



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

MASTER OFICIAL EN
INGENIERÍA AMBIENTAL

Estudio comparativo de la eliminación de CH_4 acoplada a la
producción de
ectoína en cultivos de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z y cultivos
mixtos

Autor:

Rodríguez Plaza, Suní

Tutor Académico:

Muñoz Torre, Raúl

Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Valladolid, Julio 2017.

Resumen

La investigación planteada evaluó la posibilidad de valorizar corrientes diluidas de metano (CH_4) en más de un producto de alto valor añadido de manera simultánea como son la ectoína, polihidroxialcanoatos (PHAs) y exopolisacáridos (EPSs). Para ello se operaron 2 reactores de columna de burbujeo, uno inoculado con *Methylobacterium alcaliphilum* 20 Z (R1), y otro con un consorcio metanótrofo halotolerante (R2). Se evaluó el efecto de dos concentraciones de magnesio: $0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (condición 1) y $0.02 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (condición 2) para comprobar cómo este nutriente específico afectaba a la producción de ectoína, PHAs y EPSs, así como a la degradación de CH_4 . Los resultados mostraron que la presencia de Mg^{2+} fue determinante en la producción de los tres compuestos. Las altas concentraciones de Mg^{2+} favorecieron la producción de ectoína, con valores en la condición 1 de 94.5 ± 18.2 y $73.2 \pm 6.3 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$ en *M. alcaliphilum* 20Z y el consorcio metanótrofo, respectivamente, siendo casi el doble que en la condición 2. La producción de EPSs también se vio favorecida por las altas concentraciones de Mg^{2+} , con valores en la condición 1 de 2150 ± 357 y $2300 \pm 608 \text{ mg EPSs L}^{-1}$ en *M. alcaliphilum* 20Z y el consorcio metanótrofo, respectivamente, el doble de concentración que en la condición 2. Un resultado opuesto se obtuvo para la acumulación de PHAs en el consorcio metanótrofo, cuya acumulación se vio favorecida por las bajas concentraciones de Mg^{2+} de la condición 2, obteniéndose $1.4 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$ con $0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ comparado con $2.1 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$ con $0.02 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$. La eliminación de CH_4 no se vio afectada por la concentración de Mg^{2+} . Estos resultados respaldan la viabilidad técnica de una nueva generación de biorrefinerías de GEI basadas en metanótrofos extremófilos capaces de generar valor a partir de la mitigación del metano.

PALABRAS CLAVE: Tratamiento de CH_4 , ectoína, PHAs, EPSs, metanótrofos.



Abstract

This study assessed an innovative strategy for the valorization of dilute methane (CH₄) emissions based on the bioconversion of CH₄ into high added value products such as ectoine, polyhydroxyalkanoates (PHAs) and exopolysaccharides (EPSs) simultaneously and in continuous. The operation was conducted in two bubble column reactors inoculated with *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z and with a consortium of halotolerant methanotrophs. Two different magnesium concentrations, 0.2 g Mg²⁺ L⁻¹ (condition 1) and 0.02 g Mg²⁺ L⁻¹ (condition 2), were tested. Cells exhibited a constant intra-cellular ectoine concentration under condition 1 of 94.5 ± 18.2 and 73.2 ± 6.3 mg ectoine g biomass⁻¹ in *M. alcaliphilum* 20Z and the methanotrophic consortia reactor, respectively, ectoine detected being twice higher than under condition 2. The same effect of Mg²⁺ was observed in EPSs detection, since the EPSs values obtained in condition 1 (2150 ± 357 and 2300 ± 608 mg EPSs L⁻¹ in *M. alcaliphilum* 20Z and the methanotrophic consortium reactor, respectively) were 2 times higher than in condition 2. However, the opposite response was detected when studying PHAs, where lower Mg²⁺ concentrations promoted higher PHAs values in the methanotrophic consortium reactor (1.4 ± 0.3 mg PHB g biomass⁻¹ at 0.2 g Mg²⁺ L⁻¹ compared to 2.1 ± 0.3 mg PHB g biomass⁻¹ at 0.02 g Mg²⁺ L⁻¹). No effect of Mg²⁺ concentrations was detected. These results support the technical viability of a new generation of GHG biorefineries based on extremophile methanotrophs capable of creating value out of methane mitigation.

KEY WORDS: CH₄ treatment, ectoine, PHAs, EPSs, methanotrophs.





Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	19
Reactivos químicos y medio mineral salino	21
Inóculos utilizados.....	22
Experimento en reactores de columna de burbujeo con diferentes condiciones de concentración de magnesio	23
4. Resultados y discusión	29
4. 1 Experimento en reactores de columna de burbujeo con diferentes condiciones de concentración de magnesio	31
5. Conclusiones.....	39
Anexos.....	I
Anexo I. Rectas de calibrado	III
Anexo II. Tablas de datos	VI



1. Introducción



El metano (CH_4) es un gas producido en la naturaleza a partir de la digestión anaerobia de la materia orgánica como acción última de los microorganismos metanógenos [1], siendo a su vez el segundo gas más importante de efecto invernadero (GEI) dado su potencial de calentamiento global (25 veces superior al del CO_2) y su ratio de emisión respecto del total de GEI emitidos a la atmósfera (el metano constituye actualmente el 19% de las emisiones de GEI (Figura 1)). Además, este gas aumenta su concentración en la atmósfera de un 0.2 a un 1% anual debido a causas antropogénicas [2] [3] [4].

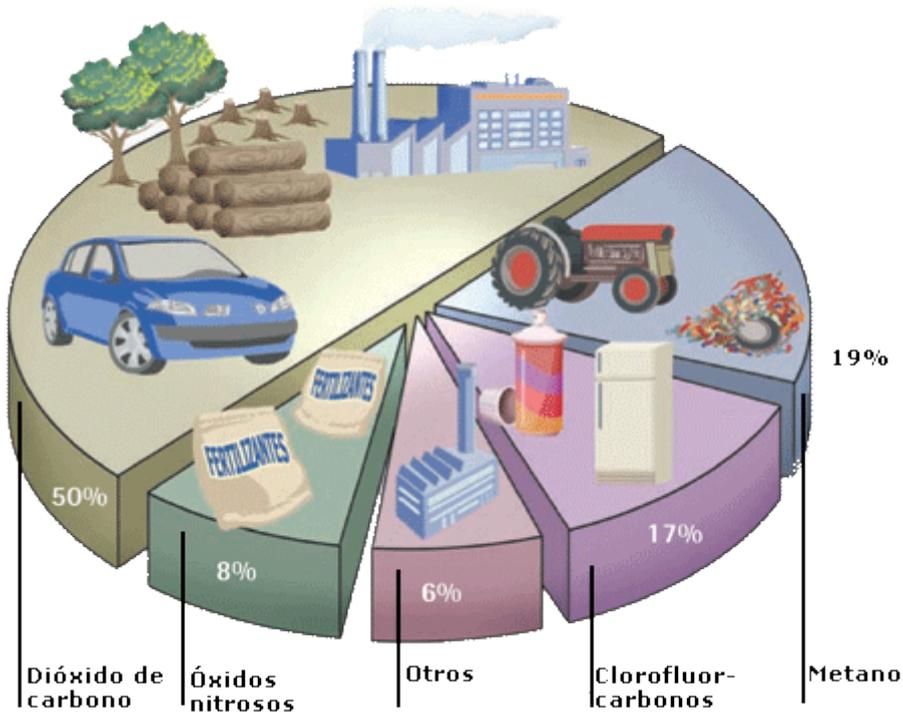


Figura 1: Porcentaje de emisión de gases de efecto invernadero en la actualidad [4].

El CH_4 ha alcanzado recientemente concentraciones atmosféricas un 150% superiores a las de la era preindustrial debido principalmente a actividades humanas (Figura 2) [5], representando estas emisiones antropogénicas actualmente el 60% del total de emisiones de CH_4 (Figura 3) [6].

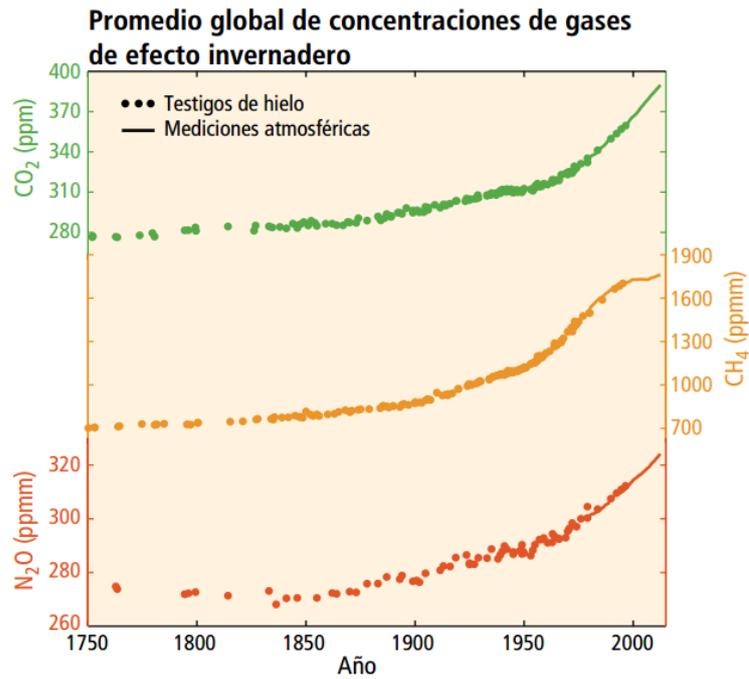


Figura 2: Cambios observados en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero. Concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂, verde), metano (CH₄, naranja) y óxido nitroso (N₂O, rojo) [7].

