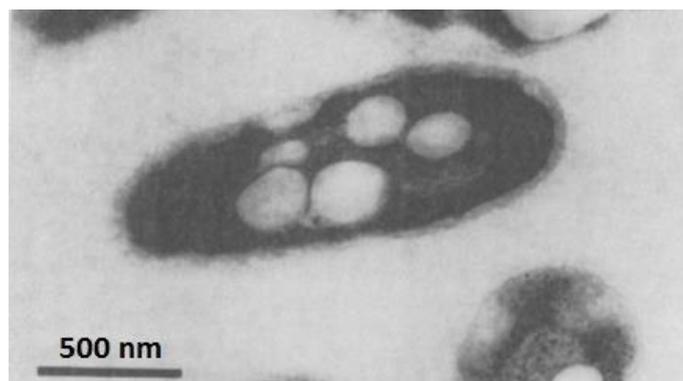
ciclos de división celular más que otra de la misma especie que no; e incluso retrasar su muerte celular (García Hidalgo; 2014).

Por ende, la acumulación de PHA supone una ventaja evolutiva otorgando gran resistencia y permitiendo mantener su metabolismo a alto rendimiento incluso en entornos cambiantes, extremos, con falta de sustratos o muy competitivos.

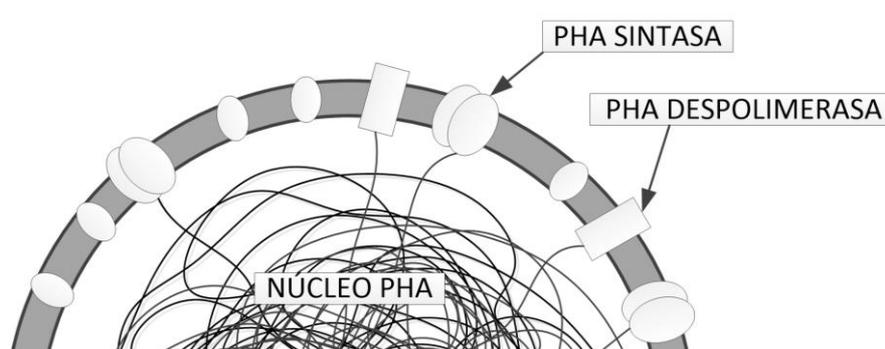


**Figura 5.** Esquema de acumulación de PHA ante situaciones de estrés. Basado en Escaler y Sahuquillo, 2001; Bueno *et al.*, 1997; Horan, 1989; Van Haandel y Van Der Lubbe, 2012.

El almacenamiento de los PHAs en las células se lleva a cabo en una o varias inclusiones citoplasmáticas de PHA (**Figura 6**). Poseen un diámetro entre 100 y 500 nm y pueden llegar a suponer un porcentaje importante en el peso de la célula, reportándose hasta un 96% del peso seco total (Byrom, 1991; García Hidalgo; 2014). El gránulo se encuentra recubierto por una capa superficial monofosfolipídica de 4 nm de grosor. Asociadas a ella se encuentran dos proteínas: la PHA sintasa y la PHA despolimerasa (**Figura 7**), que sintetizan y catabolizan, respectivamente, PHA, en función de las necesidades de la célula y la situación ambiental en la que se encuentre (García Hidalgo; 2014).



**Figura 6.** Fotografía al microscopio electrónico de unos gránulos de PHA de *Alcaligenes eutrophus*. Extraído de Byrom (1991).

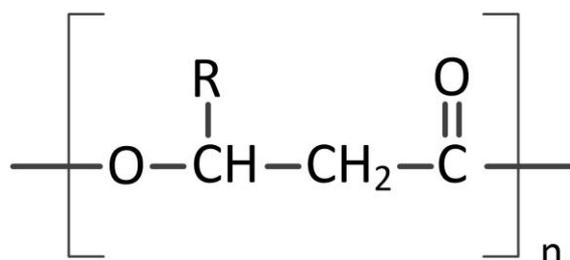


**Figura 7.** Granulo de PHA. Basado en García Hidalgo (2014).

La extracción de los PHAs se realiza por procesos de concentración de las células, desecación y extracción del polihidroxialcanoato por lisis celular o con disolventes a altas temperaturas. Posteriormente se precipitan los PHAs, se lavan y se secan, obteniéndose el poliéster (Rodríguez Plaza, 2017; Scheper *et al.*, 2008).

#### 1.4.2. Tipos de PHAs

La fórmula general de los PHAs se muestra en la **Figura 8**, donde la cadena radical "R" puede ser de diferentes tipos (saturada, insaturada, aromática, halogenada, ramificada, etc.).



**Figura 8.** Formula genérica de los polihidroxialcanoatos.

En función de su longitud en número de carbonos de cada unidad monomérica (contando su cadena radical) se clasifican en (Babel y Steinbüchel, 2001; Koller, 2016):

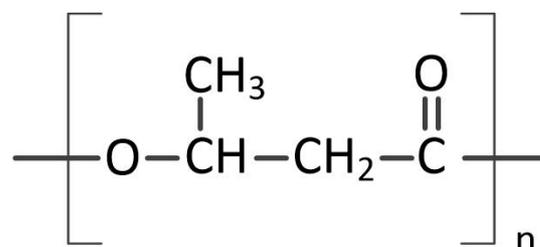
- PHA-scl o de cadena corta: De 3 a 5 carbonos.
- PHA-mcl o de cadena media: De 6 a 14 carbonos.
- PHA-lcl o de cadena larga: Más de 15 carbonos.

Hasta la fecha se han contabilizado en torno a 150 tipos de cadenas laterales distintas, dando lugar a 150 tipos distintos de PHA, si bien se espera que aún se descubran más (García Hidalgo; 2014; Koller, 2016).

La clase de PHA que se produce depende de la especie bacteriana, tipo y cantidad de sustrato y a las condiciones ambientales a las que esté sujeta. Una misma bacteria puede producir distintos tipos de PHA en proporciones variables (copolímeros) o un solo tipo (homopolímero).

#### 1.4.3. Polihidroxiбутirato (PHB)

El primer tipo de PHA descubierto, el polihidroxiбутirato (PHB) (**Figura 9**), data del año 1925. Se trata de un PHA-scl donde su cadena lateral "R" es un radical metilo. Dada su masiva producción por gran parte de bacterias actualmente posee gran relevancia en el campo de la investigación científica (De Almeida *et al.*, 2004).



**Figura 9.** Formula del Polihidroxiбутirato (PHB).

El PHB es termoplástico y puede utilizarse para la producción de bioplásticos de calidad. Su grado de cristalinidad es del 80%, punto de fusión de 177°C y resistencia a la tracción de 43 MPa, valores similares al Polipropileno (PP) pero con menor ductilidad que este (Koller, 2016).



**Figura 10.** PHB extraído de *Azotobacter sp.* crecido en medio con 3% glucosa (izquierda) y de *E. Coli* recombinante (contiene los genes de PHA de la *Azotobacter sp.*) crecida en medio con 2.5% de lactosa (derecha). Extraído de De Almeida *et al.* (2004).

Los metanótrofos Tipo II, desviando el flujo de carbono a partir de la ruta de la serina son capaces de producir PHB. Los Tipo I, al emplear la ruta de la ribulosa monofosfato, carecen de esta habilidad (Pfluger *et al.*, 2011).

## 1.5. PERSPECTIVA

El metano es un gas de efecto invernadero que supone una gran problemática ambiental, especialmente en emisiones diluidas. A pesar de las numerosas investigaciones fisicoquímicas que buscan su concentración para aprovecharlo energéticamente, las investigaciones para su aprovechamiento microbiológico cada vez cobran más relevancia por el bajo coste de operación y bajos impactos ambientales de las biotecnologías. Es aquí donde las bacterias metanótrofas adquieren especial interés. No sólo son capaces de eliminar metano, sino que pueden sintetizar a partir de él productos de valor añadido como el PHB.

El PHB es un poliéster que sirve de materia prima para la producción de bioplásticos biodegradables reduciendo la gran problemática ambiental que suponen los plásticos convencionales. No obstante, sus elevados costes de fabricación (4.5-5.5 \$/kg) provocan que su producción a nivel industrial actualmente sea baja (Koller, 2016). La investigación de procesos de producción de PHB más eficientes es cada vez más necesaria.

Existen aún gran cantidad de bacterias metanótrofas por cultivar y catalogar (Wise *et al.*, 1999), en especial de *Sphagnum* o musgos de turbera (Kip *et al.*, 2011)

y lodos de depuradora, que podrían suponer una producción de PHB más eficiente y económica.

La presente investigación se centra en el cultivo, obtención e identificación de cepas puras de bacterias metanótrofas a partir de un enriquecimiento de microorganismos productores de PHB. Se estudiará su potencial de eliminación de metano y producción de productos de valor añadido como el PHB.



## **2. OBJETIVOS**

---

La investigación llevada a cabo en este Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo el aislamiento, identificación e investigación de cepas de bacterias metanótrofas productoras de polihidroxiбутирато provenientes de *Sphagnum* y lodo de depuradora.

Sus objetivos específicos son:

- 1) El cultivo y obtención de cepas puras de bacterias metanótrofas a partir de un enriquecimiento de microorganismos productores de PHB.
- 2) Identificación de las cepas puras mediante técnicas de secuenciación.
- 3) Estudio de la producción de PHB de las cepas metanótrofas aisladas.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MEDIOS MINERALES DE CULTIVO

Para el cultivo de bacterias se empleó tanto medio líquido como medio sólido en placas Petri. Los medios minerales utilizados han sido dos: 'Medio Whittenbury A' y 'Medio Whittenbury B', ambos modificados de Whittenbury *et al.* (1970).

##### 3.1.1. Medio Whittenbury A.

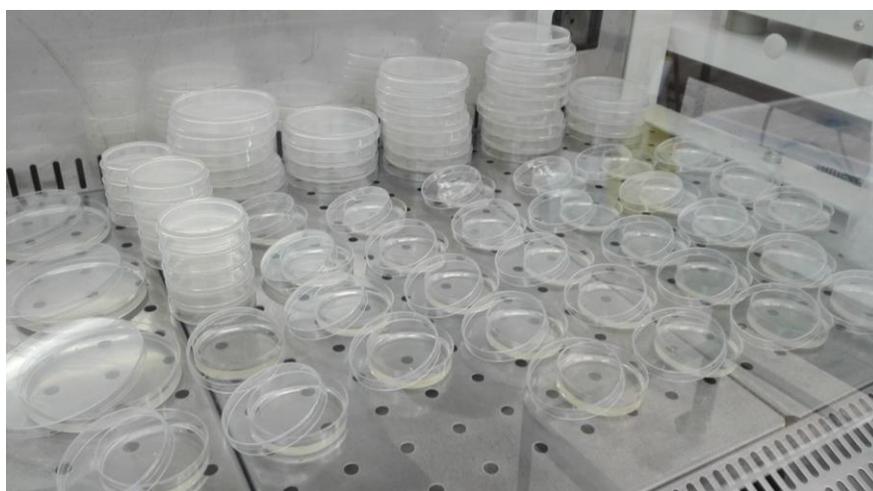
El medio principal lo conforman las sales de nitrato (NMS, *Nitrate Mineral Salts*) específico para metanótrofos (Whittenbury *et al.*, 1970). Cuenta con un aporte de elementos traza en bajas concentraciones necesarios para el crecimiento bacteriano (Pfennig, 1962). Para mantener el pH en valores óptimos, se utiliza un buffer de fosfato ajustado a un pH de 6,8. A este medio se han adicionado una serie de compuestos no recogidos por Whittenbury *et al.* (1970) (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Compuestos y concentraciones del Medio Whittenbury A.