Las emisiones de metano de Estados Unidos por Sector Inventario de 2014

Emisiones equivalentes a millones de toneladas métricas de dióxido de carbono

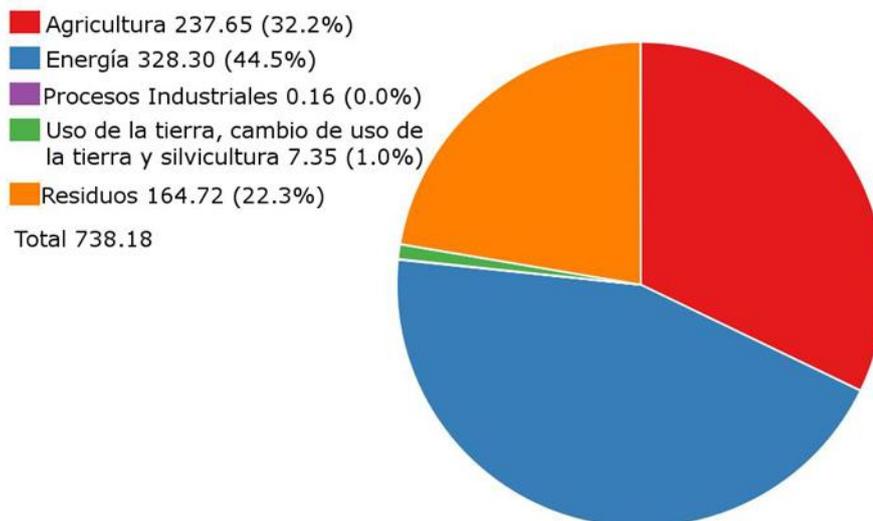


Figura 3: Emisiones de CH₄ equivalentes a millones de toneladas de CO₂ en 2014 [6].

Dentro de las fuentes antropogénicas de metano, las principales se deben a zonas de extracción y transporte de gas natural (33%), la fermentación entérica (granjas de rumiantes) (22%), gestión de residuos (20%), minas de carbón (9%), gestión de estiércol (8%) [1] [5] [8] y otros (6%) (Figura 4).

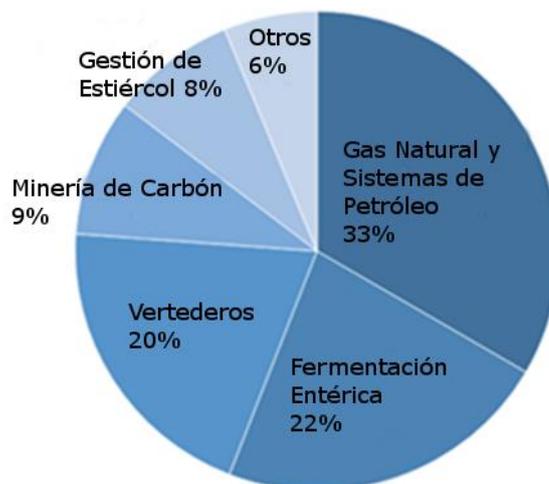


Figura 4: Principales fuentes humanas de CH₄ [6].

Debido a los crecientes daños que genera el CH₄, tanto ambientales (por ser un GEI) como a la salud humana (provocando asfixia en altas concentraciones por desplazamiento del oxígeno atmosférico [9]) y a la economía (daños derivados de los dos anteriores), se han establecido diferentes medidas políticas y sociales para combatir las emisiones de GEI. En este contexto, los miembros de las Naciones Unidas se han comprometido a reducir las emisiones de los GEI y a evitar la llegada de éstos a la atmósfera con el objetivo de mantener la temperatura media global 2°C por encima de los niveles pre-industriales [10]. Por otro lado, la Unión Europea, siguiendo la tendencia del conjunto de medidas adoptadas en 2012 y según el último informe publicado en octubre de 2014 “Tendencias y Proyecciones”, se ha propuesto alcanzar en 2020 niveles de GEIs por debajo del 21% de los niveles de 1990. Si las medidas adicionales previstas por los Estados miembros (adopción de la Directiva sobre eficiencia energética, cumplimiento de los objetivos en emisiones de flotas de coches y caravanas, y un nuevo reglamento sobre gases fluorados) se aplicasen completamente, la reducción global de GEIs podría alcanzar en 2020 hasta el 24% en comparación con 1990 [11]. También se han desarrollado estrategias a nivel nacional y de comunidades autónomas. Como estrategia de prevención del cambio climático y sus efectos, España ha adoptado diferentes medidas de actuación en contribución al desarrollo sostenible y energía limpia desarrollando la Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia (EECCEL) 2007-2012-2020, la cual forma parte de la Estrategia Española de Desarrollo Sostenible (EEDS) [12]. En el caso de Castilla y León se han definido una serie de actuaciones de lucha contra el cambio climático en la llamada Estrategia Regional contra el Cambio Climático en Castilla y León 2009-2012-2020 [13].

Además de ser un gas de efecto invernadero, el CH₄ es un combustible utilizado en su forma licuada en hogares y vehículos, siendo también utilizado para la producción de energía calorífica o eléctrica (el calor generado en su

combustión es utilizado para generar vapor, el cual puede ser utilizado como fuente de calor o para la producción de electricidad) [5]. Sin embargo, para producir energía a partir del CH_4 se requieren concentraciones de este gas iguales o superiores al 20% en la emisión, encontrándose más del 56% del total de emisiones antropogénicas de este gas notablemente por debajo de esta concentración (poseen concentraciones inferiores a un 5% en CH_4 , constituyendo las denominadas emisiones diluidas) [2]. Dentro de este 56% de emisiones antropogénicas diluidas, los vertederos emiten CH_4 en concentraciones entre un 0 y un 20%, las minas de carbón ventiladas entre un 0.1 y un 1%, los tanques de almacenamiento de estiércol líquido cubiertos entre un 0 y un 3%, etc [8]. Estas emisiones, que no pueden ser utilizadas como fuente de energía, se presentan como un problema a solventar en cuanto a lo que la prevención del aumento del efecto invernadero se refiere.

Para ello, se han desarrollado diferentes métodos físico/químicos y biológicos de tratamiento de CH_4 . En lo que a los métodos físico-químicos se refiere, los más destacados son la incineración y la adsorción en carbón activo [14]. Los problemas presentados por ambos tratamientos (necesidad de utilización de combustibles auxiliares y generación de partículas nocivas para el medio ambiente en el caso de la incineración [15], y aumento de la huella de carbono por el uso de energía de manera intensiva en el caso de la adsorción en carbón activo, además del alto coste de este método debido a la baja afinidad del carbón activo por el CH_4 [10]) han hecho necesaria la búsqueda de nuevas alternativas más económicas y respetuosas con el medio ambiente, fundamentalmente el tratamiento biológico, basado en el tratamiento del CH_4 mediante la acción de microorganismos especializados.

Algunos métodos de tratamiento biológico como biofiltros, biolavadores, biofiltros percoladores y sistemas de difusión de lodos activos, ya han sido probados eficazmente en el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles y malos olores [14] [16], demostrando ser más eficientes y económicamente más viables que los métodos físico/químicos para tratar estas emisiones [16] [17]. Sin embargo, la baja solubilidad del metano en agua [18] (lo cual conlleva una baja transferencia del CH_4 de la fase gaseosa a los microorganismos), y la falta de conocimiento actual sobre la microbiología subyacente a la oxidación del CH_4 con microorganismos, suponen una gran limitación al desarrollo de este tipo de tecnologías para el tratamiento del CH_4 .

Los organismos capaces de usar el CH_4 como única fuente de carbono y energía, en presencia de oxígeno, toman el nombre de metanótrofos aerobios y constituyen un subgrupo de bacterias dentro de los organismos metilótrofos (bacterias aerobias cuya fuente de carbono y energía son aquellos compuestos orgánicos de un átomo de carbono más reducidos que el ácido fórmico, como el CH_4 , metanol, metilaminas, halometanos, etc) [1] [5]. De manera general, los metanótrofos se ven altamente influenciados por las condiciones del medio en

el que se encuentran, tanto por los nutrientes presentes (ya sean macronutrientes como elementos traza o su suministro), como por la temperatura o el pH del medio. Las condiciones óptimas para el crecimiento y metabolismo de la mayor parte de los metanótrofos son: humedad en el lecho del 20 a 35%, temperaturas entre 25 y 35°C, pH entre 7 y 7.65 (habiéndose encontrado también metanótrofos en ambientes alcalinos con pHs de ~9 y otros en medios ácidos con pHs muy por debajo de 7), una concentración de amonio entre 12 y 61 μM , y una concentración de cobre menor de 4.3 μM [1].

Dentro de los metanótrofos se diferencian tres grandes grupos en función de sus características taxonómicas: metanotrofos de tipo I (γ -proteobacteria), cuya ruta metabólica de asimilación del formaldehído es la vía ribulosa monofosfato (RuMP), tipo II (α -proteobacteria), los cuales siguen la ruta de la serina en la asimilación del formaldehído, y tipo X, que también siguen la ruta RuMP en la asimilación del formaldehído, además de poseer la enzima ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa y crecer a temperaturas mayores que los tipo I y II [1] [5] [10]. A los metanotrofos tipo I pertenecen el grupo *Gammaproteobacteria*, grupo al que pertenecen los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylococcus*. Al tipo II pertenece el grupo *Alphaproteobacteria*, con los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*. Finalmente, al tipo X pertenece principalmente el género *Methylococcus* [10]. La presencia de metanótrofos del tipo I viene favorecida por una baja concentración de CH_4 y alta concentración de oxígeno, mientras que los de tipo II se ven favorecidos por una alta concentración de CH_4 y baja concentración de oxígeno [5].

La capacidad de poder utilizar el CH_4 como fuente de carbono y energía les viene dada a los metanótrofos por la presencia de unas enzimas denominadas metano monooxigenasas (MMOs), las cuales son las responsables de la oxidación del CH_4 a metanol, compuesto más ampliamente utilizado por microorganismos como fuente de carbono y energía. Existen dos tipos de estas enzimas:

- Metano monooxigenasas solubles (sMMO), presentes en el citoplasma. Éstas utilizan el $\text{NADH} + \text{H}^+$ como donador de electrones, poseen un sitio catalítico para el hierro, se ven reguladas por la presencia de cobre (Cu^{2+}) y son inhibidas a altas concentraciones de éste. Las sMMO han sido detectadas en metanotrofos de tipo II y tipo X [1] [5] [10].
- Metano monooxigenasas particuladas o unidas a membranas (pMMO), presentes en la membrana intracelular. Este otro tipo de MMOs necesitan tanto hierro como cobre para ser catalíticamente activas. La alta presencia de Cu^{2+} las favorece, siendo capaces de expresarse en cualquier tipo de metanótrofo que crezca en presencia de éste compuesto con una concentración mayor a 0.8 μM [1] [5] [10] [19] [20].

Siguiendo la ruta metabólica de los metanótrofos, representada en la Figura 5, el siguiente paso sería la bioconversión del metanol a formaldehído por medio de la enzima metanol deshidrogenasa [1] [10], seguido de la transformación de éste a ácido fórmico mediante la acción de las enzimas formaldehído deshidrogenasas o a biomasa a través de las rutas RuMP en los metanotrofos tipo I y X o de las rutas de la serina en los tipo II [10].

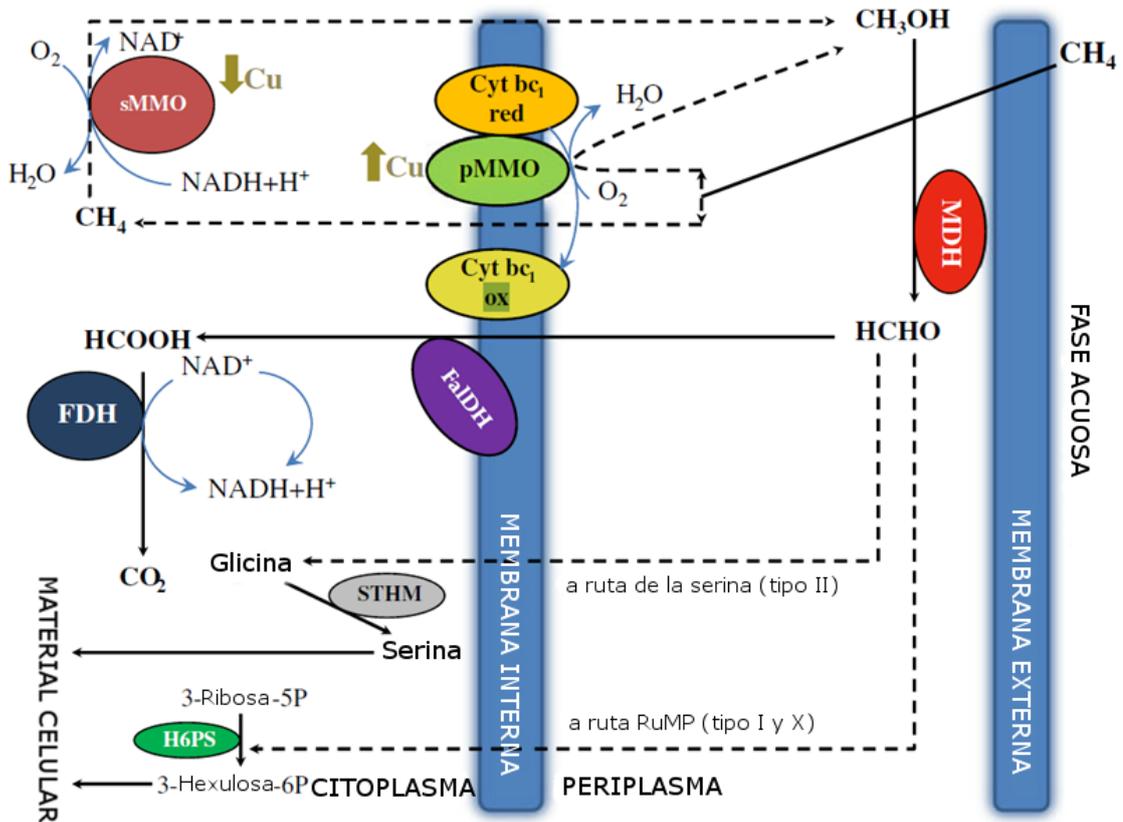


Figura 5: Rutas de oxidación del CH₄ en metanótrofos tipo I y II. Las líneas continuas representan un flujo unidireccional en la ruta, mientras que las líneas discontinuas representan rutas alternativas. sMMO, metano monooxigenasa soluble; pMMO, metano monooxigenasa particulada; MDH, metanol deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa; FALDH, formaldehído deshidrogenasa; cyt red/ox citocromo reducido / oxidado; STHM, serina hidroximetiltransferasa; H6PS, sintasa hexulosa-6-fosfato [10].

Otras de las características a destacar de los metanótrofos es su habilidad para catalizar un gran número de biotransformaciones de gran interés en el ámbito de la biorremediación, además de poder sintetizar bajo determinadas condiciones algunos productos de alto valor comercial [1], como por ejemplo:

- *Single-Cell Protein*: proteína utilizada tanto para alimentación animal como humana).
- Biopolímeros:
 - Polímeros de almacenamiento interno (PHA (polihidroxialcanoatos)) tales como los PHB (polihidroxibutiratos) y PHV (polihidroxivaleratos). Éstos son polímeros de

- almacenamiento bacteriano los cuales son investigados como posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.
- Polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS): poseen propiedades coloidales y adhesivas, además de los efectos que tienen sobre la reología de los líquidos, que los hacen interesantes para industrias como la farmacéutica, textil y del petróleo.
 - Lípidos para la producción de biodiesel o como suplementos para la salud humana (reducción del colesterol).
 - Vitamina B12.
 - Productos metabólicos solubles como metanol, formaldehído y ácidos orgánicos.
 - Óxido de propileno por catálisis de la célula entera (la amplia gama de sustratos para las MMO permite a estas enzimas degradar los contaminantes del suelo, así como generar productos, tales como 1- y 2-alcoholes de los C1-C8 n-alcanos, 1,2-epóxidos de los alquenos terminales y etanol / etanal del éter dietílico).
 - Osmoprotectores internos como las ectoínas, utilizados en la industria cosmética [5].

El presente estudio se centra en la obtención de PHAs, EPSs y ectoína, por lo que se hablará más extenso de estos compuestos, comenzando por la ectoína, pues es el que tiene mayor valor en el mercado con un precio de 1300 \$·kg⁻¹ [2].

La ectoína (ácido (S)-2-metil-3,4,5,6-tetrahidropirimidino-4-carboxílico) (Figura 6) es un compuesto osmo-protector intracelular cuya estructura es la de un ácido imino cíclico sintetizado por bacterias halófilas o halo tolerantes para evitar la deshidratación ante la concentración salina del medio exterior [5] [21], permitiendo a las bacterias (ya sea por sintetizarlo o por adsorberlo del medio) sobrevivir en un medio con ósmosis cambiante [22].

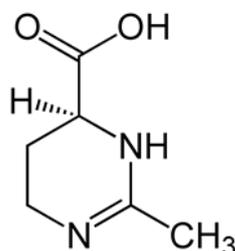


Figura 6: estructura química de la ectoína [23].

Sus principales usos son como estabilizador de enzimas, ácidos nucleicos y complejos de ADN-proteínas, además de ser utilizado en la industria cosmética como protector ante los daños que la radiación UV produce en el ADN de las células de la piel [5] [21]. Los usos que hasta ahora se han descubierto para este compuesto se recogen a continuación:

- Protección de macromoléculas:
 - Termoestabilidad de cianopicina sintetasa
 - Protección de enzimas contra el calentamiento, congelación y secado
 - Termoestabilidad de fitasa (90 ° C)
 - Protección de los anticuerpos contra la degradación proteolítica
 - Reducción efectiva de la temperatura de fusión del ADN
 - Estabilización del complejo LRP y H-NS en la regulación de la transcripción
 - Protección de LDH contra el calor, urea y congelación-descongelación
 - Protección de la membrana celular contra el agente tensioactivo
 - Optimización de las condiciones de cristalización de proteínas para la cristalografía de rayos X
- Usos terapéuticos potenciales:
 - Protección contra la inflamación pulmonar inducida por neutrofílica nanopartícula
 - Protección intestino delgado de isquemia fría y posterior calentamiento en lesión por reperfusión in vitro
 - Protección de las células neuronales de la toxicidad inducida por poliglutamina en la enfermedad de Machado-Joseph
 - La inhibición de la agregación y la neurotoxicidad de beta-amiloide del Alzheimer
 - La inhibición de la formación de amiloide insulina
 - Protección contra la proteólisis de zimógenos
 - Inhibir la agregación y la neurotoxicidad del péptido prión 106-206
- Protección celular:
 - Promover el efecto sobre la fermentación del etanol por *Zymomonas mobilis*
 - Implicado en la desintoxicación de fenol en *Halomonas*
 - Preservación de la actividad respiratoria en *Escherichia coli* (in vivo)
 - Osmoprotección de bacterias de ácido láctico
 - Inducción de la termotolerancia en *E. coli*
 - Estabilización de *E. coli* durante el secado y almacenamiento
 - Tolerancia a la sal en plantas de tabaco transformadas con ectoína
 - Tolerancia a la sal en las células de las plantas de tabaco transformadas con ectoína

De manera industrial la ectoína se produce por medio de las bacterias *Halomonas elongata* y *Brevibacterium epidermis* a través de un proceso denominado “biomilking” (Figura 7), consistente en fermentaciones sucesivas

basadas en choques osmóticos que promueven la síntesis de ectoína y su expulsión al medio [23] [24].