	Compuesto	Concentración
NMS	$KNO_3$	1.00 g/L
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	1.08 g/L
	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.20 g/L
Elementos traza	$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	277 $\mu g/L$
	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	1000 $\mu g/L$
	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	500 $\mu g/L$
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	400 $\mu g/L$
	$H_3BO_3$	15 $\mu g/L$
	$CaCl_2$	27 $\mu g/L$
	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	20 $\mu g/L$
	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	10 $\mu g/L$
Buffer	$KH_2PO_4$	0.26 g/L
	$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	0.83 g/L
Adicionales	$Fe - EDTA$	380 $\mu g/L$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	87 $\mu g/L$

El medio principal (que contiene NMS, elementos traza y compuestos adicionales) y el buffer de fosfato se autoclavaron por separado para evitar la precipitación de sales durante el proceso de esterilización.

Para la elaboración de medio sólido se empleó 'Medio Whittenbury A'. Se probaron agar-agar y agarosa al 1.5% en peso como gelificantes. Al no observarse diferencias en el crecimiento de las bacterias metanótrofas comenzó a utilizarse únicamente agar-agar. Su adicción al medio se realizó antes del autoclavado. Posteriormente se dejó enfriar hasta una temperatura a la cual se podía manipular. Se adicionó el buffer y se dejó gelificar sobre placas Petri, cubriendo hasta la mitad de su altura (**Figura 11**).



**Figura 11.** Proceso de gelificación del medio mineral sobre placas Petri.

### **3.1.2. Medio Whittenbury B.**

El Medio Whittenbury B está constituido por el medio NMS, elementos traza y el buffer de fosfato con los mismos compuestos que el Medio Whittenbury A, pero distintas concentraciones. Además, se adicionaron una serie de vitaminas para favorecer el crecimiento microbiano (**Tabla 2**). Otras vitaminas empleadas en cultivos bacterianos son la B2, B6, B9 y B12 (Heyer *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Compuestos y concentraciones del Medio Whittenbury B.

	<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
<b>NMS</b>	$KNO_3$	1.00 g/L
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.20 g/L
	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0.11 g/L
<b>Elementos traza</b>	$Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$	2770 $\mu g/L$
	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	10000 $\mu g/L$
	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	5000 $\mu g/L$
	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	4000 $\mu g/L$
	$H_3BO_3$	150 $\mu g/L$
	$CaCl_2$	270 $\mu g/L$
	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	200 $\mu g/L$
	$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	100 $\mu g/L$
<b>Buffer</b>	$KH_2PO_4$	0.41 g/L
	$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	0.53 g/L
<b>Vitaminas</b>	<i>Biotina (H)</i>	63 $\mu g/L$
	<i>Nicotinamida (B1)</i>	629 $\mu g/L$
	<i>Niacina (B3)</i>	314 $\mu g/L$
	<i>Ácido pantoténico (B5)</i>	314 $\mu g/L$

### 3.2. GENERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE LAS ATMÓSFERAS.

Las bacterias metanótrofas requieren una atmósfera de metano y oxígeno para su crecimiento. Su generación se realizó por desplazamiento del espacio de cabezas de los botes con oxígeno o una mezcla previamente preparada.

#### 3.2.1. Desplazamiento con oxígeno

Consiste en generar una atmósfera en las botellas únicamente de oxígeno. El oxígeno se encuentra presurizado y se introduce a través de una válvula reguladora y una aguja con filtro estéril que atraviesa el septum. A su vez, se habilita una salida del gas con otra aguja, de forma que se forme una corriente continua que entre a la cámara y arrastre el aire de su interior (**Figura 12**). Posteriormente con ayuda de una jeringa de gases con filtro se retira parte del volumen de oxígeno y se introduce el metano.

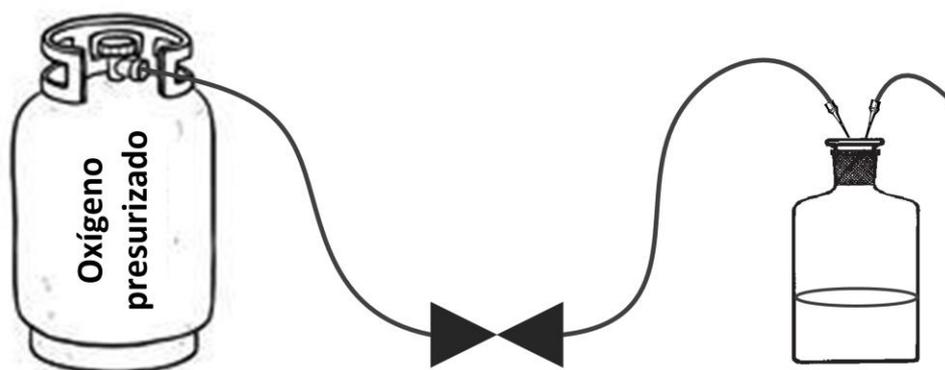


Figura 12. Esquema del desplazamiento del espacio de cabezas de los botes con oxígeno.

### 3.2.2. Desplazamiento con mezcla de metano y oxígeno

Una mezcla de gases previamente preparada con las concentraciones deseadas se introduce al espacio de cabezas con ayuda de una bomba soplante y una aguja con filtro que atraviesa el septum. A su vez, se habilita una salida del gas con otra aguja (**Figura 13**). Si se deja suficiente tiempo la atmósfera del espacio de cabeza de las botellas se renueva y tendrá las mismas concentraciones de oxígeno y metano que la mezcla inicial.

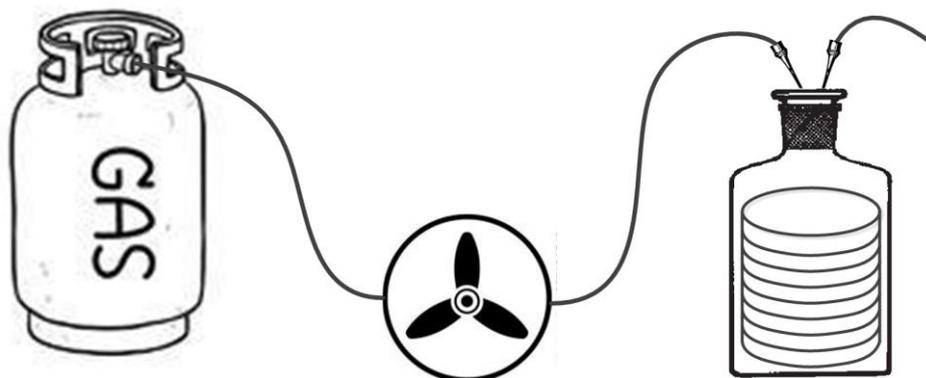


Figura 13. Esquema del desplazamiento del espacio cabezas de las cámaras con una mezcla previamente preparada

### 3.2.3. Seguimiento de la atmósfera

El seguimiento del espacio de cabeza de las botellas se ha realizado tomando una muestra a través de los septum con una jeringa de gases de 100  $\mu\text{l}$  y con el uso de un cromatógrafo Bruker 430-GC. Se analizan las concentraciones de  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . El calibrado del equipo se encuentra en el **Anexo 1**.

### 3.3. INÓCULO.

Como pre-inóculo se han empleado 20 ml con 50 g/L de una mezcla de lodo del tratamiento biológico de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Valladolid (Valladolid, España) y turba de *Sphagnum* mixto (entre 150 y 350 especies) (Plantas Carnívoras, España).

Este inóculo mixto se introdujo en botellas de 1200 ml con 180 ml de 'Medio Whittenbury B', las cuales se cerraron con septum de butilo y tapones de plástico. El espacio de cabezas se limpió con oxígeno y se introdujo una concentración inicial de metano de  $195 \pm 6,8 \text{ g/m}^3$ . El crecimiento se llevó a cabo durante 19 días en un incubador (MaxQ 4000, Thermo Scientific, EE. UU.) a 25 °C y 200 rpm. Se efectuó un seguimiento de las concentraciones de metano y dióxido de carbono en el espacio de cabezas.

Para el enriquecimiento selectivo que favoreciera el crecimiento de bacterias metanótrofas, se introdujeron 10 ml del pre-inóculo anterior en botellas de 1200 ml y 190 ml de medio Whittenbury B. Se dejaron crecer duplicados a 25°C, 30°C y 37°C. Se ejecutaron un total de 5 ciclos de degradación de metano (introduciéndose en cada vez  $195 \pm 6,8 \text{ g/m}^3$  de metano). El proceso completo duró entre 27 y 45 días. Todos los ciclos fueron monitoreados periódicamente hasta el consumo completo del metano, sin sustitución del medio mineral entre ciclos.

Se determinó que la mayor producción de PHB se dio en el enriquecimiento crecido a 37°C. Por lo tanto, el proceso de aislamiento se lleva a cabo a partir de este enriquecimiento selectivo.

### 3.4. ENRIQUECIMIENTO Y CULTIVO DEL INÓCULO.

Para aumentar la concentración bacteriana se inoculó por duplicado el enriquecimiento en botes de 120 ml con 30 ml de 'Medio Whittenbury A'. Ambas botellas se dejaron crecer a 30°C, 100 rpm, y con una atmósfera en el espacio de cabezas formada por 30%v metano y 70%v de oxígeno. El crecimiento se efectuó durante 10 días hasta observarse visualmente cierta biomasa.

Una de las botellas se cultivó sobre placas Petri con 'Medio gelificado Whittenbury A' mediante diseminación (siembra en superficie). Cierta volumen del inóculo enriquecido se añadió en el centro de la placa. Con una varilla de vidrio en

forma de “L” autoclavada se extendió el líquido hasta su completa dispersión por toda la superficie.

### 3.5. CRECIMIENTO EN PLACAS

Una vez cultivadas las placas se introdujeron en un reactor y cámara herméticas (**Figura 14**), previa comprobación de su correcta estanqueidad.



**Figura 14.** Reactor y cámara usados en el crecimiento de los cultivos.

Para el aporte de metano y oxígeno se creó una atmósfera en el interior de los recipientes (20-40%v de metano y 60-80%v de oxígeno) por desplazamiento de la atmósfera con una mezcla previamente formada.

Se dejaron crecer los cultivos en medio sólido en el interior de las cámaras durante una semana en oscuridad y sin agitación. La temperatura se mantuvo a 37°C, la cual correspondía con la óptima reportada en el enriquecimiento previo y por Whittenbury *et al.* (1970).

### 3.6. OBTENCIÓN DE UN AISLADO.

Para la obtención de un aislado se precisó realizar una serie de ‘pases’, los cuales consistieron en un proceso de selección de una colonia, sembrado en una nueva placa Petri e incubación de esta placa durante 7 días.

- A. **Selección de una colonia:** Consiste en seleccionar y transferir una colonia alejada de sus vecinas. El arrastre se realiza con un palillo de madera previamente autoclavado. Posteriormente se desecha la antigua placa Petri.

**B. Sembrado en una nueva placa:** Se desliza el palillo por la superficie del medio gelificado. Para obtener con mayor probabilidad colonias aisladas se realiza un estriado por agotamiento (**Figura 15**).