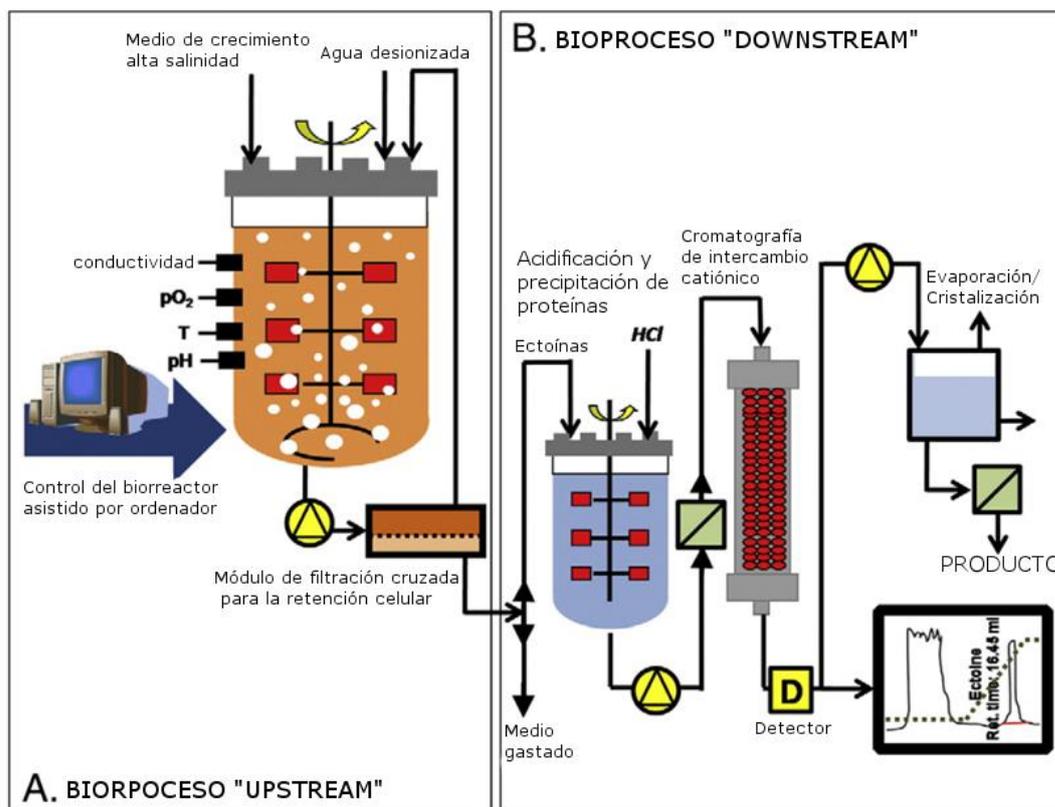


Figura 7: Diagrama general de la producción biológica de ectoína a nivel industrial [23].

Hasta hace poco se conocía un único metanótrofo capaz de producir ectoína: *Methylomicrobium alcaliphilum* 20 Z, metanótrofo aislado por primera vez en los lagos de sosa de Tuva en Asia Central por el equipo de Trotsenko en 1997 [25] [26]. Un estudio más reciente llevado a cabo en el departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid consiguió enriquecer metanótrofos de distintas fuentes capaces de producir ectoína ante un medio salino [27].

Por otro lado, los PHAs (polihidroxicanoatos (Figura 8)) son poliésteres de varios hidroxialcanoatos sintetizados por un gran número de bacterias (al menos 75 tipos diferentes). Estos polímeros son acumulados intracelularmente bajo condiciones de estrés (limitación de nutrientes), actuando como reservas de carbono y energía. Algunas bacterias pueden acumular más de un 90% en masa seca de ese polímero. Su principal uso en la industria, tal y como se ha mencionado antes, es como sustituto de los plásticos derivados del petróleo.

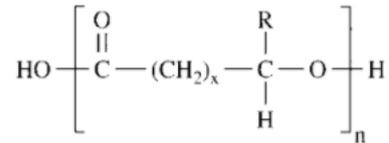


Figura 8: estructura de los polihidroxicanoatos (PHAs) [28].

Las bacterias productoras de PHAs se dividen en dos grupos: el primer grupo requiere de la limitación de un nutriente esencial, como nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre, para la acumulación de PHAs [28] [29]. A este grupo pertenecen bacterias como *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*. El segundo grupo de bacterias, el cual incluye a *Alcaligenes latus*, una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*, y *Escherichia coli* recombinante, puede acumular PHAs durante su crecimiento sin necesidad de limitación de nutrientes. Los principales miembros de la familia de los PHAs son los PHB (poli(3-hidroxi butirato)) y PHV (poli(3-hidroxi valerato)) [28].

En la industria los PHAs son producidos mediante la fermentación de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa), alcoholes (metanol, glicerol), alcanos (del hexano al dodecano) y ácidos orgánicos (del butirato en adelante). Además, los PHAs pueden ser producidos a partir de una gran variedad de fuentes, como recursos renovables (sacarosa, almidón, celulosa, triacilglicéridos), fuentes fósiles (CH₄, aceite mineral, lignito, carbón duro), subproductos (melaza, suero, glicerol), químicos (ácido propiónico, ácido 4-hidroxi butírico) y dióxido de carbono. Para aislar y purificar los PHAs las células son concentradas, desecadas y extraídas con disolvente a alta temperatura. Los residuos celulares son separados del disolvente con PHAs disueltos por medio de procesos de separación sólido-líquido. Los PHAs son precipitados a continuación con la adición de un compuesto no solvente, lavados con disolvente (cuando se requiere altas purezas) y secados en condiciones de vacío y temperaturas moderadas [28].

Por último, los EPSs (exopolisacáridos) son polisacáridos localizados en la superficie externa de la célula, los cuales permiten a las células formar agregados, unidos a una superficie o no, y de esta forma optimizar el uso de los nutrientes disponibles y mejorar su supervivencia ante diversos peligros externos y ante la desecación. Se puede apreciar a simple vista la presencia de estos polímeros por formación de colonias mucosas en medio sólido, o por aumento de la viscosidad en medio líquido. En cuanto a su composición química, “los EPSs están compuestos principalmente por carbohidratos, formando homo o heteropolímeros, que además pueden contener diversos sustituyentes orgánicos e inorgánicos” [30].

Comercialmente estos compuestos se utilizan principalmente en la industria alimentaria, industria farmacéutica y medicina, industria cosmética, como fuente de L-fucosa, industria del petróleo y de pinturas, en la agricultura y en la

adsorción de metales pesados [30]. Algunos EPSs, y su aplicación en la industria, se muestran en la Tabla 1.

PROPIEDADES	APLICACIÓN	POLÍMERO
Naturaleza antigénica que origina respuesta de anticuerpos	Agentes antitumorales, antivirales, inmunomoduladores	β -D-glucanos
Anticoagulantes	La misma de la heparina	EPS de <i>Escherichia coli</i> K5
Naturaleza polisacáridica	Sustratos de enzimas	EPS de <i>Escherichia coli</i> K5
	Preparación de oligosacáridos	Curdano, pululano, escleroglucano
Estabilizantes de emulsiones	Helados, aderezos de ensaladas	Xantano
Formadores de fibras elásticas	Membranas acústicas	Celulosa bacteriana
Formadores de películas	Cubiertas protectoras de alimentos y de formas farmacéuticas	Pululano, celulosa bacteriana
Agentes floculantes	Extracción de minerales	Varios
Estabilizantes de espumas	Cerveza, extintores de incendios	Xantano
Agentes gelificantes	Tecnología celular y enzimática	Gelano
	Pastelería, postres lácteos, gelatina	Curlano, gelano
	Recuperación de petróleo	Curlano, xantano
Agentes hidratantes	Cosméticos y productos farmacéuticos	Ácido hialurónico
Inhibidores de la formación de cristales	Alimentos congelados, pastillas y jarabes azucarados	Xantano
Agentes suspensores	Formulación de pesticidas y sprays	Xantano
Agentes viscosizantes	Tintas de impresoras, tintes textiles, pinturas	Xantano
	Mermeladas, salsas y jarabes	

Tabla 1: Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos [30].

Los microorganismos que poseen la capacidad de producir estos polisacáridos son de diferente naturaleza. Hasta ahora se conoce que ciertos microorganismos como las bacterias del ácido láctico (*Leuconostoc mesenteroides* o *Lactobacillus brevis*), cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris* y algunos organismos eucariotas, como algas o levaduras, son capaces de producir EPS [31].

De manera industrial los EPSs se obtienen mediante fermentadores aireados agitados mecánicamente para proporcionar la turbulencia necesaria tanto para obtener un correcto mezclado como para la formación de pequeñas burbujas de aire, las cuales mejoran la transferencia del oxígeno al agua. La obtención de los EPSs puede realizarse de diversos modos a escala industrial utilizando tecnologías muy parecidas a las utilizadas en la obtención de otros polímeros solubles en agua como las gomas de algas o de plantas. Primero, las células se retiran por diversos métodos, ya sean físicos, como la filtración o la centrifugación, químicos o enzimáticos para ser degradadas. Tras esto el producto es precipitado mediante isopropanol, etanol, metanol o acetona (el solvente empleado se recupera mediante destilación para rentabilizar el proceso). El producto ya precipitado se separa por técnicas de separación sólido-líquido, se deshidrata mecánicamente y se seca. Normalmente el producto seco se muele y se empaqueta en recipientes con baja permeabilidad al agua. Las fuentes de carbono y nitrógeno, su concentración en el medio, la temperatura, el pH, o la limitación de ciertos nutrientes influyen en la producción de los EPSs [30].

Hasta ahora se conoce muy poco de la síntesis de sustancias de alto valor por metanótrofos, sin embargo, la bioconversión de las emisiones de CH_4 a productos de alto valor industrial es posiblemente la solución definitiva para terminar con los efectos adversos de las emisiones diluidas de CH_4 en el medio ambiente y la producción de sustancias biodegradables y ambientalmente respetuosas.

A pesar de que se ha conseguido producir ectoína, PHAs y EPSs con metanótrofos, estos estudios aún son muy pioneros y no se han probado su viabilidad en biorreactores operando en continuo. Además, cabe destacar que nunca se ha probado una producción conjunta de estas tres sustancias de alto valor en reactores para el tratamiento de CH_4

Por eso esta investigación se ha enfocado en la producción de ectoína, PHAs y EPSs en reactores biológicos a partir de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, así como a partir de un consorcio metanótrofo enriquecido en los laboratorios del Grupo de Tecnología ambiental de la Universidad de Valladolid. De esta manera, se llevará a cabo por primera vez una evaluación sistemática de la viabilidad técnica y económica de una nueva generación de biorreactores basados en la bioconversión de CH_4 a varias sustancias de alto valor económico, como son la ectoína, los PHAs y los EPSs,

2. Objetivos



Los principales objetivos del presente trabajo fueron:

- El estudio de la obtención en continuo de varios productos de alto valor añadido (ectoína, PHAs y EPSs) a partir de CH_4 (segundo gas de efecto invernadero) en continuo y de manera simultánea mediante metanótrofos alcalófilos.
- La influencia de la concentración de Mg^{2+} en la producción en continuo de estos productos.



3. Materiales y métodos



Reactivos químicos y medio mineral salino

El medio mineral salino (MMS) utilizado en ambas condiciones es una modificación del medio de Brunner preparado acorde con Kaluyzhnaya y col. (2008) con un pH final de 9. El $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fue añadido al MMS en diferentes concentraciones según cada condición (0.2 g L^{-1} ó 0.02 g L^{-1}). Todos los químicos y reactivos fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España) con una pureza superior al 99.0%. EL CH_4 fue adquirido de Abello-Linde, S.A. (Barcelona, España) con una pureza superior al 99.5%.

Descripción detallada del medio salino (g L^{-1}):

NaCl	60 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Variable según la condición
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.02 g
KNO_3	7.2 g
Solución micronutrientes	10 ml
Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000 ml

Solución de micronutrientes (g L^{-1}):

EDTA	5.00 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.00 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
Na_2MoO_4	0.03 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 g
H_3BO_3	0.03 g
Agua destilada tipo II	1000.00 ml

Salas para la regulación del pH. Éstas son añadidas a 1 L del medio estéril a temperatura ambiente.

NaHCO_3 (1M)	50.0 ml
Na_2CO_3 (1M)	5.0 ml
Buffer fosfato	20.0 ml

Buffer fosfato:

KH_2PO_4	7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15 g
Agua destilada tipo II	500 ml

Todo el material y el medio se esterilizan en autoclave (121°C, 1.18 atm, 21 min). Las sales se esterilizan por separado para evitar precipitación. El pH se ajusta finalmente a 9 para obtener un medio alcalino.

Inóculos utilizados

Se usaron dos tipos de inóculos:

- R1: Una cepa pura de *M. alcaliphilum* 20 Z, comprada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (Leibniz-Institut) para uso académico. Se trata de un organismo metanótrofo de tipo I, halófilo, alcalino tolerante, capaz de sintetizar ectoína en presencia de NaCl [26] [2]. Fue comprado como un cultivo líquido concentrado estéril que se conservó en tubos Eppendorf de 1 ml con un 30% de glicerol a -80°C. Para la preparación de los inóculos se usaron 2 botellas de 1200 ml estériles cerradas con septum de butilo estancos para gases y tapones de rosca. MMS sin sales fue añadido hasta un volumen de 200 ml y un 2.5 % (v/v) de la cepa pura fue añadido a cada botella. Parte del aire del espacio de cabezas de cada botella de crecimiento de inóculo fue reemplazado por CH₄ (aproximadamente 8% v/v). El crecimiento se realizó en una incubadora orbital a 25°C y 200 rpm.
- R2: Consorcio de bacterias aislado del enriquecimiento a un 6% de NaCl de metanótrofos halotolerantes de inóculos procedentes de:
 - Lodos activos aerobios de la planta de desnitrificación-nitrificación de tratamiento de aguas residuales “El Mazo” (Cantabria, España).
 - Estiércol fresco de vaca (Cantabria, España).

Este enriquecimiento se analizó por análisis metagenómico, conformándose principalmente por los órdenes: *Xhantomonadales* (62.5 %), *Caulobacterales* (12.5 %), *Rhodobacterales* (6.6 %), *Sphingobacterales* (2.5 %), *Rhizobiales* (2.5 %), *Tiотrichales* (2.5 %), *Rhodotermales* (0.8 %), *Methylococcales* (1.7 %) y bacterias no clasificadas (8.4 %).

Para la preparación de los inóculos se usaron 2 botellas de 1200 ml estériles cerradas con septum de butilo estancos para gases y tapones de rosca. MMS con un 6% de sales fue añadido hasta un volumen de 200 ml y un 2.5 % (v/v) del consorcio fue añadido a cada botella. Parte del aire del espacio de cabezas de cada botella de crecimiento de inóculo fue reemplazado por CH₄ (aproximadamente 8% v/v). El crecimiento se realizó en una incubadora a 25°C y 200 rpm.

Experimento en reactores de columna de burbujeo con diferentes condiciones de concentración de magnesio

Inoculación

Cada reactor fue inoculado con un 20% (v/v) de cada inóculo mencionado en el apartado anterior.

Sistema experimental y operación

Tal y como puede observarse en la Figura 9, se operaron dos reactores en continuo de columna de burbujeo de 2.0 L (Afora S.A., España). Ambos reactores fueron alimentados con una corriente gaseosa con un 4% de CH₄ (concentración típica encontrada en vertederos, minas de carbón, tanques de almacenamiento de estiércol y explotaciones de ganado vacuno y por debajo del límite de explosividad [18]). Esta corriente de alimentación se obtuvo mediante la mezcla de una corriente de CH₄ puro procedente de bombona controlada por medio de un controlador de flujo másico (Aalborg, EE.UU.) con una corriente de aire en la cámara de mezcla mostrada en la Figura 9. Los flujos en ambos reactores se fijaron por medio de los rotámetros mostrados en la Figura 9 en 66.7 mL min⁻¹ corregidos con la presión, resultando en 47 mL min⁻¹ para el reactor R2 y 50 mL min⁻¹ para el reactor R1. Este flujo y este volumen de reactor dieron como resultado un tiempo de residencia del gas de aproximadamente 30 min. La agitación en los reactores se consiguió mediante el fino burbujeo de la corriente gaseosa de alimentación, la cual fue introducida por medio de 3 difusores porosos de acero inoxidable de 2 μm unidos entre sí situados en el fondo de cada reactor. A pesar de esta agitación, para evitar la acumulación de biomasa precipitada en el fondo de los reactores se realizó una agitación manual a través del tubo toma-muestras de líquido diaria. La temperatura se mantuvo a 25°C durante todo el experimento mediante la climatización de la sala en la que se encontraban los reactores. El intercambio de líquido en ambos reactores se realizó de manera manual a través de la extracción diaria de 100 mL de caldo de cultivo por medio de una jeringa de plástico de 100 mL a través del tubo toma-muestras y la introducción del mismo volumen de MMS fresco del mismo modo. Cada 2 días este volumen de caldo de cultivo extraído de los reactores fue utilizado para la realización de los distintos análisis llevados a cabo en este experimento. La velocidad de dilución con la que se trabajó en este experimento fue por tanto de 0.05 d⁻¹.

Se operaron los reactores con dos condiciones diferentes: con y sin limitación de magnesio:

- Condición 1: sin limitación de magnesio: MgSO₄ · 7H₂O = 0.2 g L⁻¹
- Condición 2: con limitación de magnesio: MgSO₄ · 7H₂O = 0.02 g L⁻¹

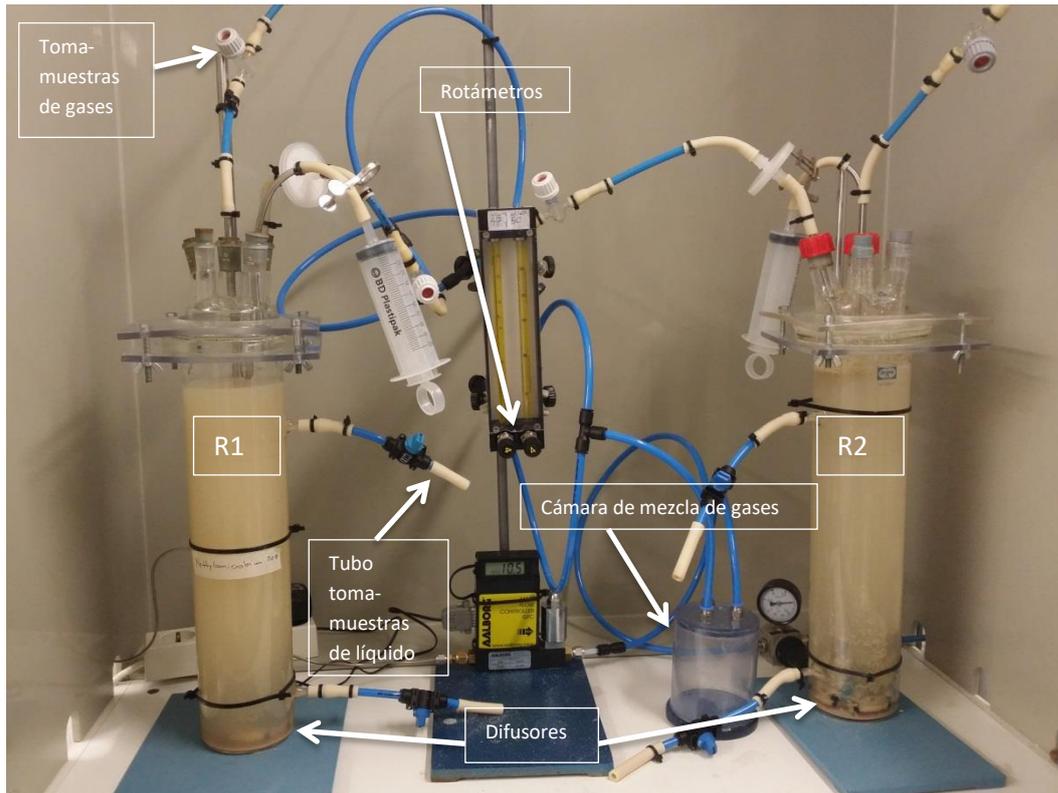


Figura 9: Reactores de columna de burbujeo utilizados durante la experimentación.