**Figura 15.** Sembrado por agotamiento sobre placa Petri con medio sólido.

**C. Crecimiento:** Posteriormente las placas se introducen en el reactor y la cámara, se genera una atmósfera de metano (20-40%v) y oxígeno (60-80%v) y se dejan crecer durante una semana.

Por repetición de este procedimiento, se asegura que en la última transferencia solo existe una única cepa. En nuestra investigación se realizaron un total de 5 pases. En todos ellos se realizó un seguimiento de la atmósfera y un seguimiento al microscopio a partir del cuarto pase.

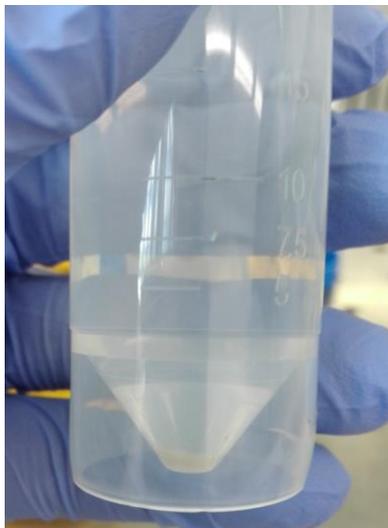
### **3.7. ENRIQUECIMIENTO DE LOS AISLADOS**

Se transfirió una única colonia a medio líquido (pudiendo considerarse un sexto pase) en botes de 120 ml con 30 ml de 'Medio Whittenbury A' (**Figura 16**), que se incubaron bajo un espacio de cabezas de metano (20-40%v) y oxígeno (60-80%v) a 230 rpm, 37°C y oscuridad, realizándose controles semanales del espacio de cabezas. Para asegurarse del correcto sellado de los frascos con tampón de butilo y cierre metálico se realizan dos controles abióticos (**Anexo 2**).



**Figura 16.** Botes de 120 ml empleados en el enriquecimiento de los aislados.

Cuando ha sido necesario un reemplazo del medio mineral, el protocolo ha consistido en centrifugar la biomasa en tubos Falcon durante 4 minutos a 5000 rpm y resuspender e inocular el pellet en frascos de 120 ml con 20 ml de 'Medio Whittenbury B' (**Figura 17**). Las condiciones de crecimiento siempre han sido 37°C, 230 rpm, completa oscuridad y composición del espacio de cabezas de 20-40%v de metano y 60-80%v de oxígeno.



**Figura 17.** Pellet de biomasa tras la centrifugación en tubo Falcon.

### 3.8. SECUENCIACIÓN

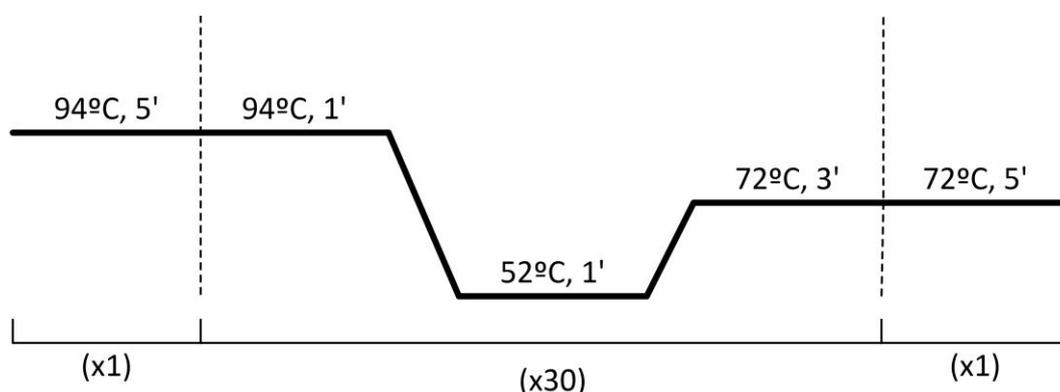
Para secuenciar los aislados se concentró la biomasa de 6 ml del enriquecimiento previo y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua. 5  $\mu$ l de esa biomasa se utilizaron para amplificar el gen 16S rRNA bacteriano. Dicho gen se amplificó completamente (1452 pb) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

utilizando los cebadores universales del gen 16S rRNA: 27-F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492-R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Martin-Laurent *et al.*, 2001). La mezcla de PCR (50 µl) contenía:

- 2 µl de cada cebador.
- 25 µl de mezcla de reacción BIOMIX™ (Bioline, Ecogen, USA) incluyendo una solución tampón, solución dNTPs, cloruro de magnesio y la enzima Taq ADN polimerasa (Prado *et al.*, 2005).
- 5 µl de la biomasa concentrada.
- Agua Milli-Q hasta el volumen final.

Para la verificación de la correcta ejecución del proceso se empleó un control negativo (sin muestra) y un control positivo (usando DNA bacteriano). La PCR se realizó en un termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con el siguiente programa (**Figura 18**):

- 1 ciclo de acondicionamiento de 5 minutos a 94°C.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, unión de los cebadores a 52°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 3 minutos.
- 1 ciclo de polimerización final a 72°C durante 5 minutos.



**Figura 18.** Programa del termociclador.

Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 V, 50 minutos) en la que se tiñó dicho gel por adición del tinte específico de ácidos nucleicos GelRed (Biotium, USA). Las bandas específicas de PCR se detectaron mediante un transiluminador de longitud de onda ultravioleta 254-312 nm (Sigma - Aldrich, USA). Para confirmar la pureza de los aislados se enviaron las

muestras de la PCR a Secugen S.L (Madrid) y por secuenciación Sanger se analizaron los genes rRNA 16S.

El tratamiento de las secuencias se realizó con el programa DNA Baser. Las secuencias de los cultivos puros fueron contrastadas con las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2018).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SEGUIMIENTO DE LOS AISLADOS EN PLACA

El enriquecimiento fue cultivado por diseminación en 29 placas (numeradas del 1 al 29). Para lograr un aislado tras una semana de crecimiento de placas, una colonia fue transferida a una nueva placa. El procedimiento se realizó hasta un total de 5 veces. A lo largo de los pases muchas de las placas fueron descartadas por no mostrar crecimiento de biomasa o la presencia de excesiva contaminación. Para compensar este hecho aquellas placas con colonias más dispersas fueron duplicadas.

En concreto, en el segundo pase las placas 2, 3, 23, 26 y 27 fueron descartadas. Se duplicaron las placas 7, 9 y 11 por mostrar colonias de diferentes tipos. En el tercer pase se descartaron las placas 9-2,11-1,11-2,19, 21, 22 y 25; se duplicaron las placas 8 y 24 y se cuadruplicaron las placas 4,14 y 20. En el cuarto pase se descartaron 4-3, 4-4, 7-2, 10,14-4 y 15 y no se realizó ningún duplicado. En el quinto pase únicamente se descarta 24-2. Al final de este pase se caracterizó el tipo de colonia y se transfirió una de ellas a medio líquido. (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Trazabilidad de los aislados y tipo de colonia en el último pase. En rojo las placas descartadas.

1º PASE	2º PASE	3º PASE	4º PASE	5º PASE	MEDIO LÍQUIDO	TIPO DE COLONIA
1	1	1	1	1	<b>Aislado 1</b>	Pequeña
2	2					
3	3					
4	4	4-1	4-1	4-1	<b>Aislado 2</b>	Grande y amarilla
		4-2	4-2	4-2	<b>Aislado 3</b>	Pequeña
		4-3	4-3			
		4-4	4-4			
5	5	5	5	5	<b>Aislado 4</b>	Pequeña
6	6	6	6	6	<b>Aislado 5</b>	Grande y amarilla
7	7-1	7-1	7-1	7-1-1	<b>Aislado 6</b>	Grande y amarilla
				7-1-2	<b>Aislado 7</b>	Grande y amarilla
	7-2	7-2	7-2	7-2		
8	8	8-1	8-1	8-1-1	<b>Aislado 8</b>	Pequeña
				8-1-2	<b>Aislado 9</b>	Pequeña
		8-2	8-2	8-2	<b>Aislado 10</b>	Pequeña
9	9-1	9-1	9-1	9-1-1	<b>Aislado 11</b>	Pequeña
				9-1-2	<b>Aislado 12</b>	Pequeña
	9-2	9-2				
10	10	10	10			

**Tabla 4. (Continuación).** Trazabilidad de los aislados y tipo de colonia en el último pase. En rojo las placas descartadas.

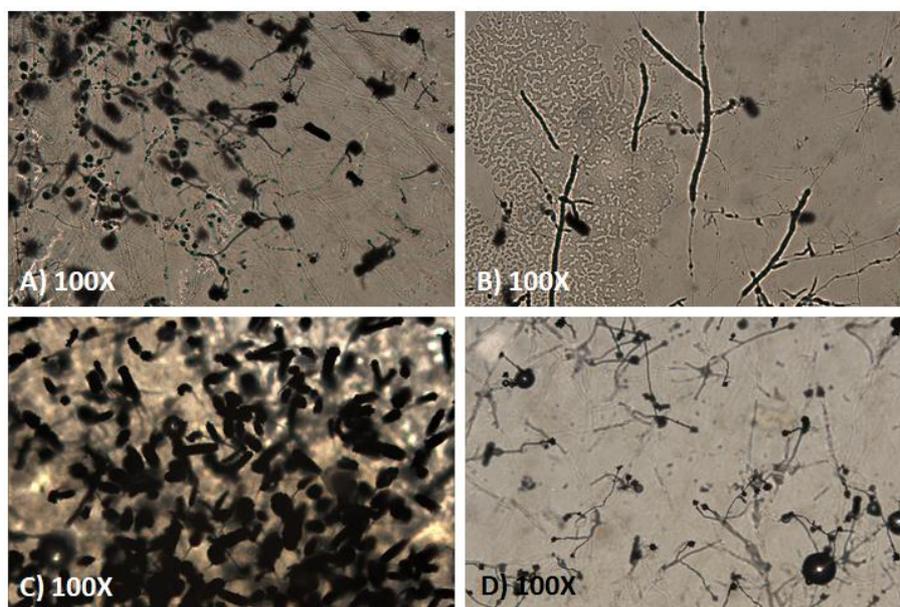
1º PASE	2º PASE	3º PASE	4º PASE	5º PASE	MEDIO LÍQUIDO	TIPO DE COLONIA
11	11-1	11-1				
	11-2	11-2				
12	12	12	12	12	<b>Aislado 13</b>	Pequeña
13	13	13	13	13-1	<b>Aislado 14</b>	Agrupada
				13-2	<b>Aislado 15</b>	Agrupada y beige
14	14	14-1	14-1	14-1	<b>Aislado 16</b>	Pequeña y transparente
		14-2	14-2	14-2	<b>Aislado 17</b>	Pequeña y beige
		14-3	14-3	14-3	<b>Aislado 18</b>	Pequeña y transparente
		14-4	14-4			
15	15	15	15			
16	16	16	16	16	<b>Aislado 19</b>	Pequeña
17	17	17	17	17	<b>Aislado 20</b>	Grande y amarilla
18	18	18	18	18	<b>Aislado 21</b>	Pequeña y beige
19	19	19				
20	20	20-1	20-1	20-1	<b>Aislado 22</b>	Pequeña y transparente
		20-2	20-2	20-2	<b>Aislado 23</b>	Pequeña y transparente
		20-3	20-3	20-3	<b>Aislado 24</b>	Mediana y beige
		20-4	20-4	20-4	<b>Aislado 25</b>	Grande y transparente
21	21	21				
22	22	22				
23	23					
24	24	24-1	24-1	24-1	<b>Aislado 26</b>	Grande y transparente
		24-2	24-2	24-2		
25	25	25				
26	26					
27	27					
28	28	28	28	28	<b>Aislado 27</b>	Grande y transparente
29	29	29	29	29	<b>Aislado 28</b>	Grande y transparente

Durante el crecimiento en cada uno de los pases se observó un ligero descenso de la concentración de metano y aumento del dióxido de carbono, ambos signos del crecimiento de metanótrofos. Se realizaron inspecciones visuales de las placas al microscopio con objetivo 10X en el cuarto y quinto pase.

#### 4.1.1. Contaminación de los cultivos

Un cultivo puro es fácilmente contaminable, donde la principal causa son los microorganismos en suspensión en el ambiente. Para evitar la contaminación de los aislados el manejo de las placas se ha realizado en campana de flujo laminar BIO BAN 48 y con material autoclavado.

A pesar de ello, en las inspecciones visuales y al microscopio se observó contaminación en algunas de las placas (**Figura 19**), algunas de las cuales tuvieron que ser descartadas.

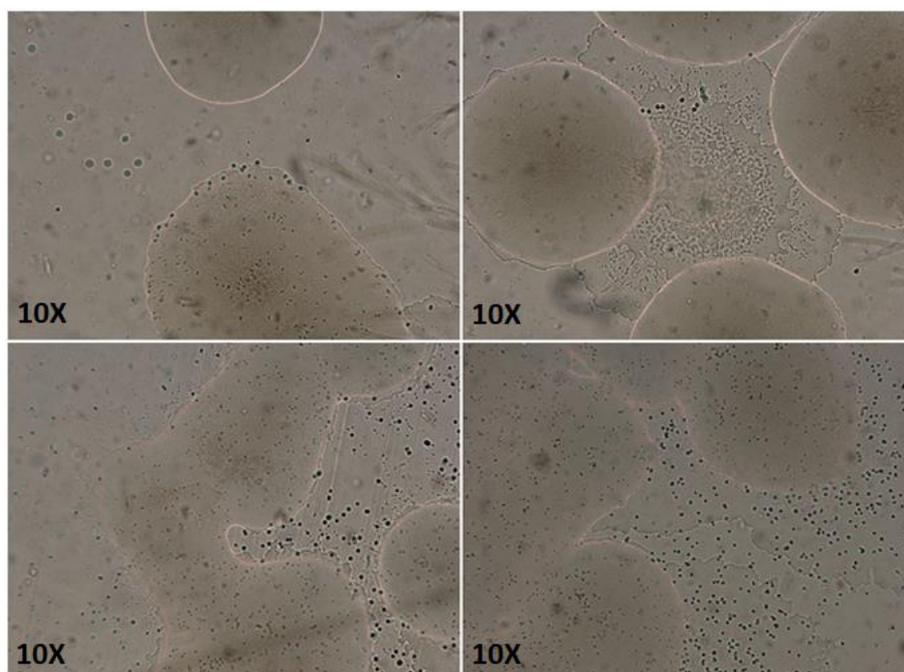


**Figura 19.** Fotografía de la contaminación en el quinto pase de los aislados 1 (A), 4 (B), 14 (C) y 25 (D).

Se llevó a cabo un control negativo con una placa sin cultivar y en presencia de la misma atmósfera que el resto de las placas. Se concluyó que el medio y la atmósfera no estaban contaminados y que el autoclavado era correcto. Es posible que la contaminación provenga del propio inóculo. Se procuró, en la medida de lo posible, evitar su arrastre en los repiques.

#### **4.1.2. Cuarto pase**

Al observar las placas al microscopio en el cuarto pase, en algunas de ellas se observaron colonias que podrían ser de diferentes formas y tamaño. Para asegurar que se obtuvo un único tipo de colonia se realizó un nuevo pase. En la **Figura 20** se puede ver un ejemplo de placa en el cuarto pase.



**Figura 20.** Fotografías al microscopio de la placa 18 en el cuarto pase.

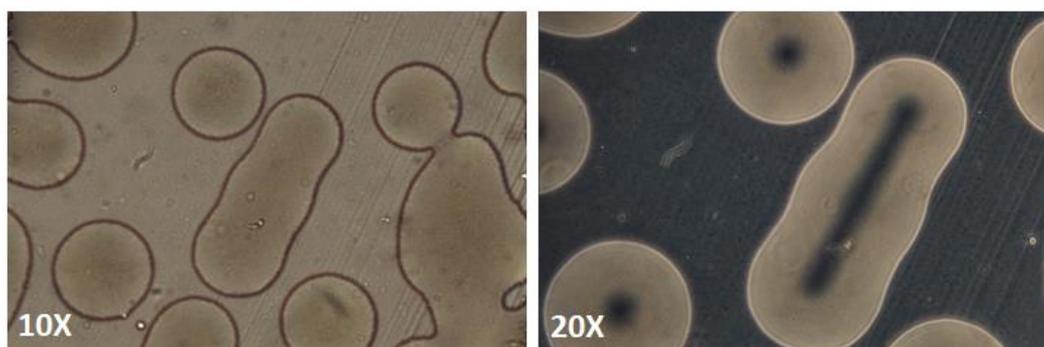
#### **4.1.3. Quinto pase: Aislados**

Las placas de los 28 aislados que se obtuvieron en el quinto pase se observaron al microscopio para identificar su morfología. Se infirió que se trataban de cultivos puros por mostrar colonias en cada placa de apariencia similar. Entre los distintos aislados se observaron morfologías muy diversas, entre las que destacan:

- Colonias circulares (**Figuras 21 y 22**).

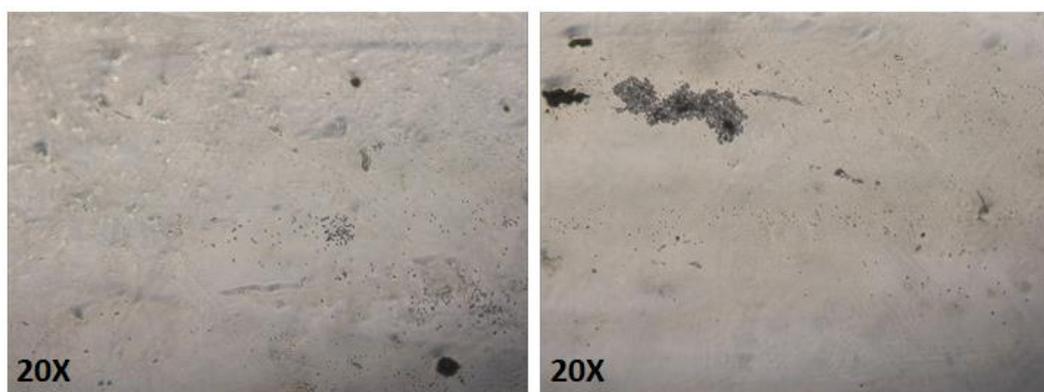


**Figura 21.** Fotografía al microscopio del aislado 16.

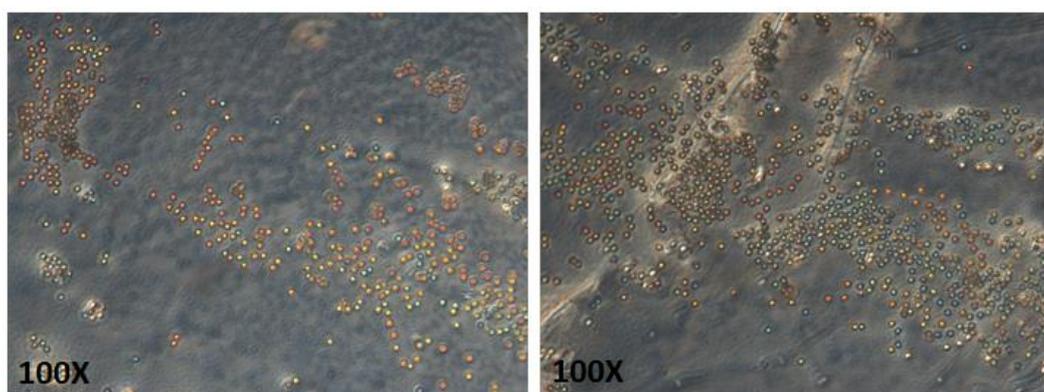


**Figura 22.** Fotografías al microscopio del aislado 7.

- Cocos que crecen tanto en forma aislada como en racimos irregulares (**Figuras 23 y 24**).

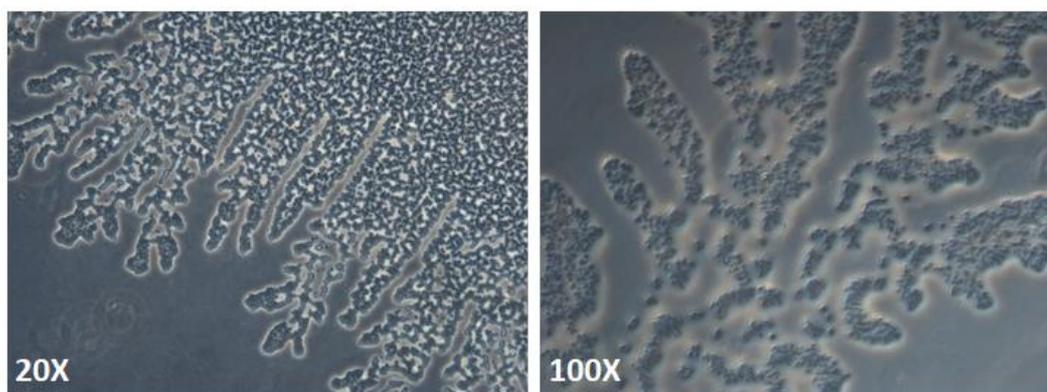


**Figura 23.** Fotografías al microscopio del aislado 8.



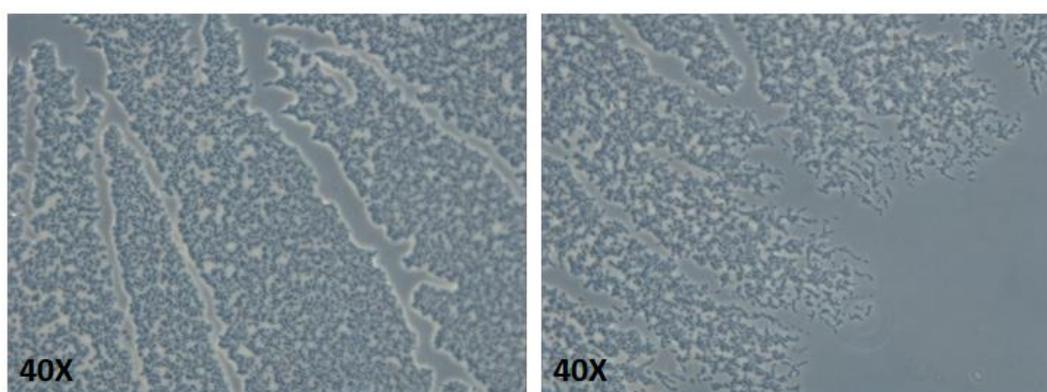
**Figura 24.** Fotografías al microscopio del aislado 10.

- Cocos que forman ramificaciones asimétricas con borde lobular (**Figura 25**).