Análisis realizados

Monitorización de las concentraciones de CO₂ y CH₄ en la alimentación y la salida

Las concentraciones de CO₂, CH₄ y O₂, tanto en la corriente de entrada al reactor como en la de salida, se determinaron en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, EE.UU.) equipado con columnas CP-Molsieve 5A (15 m x 0,53 μm x 15 μm) y CP-PoraBOND Q (25 m x 0,53 μm x 10 μm). Las temperaturas del horno, inyector y del detector se mantuvieron a 45°C, 150°C y 200°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a 13,7 mL min⁻¹. [2]

Estos datos fueron utilizados en el experimento para estudiar la capacidad de eliminación de CH₄ (CE, g h⁻¹ m⁻³), la eficiencia de eliminación de CH₄ (EE, %) y la producción total de CO₂ (PT CO₂, g h⁻¹ m⁻³), parámetros comúnmente utilizados en reactores en continuo. La manera de determinar estos parámetros es la representada en las siguientes fórmulas:

$$CE = \frac{([CH_4]_e - [CH_4]_s) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EE = \frac{[CH_4]_e - [CH_4]_s}{[CH_4]_e} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$PT\ CO_2 = \frac{([CO_2]_s - [CO_2]_e) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo:

- $[CH_4]$ = concentración de metano (e = a la entrada; s = a la salida) en $g\ m^{-3}$
- Q = flujo de gas a tratar en $m^3\ h^{-1}$
- V = volumen del reactor en m^3
- $[CO_2]$ = concentración de dióxido de carbono (e = a la entrada; s = a la salida) en $g\ m^{-3}$

Medida de SST

Los SST se midieron de acuerdo a los métodos estándar [32] [2].

Medida del pH

La medida del pH se realizó por medio de una sonda de pH calibrada.

Análisis de TOC-TN

La concentración de TOC y TN se midió en un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, Tokio, Japón) acoplado a un módulo de detección de quimioluminiscencia TN (TNM-1, Shimadzu, Japón).

Análisis de ectoína intracelular

Para la determinación de la ectoína intracelular, se procedió a la rotura celular, tanto física, como químicamente, y a la solubilización de la ectoína en el medio de extracción. Para ello, 2 ml del caldo de cultivo se centrifugaron en tubos Eppendorf de 2 ml a 10000 rpm y 4°C durante 10 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se añadieron 25 ± 5 mg de perlas de zirconio /sílice de 0.1 mm de diámetro (BioSpec, España) y 1.5 ml de etanol al 70%. Tras esto, las células bacterianas fueron desintegradas en un Mini-BeadBeater-16 (BioSpec, España) durante 1 min, dejando la suspensión toda la noche a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Posteriormente fue filtrada con filtros de 0.22 μm (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. La concentración de ectoína se determinó por HPLC-UV en un HPLC 717 plus con muestreo automático (Waters, Bellefonte, EE.UU.) acoplado con un Dual UV λ absorbancia detector (Waters, Bellefonte, detector EE.UU.) a 210 nm utilizando un AQ LC-18 + columna C Supelcosil (Waters, Bellefonte, EEUU) y un C18 AQ + pre-columna

(Waters, Bellefonte, EEUU). Como fase móvil se utilizó un tampón de fosfato consistente en 0.1824 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ y 2.15 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ en 1 L de agua destilada tipo II, a 25°C y un caudal de 1 mL min⁻¹. La cuantificación de ectoína se llevó a cabo realizando una curva patrón con distintas concentraciones conocidas de ectoína pura (comprada en sigma, Aldrich, USA) y las áreas detectadas por el HPLC, además se determinaron los límites de detección y cuantificación considerando aceptables valores de ratio de señal y ruido de 2:1 y 10:1 respectivamente (el límite de detección es la menor concentración de sustancia a analizar que es capaz de detectar el equipo, mientras que el límite de cuantificación es la mínima concentración de sustancia a analizar para la cual el equipo da un resultado fiable teniendo en cuenta el ruido). La concentración de ectoína intracelular específica (mg ectoína g biomasa⁻¹) se calculó utilizando la concentración de SST (g L⁻¹) del caldo de cultivo correspondiente.

Análisis de ectoína extracelular

Para la determinación de la ectoína extracelular se filtraron 1.5 mL del caldo de cultivo con filtros de 0.22 µm (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. El equipo utilizado para analizar la ectoína es el mismo que el utilizado para el análisis de la ectoína intracelular [2].

Análisis de PHAs

El análisis de los PHAs específicos, PHB y PHV, implicó la centrifugación de 2 mL de caldo de cultivo a 9000 rpm durante 10 min y el procesamiento del pellet de biomasa de acuerdo con Zúñiga et al. (2011). A continuación, se extrajo el PHB-PHV durante 4 h a 100°C utilizando 2 mL de cloroformo y se cuantificó (utilizando patrones externos) mediante GC-Masas en un sistema CG 161 7820A MSD 5977E (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) con columna de capilaridad de cera (30 m × 250 µm × 0,25 µm). Las temperaturas del detector e inyector se fijaron a 250°C, con una relación de separación de 1:10. La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 40 °C durante 5 min, se aumentó a 10°C min⁻¹ hasta 200°C y se mantuvo durante 5 min. El contenido celular de PHBV se normalizó como %PHBV = (g PHBV / g SST). La proporción PHV-molar del copolímero PHBV se estimó en base a la concentración de cada homopolímero y la relación peso/M de la norma del siguiente modo: % PHV = (g PHBV / g TSS) (PHV / PHBV) × 100 × (12/14) [33].

Método de Zúñiga et al. (2011) [29]:

Centrifugar 3 mL de muestra en 2 tubos eppendorf (1.5 mL c/u) a 10000 rpm durante 10 min, retirar el sobrenadante y adicionar 0.5 mL de propanol ácido al 20% a cada tubo, vaciar el contenido en un tubo HATCH con rosca, el volumen final de propanol ácido es de 1 mL de propanol ácido por tubo.

Adicionar al tubo 2 mL de cloroformo, sellarlos con cinta teflón, poner a 100°C durante 4 h en el digestor HATCH. Enfriar a temperatura ambiente y adicionar 1 mL de agua desionizada y agitar vigorosamente durante 1 min. Dejar reposar y esperar a que se formen las dos fases, tomar la fase orgánica (inferior) con una pipeta pasteur filtrar y llevar a un vial de GC-Masas para posteriormente analizar la muestra.

Análisis de EPSs

Para la determinación de la producción total de EPSs en el medio de cultivo se utilizaron diversos métodos buscando el más adecuado. Primero se probó su determinación en tubos falcon. Para ello se centrifugaron 20 mL de biomasa en tubos falcon a 10000 rpm y 4°C durante 10 min. Tras esto se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a otro tubo falcon previamente desecado a 56°C y pesado. Además de los 5 ml de sobrenadante se añadieron 3 volúmenes (15 mL) de etanol al 90% (v/v), dejando precipitar los EPSs durante al menos 24 horas. Pasadas las 24 horas se centrifugaron los tubos falcon a 10000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Al comprobar que se perdía bastante cantidad de EPSs se pasó a centrifugar durante 20 minutos. Una vez centrifugado se desechó el sobrenadante con ayuda de una pipeta para evitar que los EPSs se vieran arrastrados obteniendo unos resultados erróneos. Los falcon con los EPSs se dejaron secar durante al menos 24 horas en una estufa a 56°C, tras lo cual se pesaron en una balanza analítica, obteniendo el resultado como diferencia entre las pesadas del falcon desecado y el falcon con EPSs, considerando el volumen de muestra tomado para evaluar la concentración. Éste método de análisis resultó dar muchos problemas, por lo que se procedió a comenzar a realizar el análisis de manera similar pero en tubos eppendorf de 2 mL, de tal modo que se centrifugaron 2 ml de biomasa, tomando 0.5 mL de sobrenadante e introduciéndolos en un tubo eppendorf previamente desecado a 56°C y pesado. Se añadieron nuevamente 3 volúmenes de etanol (1.5 mL) al 90% (v/v) dejando precipitar los EPSs durante al menos 24 horas. Tras esto se centrifugaron los eppendorf a 10000 rpm y 4°C durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante con una pipeta. Posteriormente se dejó secar la muestra durante al menos 24 horas en una estufa a 56°C, procediendo a pesar la muestra en el eppendorf y obteniendo la concentración de EPSs por diferencia de pesada en balanza analítica y considerando el volumen de muestra utilizado. Todas las muestras tras ser pesadas fueron congeladas a -20°C.

Para evitar perder los datos de concentración de EPSs durante el tiempo de experimentación en los que se realizó la medida en tubos falcon se procedió a resuspender los EPSs en 1 mL de agua destilada tipo II, trasvasarlos a tubos eppendorf de 2 mL y añadir 1 mL de etanol al 90% (v/v) para volver a precipitarlos y proceder según lo descrito anteriormente en tubos eppendorf.



A mayores se realizó un nuevo análisis de EPSs en tubos eppendorf de esos días utilizando como muestra para el análisis la muestra guardada a -20°C del filtrado para análisis de TOC-TN, tomando de estas muestras los 0.5 mL para proceder según lo descrito anteriormente en tubos eppendorf.

La manera de analizar los EPS estuvo basada en Aisha Waheed Qurashi & Anjum Nasim Sabri (2012) [34].



4. Resultados y discusión

4. 1 Experimento en reactores de columna de burbujeo con diferentes condiciones de concentración de magnesio

El objetivo de esta investigación era observar la eliminación de CH_4 unida a la producción de ectoína, tanto intra-celular como extra-celular, PHAs y EPSs de manera simultánea y continua, en dos reactores de columna de burbujeo, con 0.2 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (condición 1) y 0.02 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (condición 2), e inoculados con *M. alcaliphilum* 20Z y un consorcio de bacterias metanótrofas.

4.1.1 Producción de ectoína intra-celular

Durante la condición de operación con $0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (condición 1) la producción de ectoína en estado estacionario se muestra en la Figura 10. Los valores medios de ectoína intracelular mostraron diferencias significativas entre ambos reactores, siendo en R1 de $94.5 \pm 18.2 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$, mientras que en R2 se detectó una producción media de ectoína de $73.2 \pm 6.3 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$.