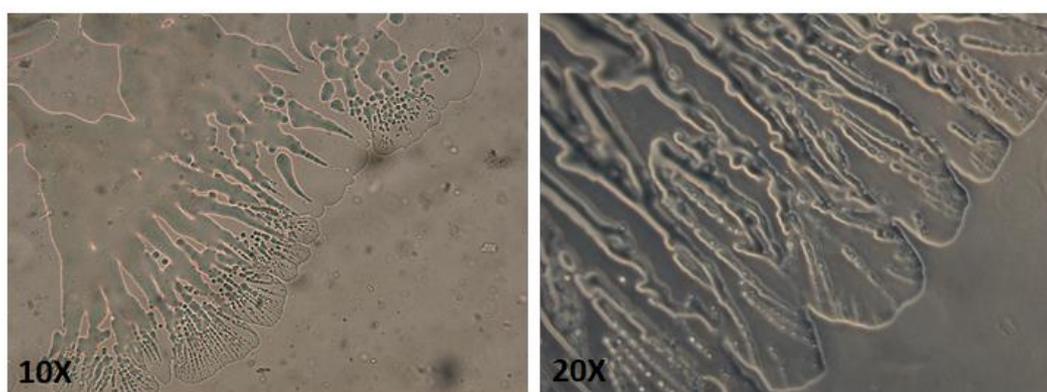
**Figura 25.** Fotografías al microscopio del aislado 9.

- Cocos que forman ramificaciones asimétricas con borde espiculado. Se forman grandes surcos entre las ramificaciones (**Figura 26**).



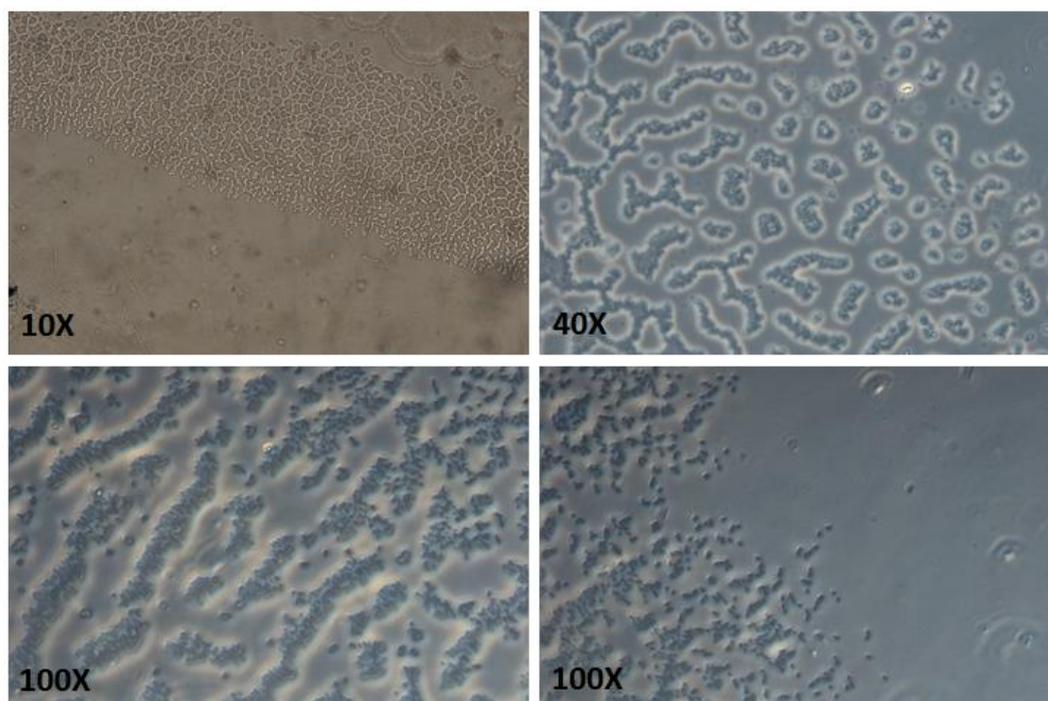
**Figura 26.** Fotografías al microscopio del aislado 20.

- Ramificaciones con estructura dicotómica de borde redondeado (**Figura 27**).

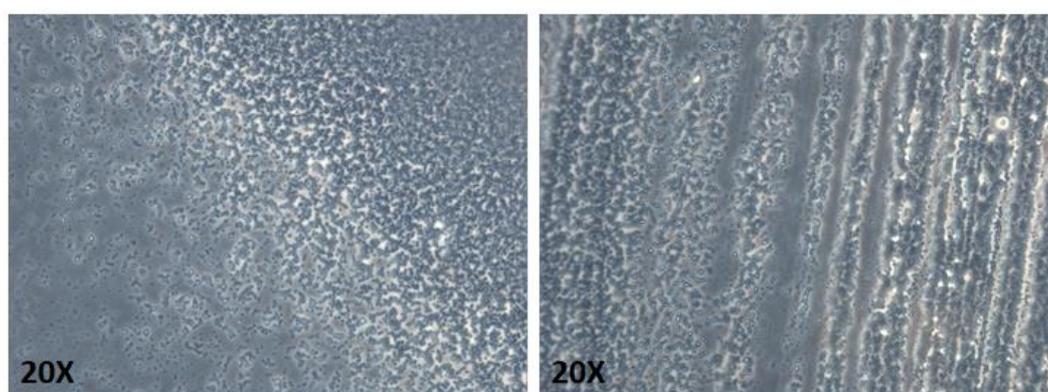


**Figura 27.** Fotografías al microscopio del aislado 11.

- Cocos que forman redes de colonias que se entrelazan en zonas de alta densidad de biomasa y se disgregan en zonas de baja (**Figuras 28 y 29**).

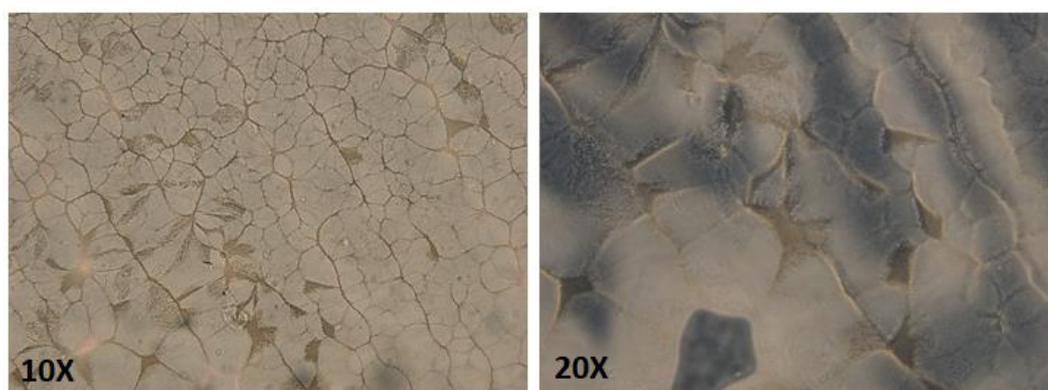


**Figura 28.** Fotografías al microscopio del aislado 4.



**Figura 29.** Fotografías al microscopio del aislado 22.

- Colonias con estructura de red entrelazada (**Figura 30**).



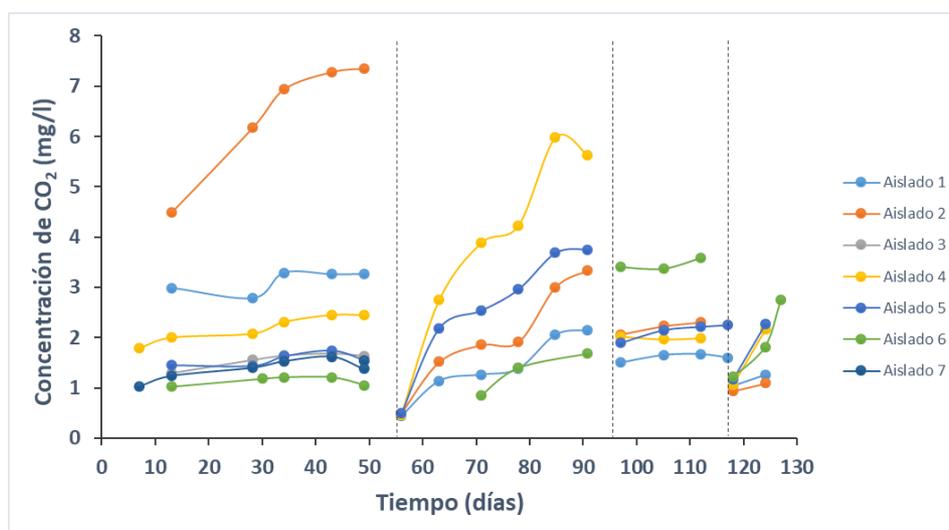
**Figura 30.** Fotografías al microscopio del aislado 26.

## 4.2. DEGRADACIÓN DE METANO Y PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub>

Se estudió la degradación de metano de los aislados midiendo la concentración de metano y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas durante el enriquecimiento de los aislados en medio líquido. Dada las bajas concentraciones de biomasa, la cantidad total de metano degradada fue muy pequeña, estando dentro de la sensibilidad y el error instrumental del cromatógrafo de gases. La sensibilidad del cromatógrafo por el CO<sub>2</sub> fue mayor, por lo que el seguimiento se realizó con este parámetro por considerarse más fiable.

Tras 56 días de crecimiento en medio líquido la producción de CO<sub>2</sub> fue muy pequeña y se había ralentizado. 11 aislados (aislados 3, 7, 13, 14, 15, 20, 22, 24, 25, 26 y 27) no mostraron crecimiento en el medio líquido y fueron descartados. Atendiendo a la posible falta de algún nutriente esencial o la acumulación de un metabolito o producto que pudiera inhibir el crecimiento de las bacterias, se realizó un reemplazo de medio en los otros 17 aislados. Se observó que, al realizar el cambio de medio, nuevamente se registró una degradación de metano y producción de CO<sub>2</sub>, y se observó visualmente crecimiento de la biomasa.

Debido a que nuevamente se detuvo la degradación de metano, se llevaron a cabo reemplazos de medio al cabo de 41 días y 21 días. Finalmente se dejaron crecer otros 9 días. Las **Figuras 31-34** muestran la producción de CO<sub>2</sub> durante estas 4 etapas.



**Figura 31.** Evolución del CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 1 al 7.

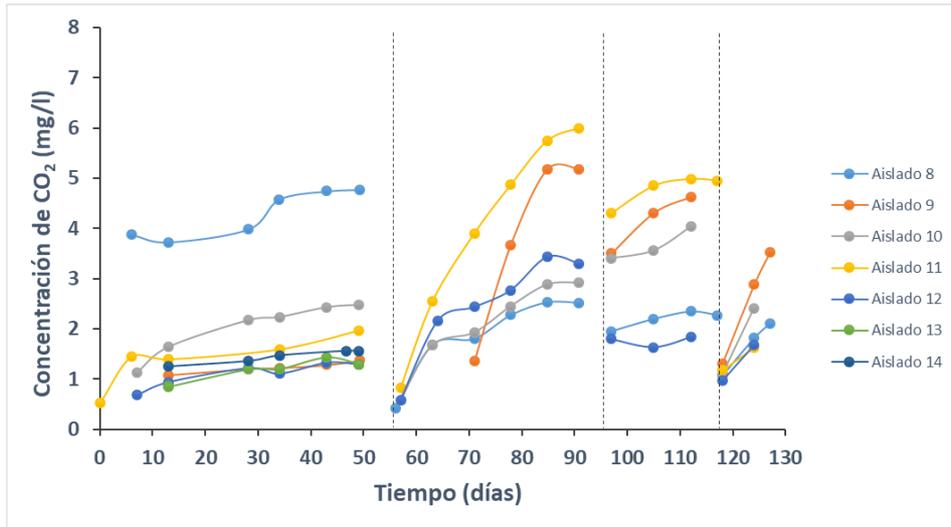


Figura 32. Evolución del CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 8 al 14.

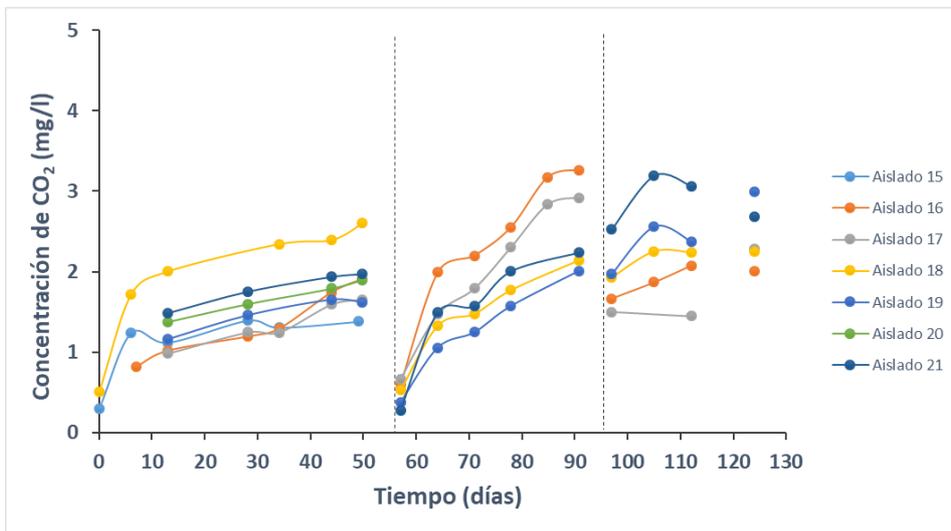


Figura 33. Evolución del CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 15 al 21.

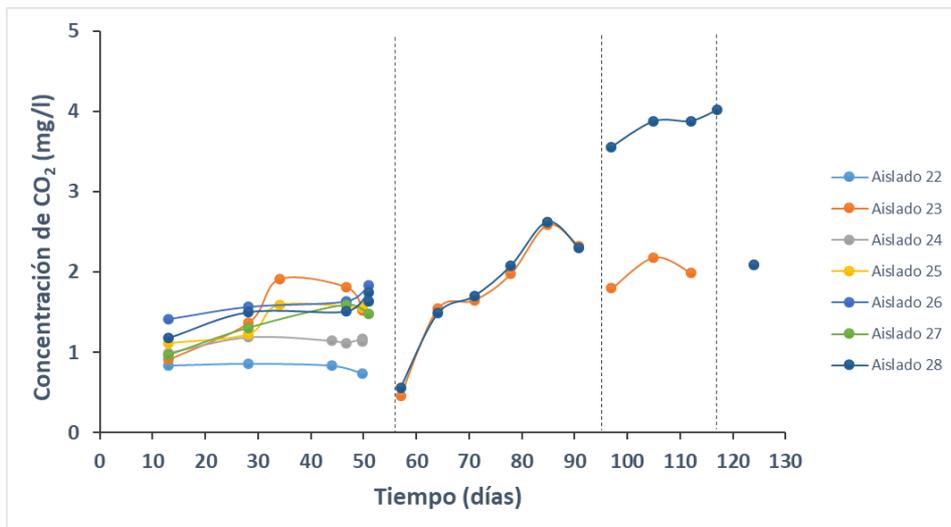


Figura 34. Evolución del CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas de los aislados 22 al 28.

### 4.3. PRODUCCIÓN DE PHB

Se precisaría medir la acumulación de PHB en aquellos aislados que degradan el metano. Sin embargo, debido al lento e interrumpido crecimiento de los aislados, la cantidad de biomasa no ha sido suficiente y no se ha podido realizar dicho análisis. Actualmente los aislados se encuentran creciendo y el análisis está pendiente de realizarse cuando la cantidad de biomasa sea suficiente.

### 4.4. SECUENCIACIÓN DE LOS AISLADOS

Al final del proceso de enriquecimiento se obtuvo suficiente biomasa de 11 aislados (aislados 1, 2, 5, 8, 9, 11, 16, 18, 19, 23 y 28) para realizar un análisis de identificación mediante PCR y secuenciación. El análisis de electroforesis en gel de agarosa y posterior uso del transiluminador verificó la correcta ejecución de la PCR. Se enviaron las muestras a secuenciar el gen rRNA 16S. Empleando el programa DNA Baser para analizar las secuencias se ha determinado que 2 son cultivos puros (aislados 1 y 18). Las secuencias de estos aislados se muestran en las **Tablas 4 y 5**.

**Tabla 4.** Secuencia del gen rRNA 16S del aislado 1.

```
TGCAGTCGAACGGCAGCGCGGACTTCGGTCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ATACATCGGAACGTACCCTGTTGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGC
ATACGACCTGAGGGTGAAAGCGGGGGACCGCAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCC
GATGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAATTGCTCTGGCTAA
TACCTGGGGTAGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGCGTAAAGCGTGCGC
AGGCGGTTTTGTAAGACAGGCGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCGCTTGT
GACTGCAAGGCTAGAGTGCCTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATG
CGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGACGTGACTGACG
CTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTTTCTCAGTAACGTAGCTACGCGTGAAGT
TGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG
CACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCTACCCTTG
ACATGCCACTAACGAAGCANAGATGCATTAGTGCNCGAAAGGGAAAGTGGACACAGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
```

**Tabla 5.** Secuencia del gen rRNA 16S del aislado 18.

ATCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTCTGGCAAACCCACTCCCATGGTGTGAC  
 GGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTAC  
 TAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGCGTTT  
 TCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACGCACCATTGTATGACGT  
 GTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGT  
 TTGTCACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCTCTTGCGTAGCAACTAGAGACAAGGGTTGCG  
 CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA  
 CCTGTGTCCACTTTCCCTTTTCGGGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGTC  
 AAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTG  
 CGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGGCGGTCAA  
 CTTACGCGTTAGCTACGTTACTGAGAAAATGAATCCCCAACAACTAGTTGACATCGTTT  
 AGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGC  
 GTCAGTCACGTCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCAT  
 TTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACGCACTCTAGCCTTGACGTCACAA  
 GCGCAATTCCCAGGTTGAGCCCCGGGGATTTACGCGCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGC  
 ACGCTTACGCCAGTAATTCCGAATAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCT  
 GGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCTACCCAGGTATTAGCC  
 AGAGCAATTTCTTCCGGACAAAGTGCTTTACACNCG

Se ha comparado con las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), obteniéndose los siguientes resultados de afiliaciones filogenéticas para cada uno de los aislados (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Afiliación filogenética de los aislados. Obtenido del NCBI (2018).

	Phylogenetic affiliattion	Identify (%)	Accession Number
Aislado 1	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99	<a href="#">NR_074704.1</a>
Aislado 18	<i>Cupriavidus plantarum</i>	99	<a href="#">NR_109160.1</a>

Se concluye que el aislado 1 se trata una cepa pura de *Cupriavidus metallidurans* y el aislado 18 de *Cupriavidus plantarum*.

Por su parte, el resto de los aislados (aislados 2, 5, 8, 9, 11, 16, 19, 23 y 28) están formados por dos o más especies de bacterias. Su análisis muestra la secuencia de la especie predominante, contaminada, en mayor o menor medida, con secuencias de especies minoritarias. La **Tabla 7** indica la bacteria predominante en cada aislado. Debido a que el análisis se realizó por duplicado, algunos muestran dos especies en función de la muestra.

**Tabla 7.** Especie predominante en los aislados no puros.

	<b>Phylogenetic affiliattion</b>	<b>Identify (%)</b>	<b>Accession Number</b>
<b>Aislado 2</b>	<i>Achromobacter insuavis</i>	99	<a href="#">NR_117706.1</a>
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99	<a href="#">NR_113733.1</a>
<b>Aislado 5</b>	Secuencia incompleta		
<b>Aislado 8</b>	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	94	<a href="#">NR_113973.1</a>
<b>Aislado 9</b>	<i>Acidovorax delafieldii</i>	99	<a href="#">NR_028714.1</a>
<b>Aislado 11</b>	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	<a href="#">NR_114118.1</a>
<b>Aislado 16</b>	<i>Brenvundimonas vesicularis</i>	99	<a href="#">NR_113586.1</a>
<b>Aislado 19</b>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99	<a href="#">NR_074704.1</a>
	<i>Cupriavidus plantarum</i>	99	<a href="#">NR_109160.1</a>
<b>Aislado 23</b>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99	<a href="#">NR_074704.1</a>
<b>Aislado 28</b>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	99	<a href="#">NR_074704.1</a>

## 5. DISCUSIÓN

---

El proceso de aislamiento es complejo, tedioso y lento debido a las dificultades intrínsecas de aislar una especie microbiana. Debido a esto se estima que únicamente entre el 0.1-1% de los microorganismos terrestres y el 0.01-0.1% de los acuáticos son aislables en un laboratorio (Dykhuizen, 1998).

En nuestro proceso de aislamiento los principales problemas surgidos fueron debidos a la presencia de contaminación durante el crecimiento en placa y a la pérdida y el lento crecimiento/inhibición de los aislados en medio líquido.

La pérdida de algunos aislados en medio líquido puede deberse bien a que no se trataba de especies metanótrofas o a que en muchos casos los microorganismos establecen relaciones interespecíficas de comensalismo, simbiosis, parasitismo y/o depredación, que imposibilitan el crecimiento de un microorganismo sin la presencia de otra u otras especies.

El lento crecimiento en medio líquido puede obedecer a fenómenos de sintrofia. Dos o más organismos presentan un vínculo por el cual degradan conjuntamente los sustratos, integrando sus metabolismos. Un organismo produce un metabolito, que sirve de sustrato para un segundo y que impide, a su vez, la inhibición del crecimiento del primero por acumulación. Esta clase de relación comenzó a descubrirse en la década de los 60 cuando Bryant *et al.* (1967) descubrieron que los aislados de *Methanobacillus omelianskii* (una arquea metanogénica muy común en lodos activos) era en realidad la sintrofia de dos especies que no podían existir de forma separada en medios con etanol. Uno de los organismos era capaz de fermentar el etanol, pero se veía inhibido por el propio hidrógeno que producía. La otra especie consumía el hidrógeno y producía metano, pero no era capaz de metabolizar etanol. Con el objetivo de comprobar que el medio de cultivo de los aislados contenía, al cabo del tiempo, sustancias inhibitorias para el crecimiento de los aislados, se diseñaron cambios periódicos de medio. Los cambios de medio conllevaron la reactivación de la oxidación de metano en todos los aislados, lo que confirmó la hipótesis inicial.