La producción de ectoína intracelular media durante la operación de ambos reactores con una concentración de Mg^{2+} de 0.02 g L^{-1} (condición 2) se muestra en la Figura 10. En este caso, se detectó una producción de ectoína intracelular de $53.02 \pm 13.7 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$ en R1, mientras que R2 alcanzó valores de $55.9 \pm 11.2 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$, no observándose una diferencia significativa entre ambas producciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *M. alcaliphilum* 20Z produce mayores concentraciones de ectoína que el consorcio cuando si trabaja sin limitación de magnesio. Además, los valores de ectoína intracelular obtenidos en la condición 2 fueron menores que en la condición 1, independientemente del cultivo utilizado, probablemente debido al importante papel del magnesio en la ruta metabólica de la producción de ectoína [35]. Es de destacar que los valores de ectoína intracelular obtenidos en este estudio en ambos reactores fueron superiores en todos los casos a los obtenidos en estudios previos llevados en continuo en tanques agitados de mezcla perfecta inoculados con *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z [36] (Figura 11), donde los valores de ectoína alcanzados fueron de $37.4 \pm 3.8 \text{ mg de ectoína g biomasa}^{-1}$ (empleando 4% de CH_4 , 25°C , 6% de NaCl, $50 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} y una agitación de 300 rpm). Esta diferencia posiblemente se deba al estrés mecánico causado por la agitación mecánica en los tanques de mezcla perfecta en comparación con los reactores de columna por burbujeo usados en este estudio, que parecen más apropiados para el crecimiento de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z.

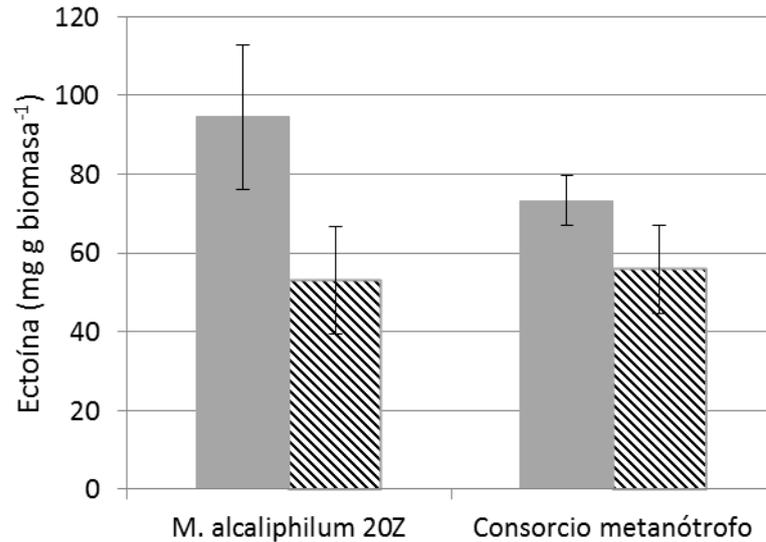


Figura 10: Comparación en la producción de ectoína intracelular (mg g biomasa⁻¹) entre las condiciones 1 y 2.

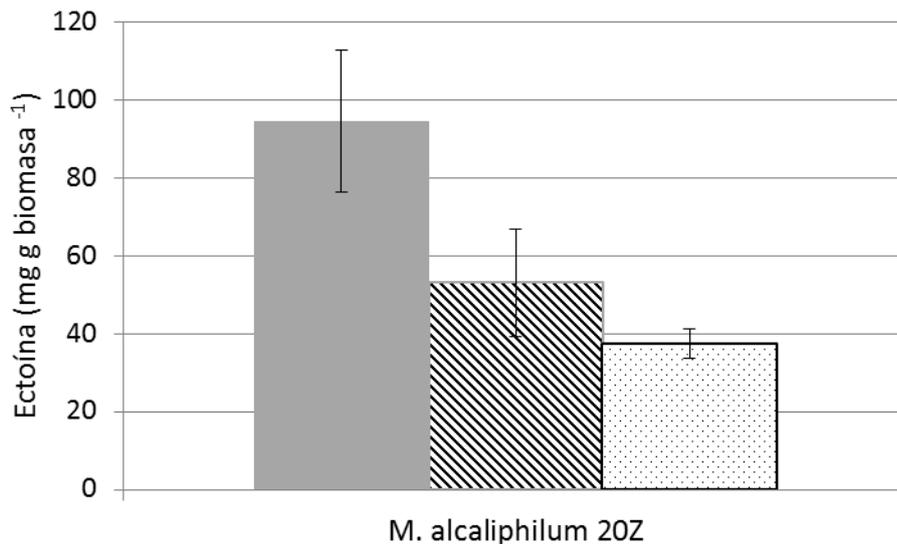


Figura 11: Comparación en la producción de ectoína intracelular (mg g biomasa⁻¹) por *M. alcaliphilum* 20 Z entre las condiciones 1 y 2 en reactores de columna de burbujeo y en reactor de tanque agitado a 300 rpm, 6% NaCl y 25 μ M de Cu^{2+} [36].

4.1.2 Producción de ectoína extra-celular

En el presente estudio no se detectó la presencia de ectoína extracelular en ninguna de las condiciones para ninguno de los inóculos, al contrario de lo sucedido en los experimentos llevados a cabo con anterioridad en el departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, en los que se obtuvieron valores de concentración de ectoína extracelular máximos (con una cepa pura de *M. alcaliphilum* 20 Z) de 16.02 mg L⁻¹ en el experimento llevado a cabo por Rodríguez et. al con un 6% de NaCl en reactores de tanque agitado a 300 rpm y 25 μ M de Cu^{2+} [27], y de

$12.9 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ en las mismas condiciones por Cantero et. al [36]. Esto es debido a que el medio de cultivo utilizado en este experimento no poseía una alta concentración de cobre, metal que induce una excreción de este compuesto osmoprotector [2].

4.1.3 Producción de PHAs

Durante la primera condición de operación ($0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$), la concentración de PHB media que se alcanzó en R1 fue de $1.30 \pm 0.2 \text{ mg PHB L}^{-1}$ ($1.08 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$), mientras que en el reactor consorcio las concentraciones encontradas fueron estadísticamente superiores, siendo $2.02 \pm 0.3 \text{ mg PHB L}^{-1}$ ($1.44 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$). En condiciones limitantes de magnesio ($0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$), la concentración de PHB media que se obtuvo en R1 fue $1.04 \pm 0.4 \text{ mg PHB L}^{-1}$ ($0.62 \pm 0.1 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$), mientras que R2 alcanzó una concentración 2 veces mayor ($2.56 \pm 0.5 \text{ mg PHB L}^{-1}$ ($2.1 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$)) (Figura 12). Independientemente de la concentración de magnesio utilizada, el consorcio produjo altas concentraciones de PHB en comparación con las producidas por *M. alcaliphilum* 20Z. Una mayor producción de PHB en el consorcio era de esperar teniendo en cuenta que se trata de una población mixta. Además, menores concentraciones de magnesio fomentaron la producción de más PHB, ya que se tratan de formaciones biopoliméricas que aparecen cuando hay escasez de algún nutriente esencial en el medio [29].

En el caso de los PHVs, no se detectaron estos compuestos teniendo en cuenta los límites de detección del GC-masas.

La bacteria por excelencia utilizada en la industria para la producción de PHBs ha sido *Alcaligenes eutrophus* ya que es capaz de producir un 50 % en masa de PHBs de alto peso molecular. Otras bacterias como *Bhurkoldenia* ($150 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$), *Azotobacter vinelandii* ($34.9 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$) y *Pseudomonas sp.* ($32 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$) están tomando también una gran importancia en el mercado de los bioplásticos por sus altas producciones de PHBs de calidad [37]. En el caso de los metanótrofos, son los metanótrofos tipo II por excelencia los productores de PHBs, como es el caso de *Methylosinus trichosporium* con producciones de hasta un $40\% \text{ g g}^{-1}$ y *Methylocystis sp.* con $51\% \text{ g g}^{-1}$ bajo condiciones de limitación de nitrógeno [38].

A pesar de que los valores obtenidos en este estudio son menores que los hallados en estudios con otros metanótrofos, es importante destacar de esta investigación que por primera vez se ha mostrado producción de PHBs con metanótrofos no considerados de tipo II.

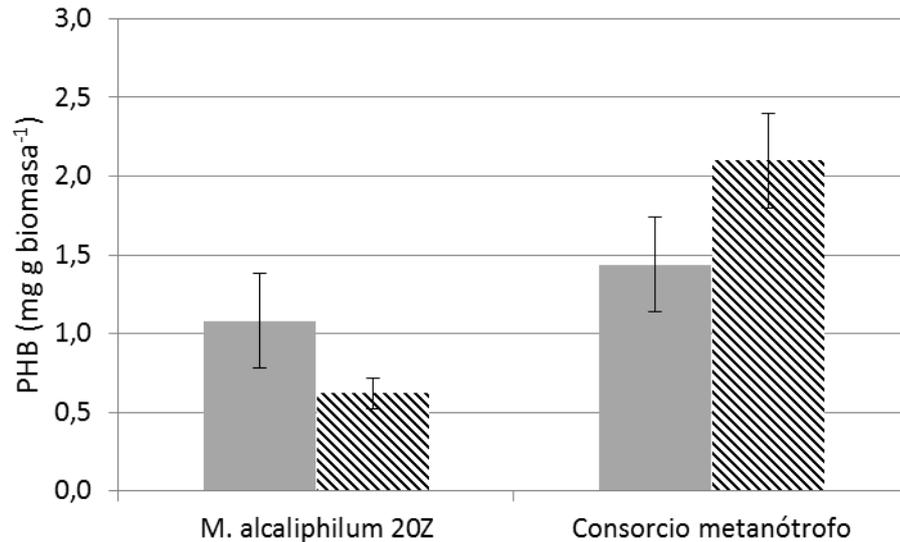


Figura 12: Comparación en la producción de PHB en mg g biomasa⁻¹ entre la ■ condición 1 y la ▨ condición 2.