A pesar de las dificultades inherentes a este estudio, se obtuvieron cepas puras de *Cupriavidus plantarum* y *Cupriavidus metallidurans*. Ambas especies pertenecen al género *Cupriavidus*. Su etología proviene de *Cuprum* (Cobre) – *avidus*

(ávido), ávido de cobre; haciendo referencia a la tolerancia que esta especie tiene por altas concentraciones de cobre y la gran influencia de este metal en su crecimiento (Makkar y Casida; 1987). Se trata de bacterias depredadoras no obligadas, pueden alimentarse de otras bacterias (incluso de otras depredadoras). En ausencia de presas son capaces de asimilar los nutrientes del medio. El gen que codifica la enzima MMO ha sido recientemente identificado en una de las especies más estudiadas de este género (*Cupriavidus necator*), lo que confirma la capacidad de nuestros aislados para usar metano como única fuente de carbono y energía (**Figura 35**) (KEGG, 2018; NCBI, 2018; Poehlein *et al.*, 2011). Además, esta misma especie es capaz de producir PHB hasta un 62-71% de su peso seco en condiciones de limitación de nitrógeno y 82% por limitación de fósforo (Fiorese *et al.*, 2009; Cavalheiro *et al.*, 2009; Da Cruz Pradella *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2014). Por lo tanto, es probable que *Cupriavidus plantarum* y *Cupriavidus metallidurans* también sean especies metanótrofas facultativas acumuladoras de PHB.

**CNE\_RS08675 methane monoxygenase [ *Cupriavidus necator* N-1 ]**

Gene ID: 34310661, updated on 22-Oct-2017

**Summary**

Gene symbol	CNE_RS08675
Gene description	methane monoxygenase
Locus tag	CNE_RS08675
Gene type	protein coding
Organism	<a href="#">Cupriavidus necator N-1 (strain: N-1, culture-collection: ATCC:43291, other: type strain of Cupriavidus necator)</a>
Lineage	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Cupriavidus
Old locus tag	CNE_1c17790

**Genomic context**

Location: chromosome: 1

Sequence: Chromosome: 1; NC\_015726.1 (1836891..1837913, complement)

**Figura 35.** Resumen del informe del gen que codifica la enzima MMO en *Cupriavidus necator*. Captura de pantalla del NCBI (2018).

*Cupriavidus metallidurans* ha sido denominada en diversas ocasiones como *Ralstonia metallidurans*, *Ralstonia eutropha* y *Alcaligenes eutrophus*. Su nombre hace referencia a las altas concentraciones de metales pesados que es capaz de resistir, entre los que se encuentran  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  y  $\text{Sr}^{2+}$  (Monchy *et al.*, 2007; Von Rozycki, y Nies, 2009; Jansenn *et al.*, 2010). Es conocida por ser una bacteria que habita en medios con oro disuelto. Para resistir la presencia

de este metal lo reduce a oro molecular en un proceso que se conoce como biomineralización del oro (Reith *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2009). Se ha reportado que *Cupriavidus metallidurans* es capaz de producir PHAs (Spiekermann *et al.*, 1999) y de vivir en cultivos mixtos de metanótrofos con metano como única fuente de carbono, coincidiendo con lo observado en nuestro estudio (Luo *et al.*, 2007).

Por su parte, *Cupriavidus plantarum* es una especie descubierta en 2014 por Estrada-De Los Santos *et al.* (2014), cuyo metabolismo y características no se han estudiado en profundidad. Se trata de una especie ligada a plantas, que crece en la rizosfera de gramíneas, maíz o agave (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2014). El presente estudio sugiere que *Cupriavidus plantarum* pueda ser capaz de crecer ligada a *Sphagnum*. Sin embargo, no existen investigaciones que demuestren si se trata de una especie acumuladora de PHB y las condiciones óptimas para la síntesis de este biopolímero.

Por último, se destaca que los estudios para caracterizar el consumo de metano, rendimientos y potencial de acumulación de PHB por parte de *Cupriavidus plantarum* y *Cupriavidus metallidurans* se encuentran pendientes de realizarse a falta de crecer suficiente biomasa de ambos aislados.



## **6. CONCLUSIONES**

---

Del presente estudio sobre el aislamiento de bacterias metanótrofas productoras de PHB se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha conseguido aislar bacterias metanótrofas a partir de un cultivo mixto de *Sphagnum* y lodo de depuradora a 37°C.
2. Se han logrado cepas puras de *Cupriavidus plantarum* y *Cupriavidus metallidurans*.
3. El proceso de aislamiento conllevó la pérdida de los mecanismos de sintrofia presentes en el enriquecimiento inicial, lo que conllevó una rápida inhibición por productos del crecimiento de los aislados en este trabajo.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Acha, V., Alba, J., y Thalasso, F. (2002). *The absolute requirement for carbon dioxide for aerobic methane oxidation by a methanotrophic-heterotrophic soil community of bacteria*. *Biotechnology letters*, 24(9), 675-679.
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., y Janssen, R. (2008). *Biogas Handbook*. University of Southern Denmark Esbjerg. ISBN 978-87-992962-0-0.
- Babel, W., y Steinbüchel, A. (2001). *Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng. Biotechnology*.
- Blasco, R., y Castillo, F. (2014). *Acerca de la biotecnología ambiental*. *Arbor*, 190(768), 157.
- Bryant, M. P., Wolin, E. A., Wolin, M. J., y Wolfe, R. S. (1967). *Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria*. *Archiv für Mikrobiologie*, 59(1-3), 20-31.
- Bueno, J. L., Sastre, H., y A.G., Lavin. (1997). *Contaminación e Ingeniería Ambiental (III). Contaminación de las aguas*. Ed. FIC Y T. Oviedo.
- Byrom, D. (1991). *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Stockton Press. New York, USA. ISBN 978-1-349-11169-5.
- Campos, M. I., Figueiredo, T. V. B., Sousa, L. S., y Druzian, J. I. (2014). *The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by Cupriavidus necator using a response surface methodology and its characterizations*. *Industrial Crops and Products*, 52, 338-346.
- Cantera, S., Frutos, O. D., López, J. C., Lebrero, R., & Torre, R. M. (2017). *Technologies for the bio-conversion of GHGs into high added value products: Current state and future prospects*. In *Carbon Footprint and the Industrial Life Cycle* (pp. 359-388). Springer, Cham.
- Cantera, S., Lebrero, R., Sadornil, L., García-Encina, P. A., y Muñoz, R. (2016). *Valorization of CH<sub>4</sub> emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH<sub>4</sub> abatement*. *Journal of environmental management*, 182, 160-165.
- Cashdollar, K. L., Zlochower, I. A., Green, G. M., Thomas, R. A., y Hertzberg, M. (2000). *Flammability of methane, propane, and hydrogen gases*. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 13(3-5), 327-340.
- Cavalheiro, J. M., de Almeida, M. C. M., Grandfils, C., y Da Fonseca, M. M. R. (2009). *Poly-(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glycerol*. *Process Biochemistry*, 44(5), 509-515.

- Da Cruz Pradella, J. G., Ienczak, J. L., Delgado, C. R., y Taciro, M. K. (2012). *Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using Cupriavidus necator*. *Biotechnology letters*, 34(6), 1003-1007.
- De Almeida, A., Ruiz, J. A., López, N. I., y Pettinari, M. J. (2004). *Bioplásticos: una alternativa ecológica*. *Química Viva*, 3(3).
- Desai, M., y Harvey, R. P. (2017). *Inventory of US greenhouse gas emissions and sinks: 1990-2015*. *Federal Register*, 1-633.
- Dianou, D., y Adachi, K. (1999). *Characterization of methanotrophic bacteria isolated from a subtropical paddy field*. *FEMS microbiology letters*, 173(1), 163-173.
- Dykhuizen, D. E. (1998). *Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria?*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 25-33.
- Escaler, M. I., y R. M., Sahuquillo (2001). *Eliminación biológica de nutrientes (nitrógeno y fósforo) mediante un proceso discontinuo de fangos activados*. *Ingeniería del agua*, 8(1), 67-77.
- Estrada-De Los Santos, P., Solano-Rodríguez, R., Matsumura-Paz, L. T., Vásquez-Murrieta, M. S., y Martínez-Aguilar, L. (2014). *Cupriavidus plantarum sp. nov.*, a plant-associated species. *Archives of microbiology*, 196(11), 811-817.
- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., de Aragão, G. M., y Reis, M. A. (2009). *Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from Cupriavidus necator biomass by solvent extraction with 1, 2-propylene carbonate*. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454-461.
- García Hidalgo, J. (2014). *PHB despolimerasas de "Streptomyces exfoliatus y Streptomyces ascomycinicus": caracterización de enzimas con potencial aplicación biotecnológica*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Girard, M., Ramirez, A. A., Buelna, G., y Heitz, M. (2011). *Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry—influence of the methane and nitrogen concentrations*. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 151-158.
- Hanson, R. S., y Hanson, T. E. (1996). *Methanotrophic bacteria*. *Microbiological reviews*, 60(2), 439-471.
- Hazeu, W., y Steennis, P. J. (1970). *Isolation and characterization of two vibrio-shaped methane-oxidizing bacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 36(1), 67-72.
- Heyer, J., Galchenko, V. F., y Dunfield, P. F. (2002). *Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments*. *Microbiology*, 148(9), 2831-2846.

- Ho, A., Vlaeminck, S. E., Ettwig, K. F., Schneider, B., Frenzel, P., y Boon, N. (2013). *Revisiting methanotrophic communities in sewage treatment plants. Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2841-2846.
- Horan, N. J. (1989). *Biological wastewater treatment systems: theory and operation*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., ... y Monchy, S. (2010). *The complete genome sequence of Cupriavidus metallidurans strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments*. PLoS One, 5(5), e10433.
- Karthikeyan, O. P., Chidambarampadmavathy, K., Cirés, S., y Heimann, K. (2015). Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(15), 1579-1610.
- KEGG, 2018. Análisis metabólico de KEGG. Página Web: [https://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?cnc00680](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?cnc00680). Consulta: 23/08/2018.
- Kip, N., Ouyang, W., van Winden, J., Raghoebarsing, A., van Niftrik, L., Pol, A., ... y Jetten, M. S. (2011). *Detection, isolation, and characterization of acidophilic methanotrophs from Sphagnum mosses*. *Applied and environmental microbiology*, 77(16), 5643-5654.
- Koller, M. (Ed.). (2016). *Recent Advances in Biotechnology Volume, 1: Microbial Biopolyester Production, Performance and Processing Microbiology, Feedstocks, and Metabolism (Vol. 1)*. Bentham Science Publishers
- Lee, S. Y. (1996). *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Biotechnology and bioengineering*, 49(1), 1-14.
- Luo, M. F., Wu, H., Wang, L., y Xing, X. H. (2007). *Study on the structure and function of a stable methane-oxidizing mixed microbial consortium*. *Wei sheng wu xue bao. Acta microbiologica Sinica*, 47(1), 103-109.
- Makkar, N. S., y Casida Jr, L. E. (1987). *Cupriavidus necator gen. nov., sp. nov.; a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 323-326.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., & Catroux, G. (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), 2354-2359.
- Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaey, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., y Mergeay, M. (2007). *Plasmids pMOL28 and pMOL30 of Cupriavidus metallidurans are specialized in the maximal viable response to heavy metals*. *Journal of bacteriology*, 189(20), 7417-7425.

- NCBI, 2018. *National Center for Biotechnology Information*. Página Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consulta: 19/08/2018.
- Pfennig, N. (1962). *Beobachtungen über das Schwärmen von Chromatium okenii*. Archives of Microbiology, 42(1), 90-95.
- Pfluger, A. R., Wu, W. M., Pieja, A. J., Wan, J., Rostkowski, K. H., y Criddle, C. S. (2011). *Selection of Type I and Type II methanotrophic proteobacteria in a fluidized bed reactor under non-sterile conditions*. Bioresource technology, 102(21), 9919-9926.
- Poehlein, A., Kusian, B., Friedrich, B., Daniel, R., y Bowien, B. (2011). *Complete genome sequence of the type strain Cupriavidus necator N-1*. Journal of bacteriology, JB-05660.
- Prado, M., Calo, P., Cepeda, A., & Barros-Velázquez, J. (2005). Genetic evidence of an Asian background in heteroplasmic Iberian cattle (*Bos taurus*): Effect on food authentication studies based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. Electrophoresis, 26(15), 2918-2926.
- Reith, F., Etschmann, B., Grosse, C., Moors, H., Benotmane, M. A., Monsieurs, P., ... y Martínez-Criado, G. (2009). *Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium Cupriavidus metallidurans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, pnas-0904583106.
- Reith, F., Rogers, S. L., McPhail, D. C., y Webb, D. (2006). *Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold*. Science, 313(5784), 233-236.
- Rodríguez Plaza, S. (2017). *Estudio comparativo de la eliminación de CH<sub>4</sub> acoplada a la producción de ectoína en cultivos de Methylobacterium alcaliphilum 20Z y cultivos mixtos*. Trabajo Fin de Máster en Ingeniería Ambiental. Universidad de Valladolid.
- Rusmana, I., y Akahadiya, A. (2009). *Isolation and characterization of methanotrophic bacteria from rice fields*. Biotropoa-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology, 16(2).
- Scheper, T., Faurie, R., y Thommel, J. (2008). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 109.
- Shrestha, M., Shrestha, P. M., Frenzel, P., y Conrad, R. (2010). *Effect of nitrogen fertilization on methane oxidation, abundance, community structure, and gene expression of methanotrophs in the rice rhizosphere*. The ISME journal, 4(12), 1545.
- Spiekermann, P., Rehm, B. H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., y Steinbüchel, A. (1999). *A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of*

*bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds.* Archives of microbiology, 171(2), 73-80.

Van Haandel, A., y J., Van Der Lubbe (2012). *Handbook of biological wastewater treatment.* IWA publishing. Glasgow.

Von Rozycki, T., y Nies, D. H. (2009). *Cupriavidus metallidurans: evolution of a metal-resistant bacterium.* Antonie Van Leeuwenhoek, 96(2), 115.

Whittenbury, R., Phillips, K. C., y J. F. Wilkinson (1970). *Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria.* Microbiology, 61(2), 205-218.

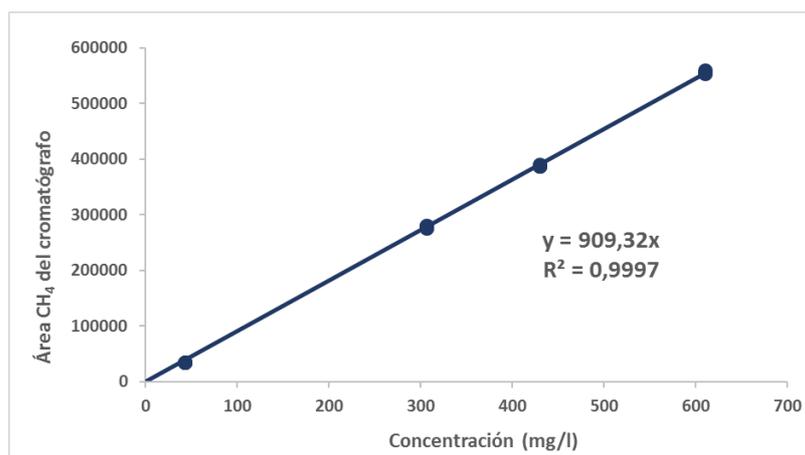
Wise, M. G., McArthur, J. V., y Shimkets, L. J. (1999). *Methanotroph diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis.* Applied and Environmental Microbiology, 65(11), 4887-4897.



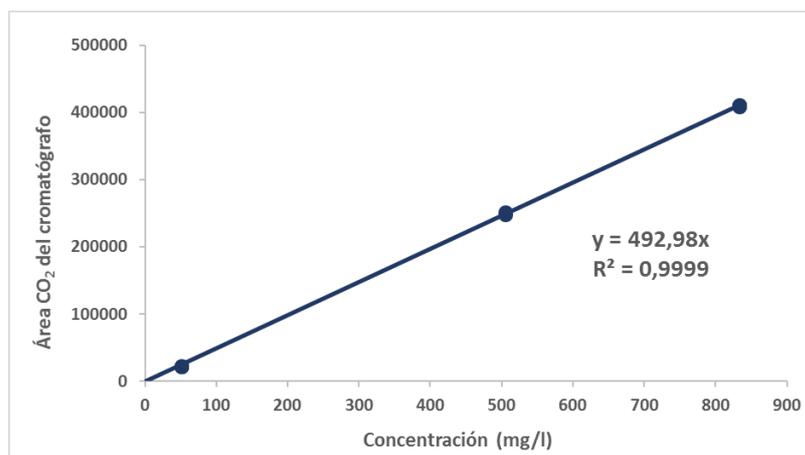
## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1. CALIBRADO CROMATÓGRAFO DE GASES

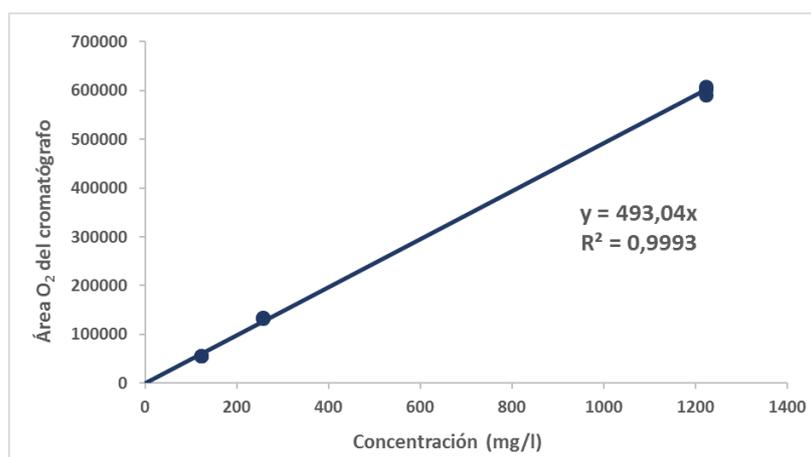
Para el seguimiento de los espacios de cabezas se empleó un cromatógrafo de gases Bruker 430-GC de doble columna. Su calibrado con patrones certificados por la empresa LINDE mostró, en todos los casos, un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) superior a 0,999 (**Figuras 36-38**).



**Figura 36.** Recta de calibrado del cromatógrafo para el metano. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas.



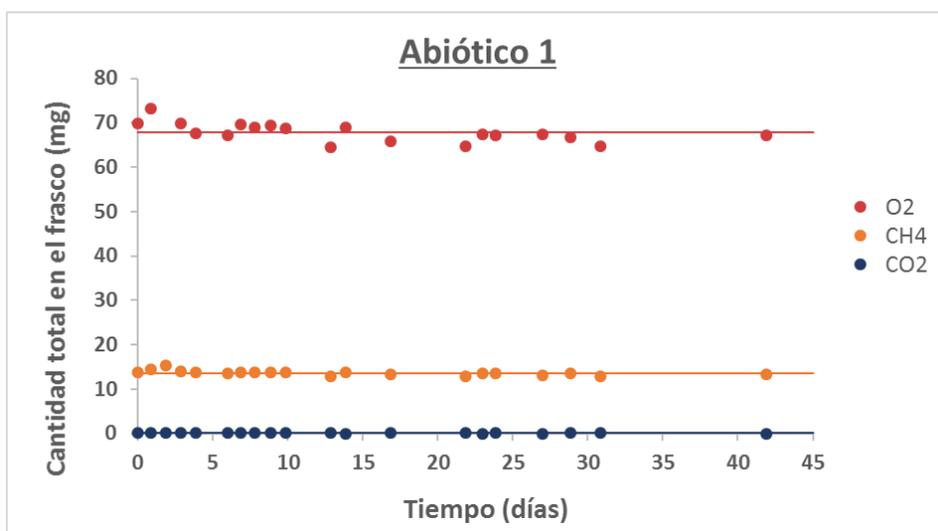
**Figura 37.** Recta de calibrado del cromatógrafo para el dióxido de carbono. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas.



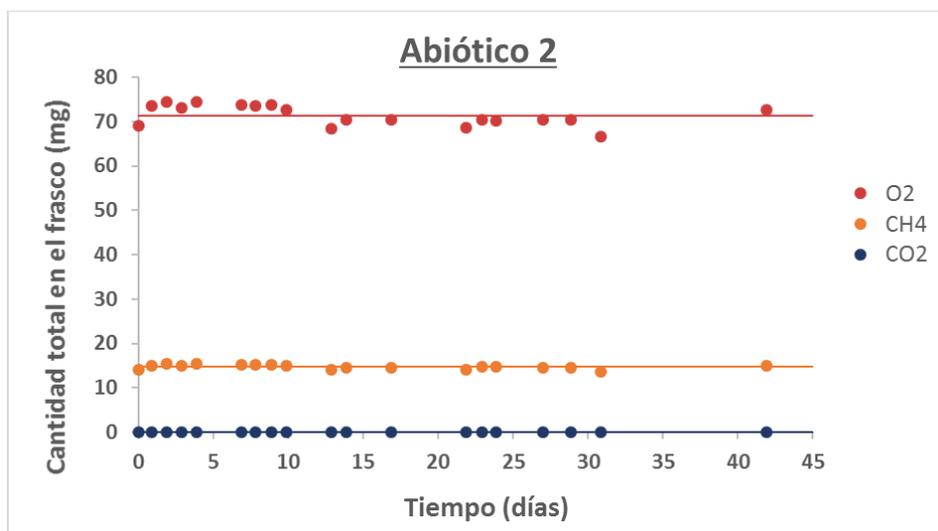
**Figura 38.** Recta de calibrado del cromatógrafo para el oxígeno. Calculada con cuatro muestras por triplicado y llevada al eje de coordenadas.

## 8.2. ANEXO 2. CONTROLES ABIÓTICOS

Para comprobar el correcto sellado de las botellas serológicas que contienen los enriquecimientos de los aislados en medio líquido se simuló las mismas condiciones con dos controles negativos sin inocular. En dos frascos de 120 ml se introdujeron 30 ml de medio autoclavado y una atmósfera de metano y oxígeno. Se mantuvieron en agitación a 200 rpm a una temperatura de 30 °C. Se monitorizaron periódicamente sus concentraciones en el espacio de cabezas de las botellas durante 42 días. Los resultados se muestran en las **Figuras 39 y 40**.



**Figura 39.** Evolución del espacio de cabezas del control abiótico 1.



**Figura 40.** Evolución del espacio de cabezas del control abiótico 2.

Durante el tiempo de observación las concentraciones se mantuvieron estables. Las pequeñas variaciones registradas se debieron a errores experimentales e instrumentales. Se demostró la estanqueidad de las botellas.