4.1.4 Producción de EPSs

La producción de exopolisacáridos que se observó en estado estacionario durante las dos condiciones de estudio se muestra en la Figura 13. La concentración media obtenida durante la primera condición de operación ($0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$) en R1 fue $1550 \pm 757 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que en R2 las concentraciones en las mismas condiciones ascendieron a $2300 \pm 608 \text{ mg L}^{-1}$. Los valores obtenidos de concentraciones en la operación con 0.02 g L^{-1} de magnesio en condiciones estacionarias fueron de $1320 \pm 657 \text{ mg L}^{-1}$ por R1 y, $1000 \pm 637 \text{ mg L}^{-1}$ por R2.

Como se muestra en la Figura 13, durante la segunda condición de operación ($0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$) en la que se suministró menos magnesio, las concentraciones alcanzadas en R2 fueron menores que las obtenidas durante la primera condición ($0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$), de modo que su producción se ve afectada por la presencia de magnesio en el medio. Estos resultados pueden atribuirse a que el Mg^{+2} interviene en procesos bioquímicos en las rutas de la producción y excreción de polisacáridos [39]. Investigaciones realizadas por Hernández y col. (2015), hallaron concentraciones de EPS de $5.2 \pm 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ [40], mientras que Kiliç y col. (2008) obtuvieron producciones de 863.3 mg L^{-1} para *Pseudomonas aeruginosa* (pH=7, 96 horas de incubación, $50 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, 20°C), 444.6 mg L^{-1} para *Micrococcus sp.* (pH=7, 72 horas de incubación, $100 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, 20°C) y 430.5 mg L^{-1} para *Ochrobactrum sp* (pH=8, 48 horas de incubación, $150 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, 30°C) [41]. Los valores obtenidos en esta investigación son muy elevados respecto al resto de investigaciones. Teniendo en cuenta la alta concentración salina utilizada, el límite de detección del método de análisis fue de $600 \text{ mg EPS L}^{-1}$. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio nos sirven para confirmar la producción de EPSs en ambos reactores y para dilucidar la importancia del magnesio en su



producción, pero no nos permite hacer un estudio cuantitativo y comparativo estadísticamente relevante.

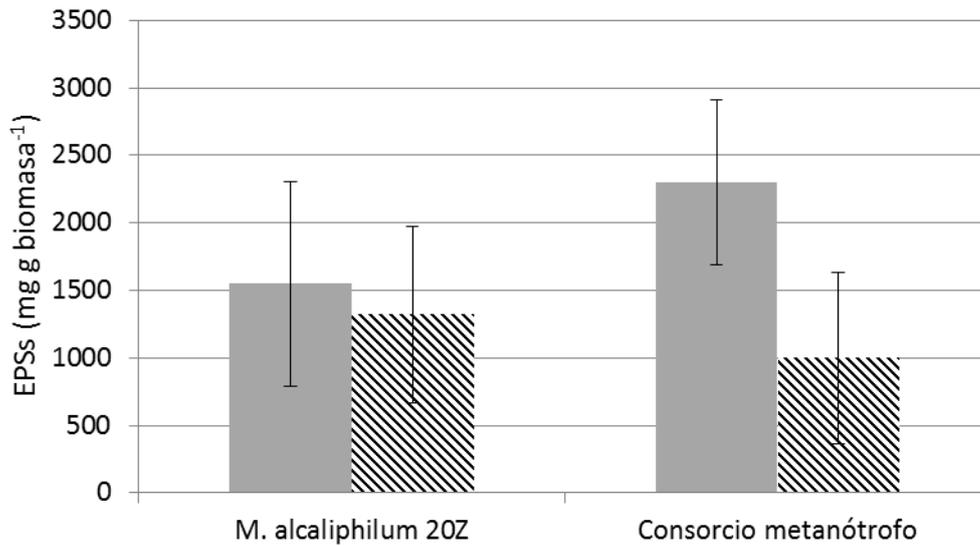


Figura 13: Comparación en la producción de EPSs (mg g biomasa⁻¹) entre las condiciones ■ 1 y ▨ 2.

4.1.5 Parámetros operacionales

La capacidad de eliminación de R1 fue de 16.01 ± 3.23 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ durante el estado estacionario trabajando con 0.2 g L⁻¹ de magnesio, mientras que la de R2 fue de 16.97 ± 1.41 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ en las mismas condiciones (Figura 14). Por otro lado, referida a la misma condición de operación anterior, la producción total de CO₂ de R1 fue de 37.15 ± 4.55 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ y en el caso de R2 alcanzó valores de 33.68 ± 3.53 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ (Figura 15)

En la segunda condición (0.02 g L⁻¹ Mg²⁺) se obtuvieron CE de 18.57 ± 2.99 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ y 15.15 ± 1.46 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ en R1 y R2 respectivamente (Figura 14), mientras que la PT CO₂ fue de 27.22 ± 4.91 y 23.38 ± 2.87 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ en ambos reactores (Figura 15).

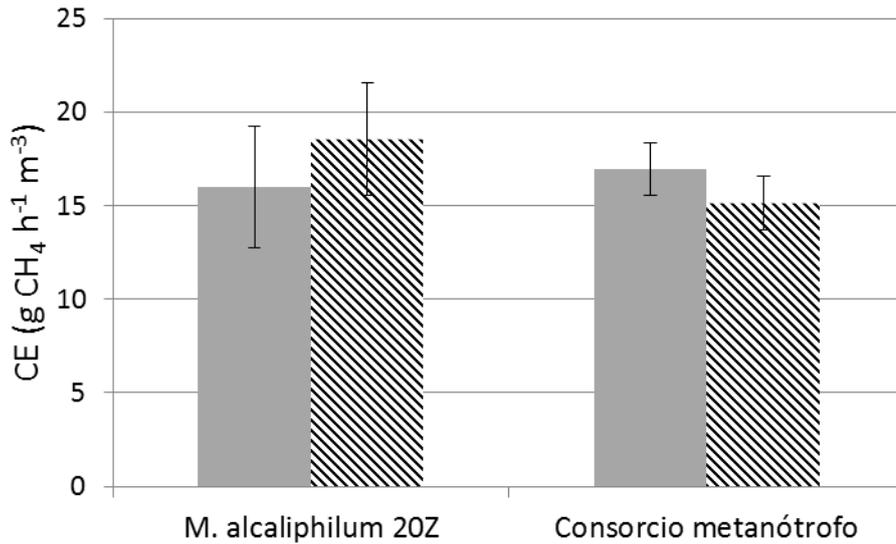


Figura 14: Comparación en la CE (g CH₄ h⁻¹ m⁻³) entre las condiciones 1 y 2.

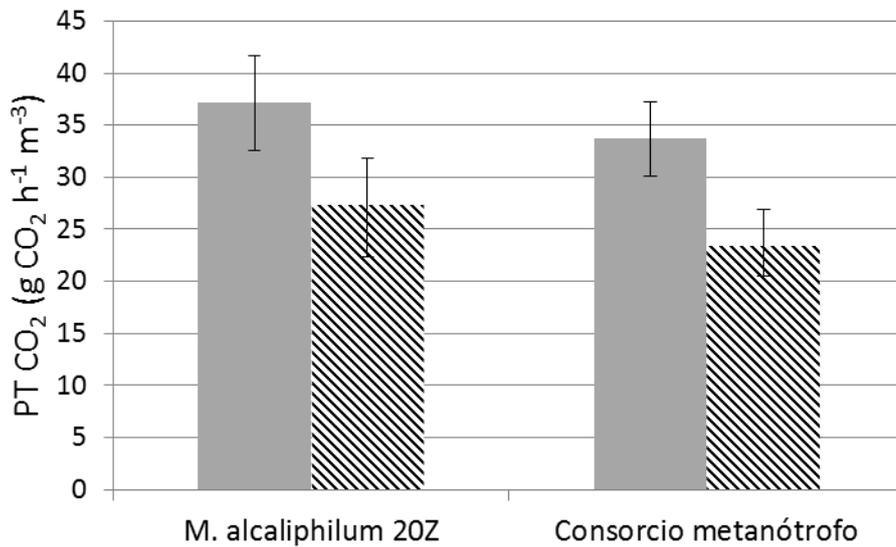


Figura 15: Comparación en la PT CO₂ (g CO₂ h⁻¹ m⁻³) entre las condiciones 1 y 2.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el magnesio no tuvo un papel determinante en las capacidades de eliminación del metano en ninguna de las comunidades metanotróficas estudiadas. A pesar de que se esperaba una mayor eliminación en R2 al aumentar la biodiversidad en los reactores, conllevando un aumento en la capacidad de la población de absorber perturbaciones, los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas entre ambos reactores. Por otro lado, aunque la producción de CO₂ fue más alta en *M. alcaliphilum* 20Z, esto seguramente se deba a que la asimilación de carbono en el consorcio fue más focalizada hacia la producción de metabolitos secundarios (como PHAs y EPSs) y biomasa. En otros estudios realizados con *M. alcaliphilum* 20Z los valores de CE alcanzados fueron mucho

menores que en esta investigación ($5.0 \pm 1.0 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ (6 % NaCl, reactor de tanque agitado inoculado con *M. alcaliphilum* 20 Z, con agitación 600 rpm y $0.05 \mu\text{M Cu}^{2+}$)). Estos resultados se deben seguramente al tipo de reactor utilizado y las altas tasas de agitación mecánica implementadas en estudios anteriores [36]. Es importante destacar que las producciones de CO_2 halladas en estos estudios anteriores son mayores que las que cabría esperar estequiométricamente con tales eliminaciones de metano, lo que demuestra que el metabolismo de *M. alcaliphilum* 20Z deriva una gran cantidad de carbono a la producción de CO_2 [18].

La Figura 16 representa la eficiencia de eliminación de cada biorreactor en cada condición de operación. Durante la operación con una concentración de 0.2 g L^{-1} de magnesio, la EE media en R1 fue de $26.08 \pm 5.16 \%$ en estado estacionario, siendo de $26.95 \pm 2.09 \%$ en R2 en las mismas condiciones operacionales. Respecto a la segunda condición (0.02 gL^{-1} de magnesio), el valor alcanzado de EE en R1 fue $31.22 \pm 4.22 \%$, mientras que en R2 llegaron a tomarse valores medios en estado estacionario de $26.20 \pm 1.70 \%$.

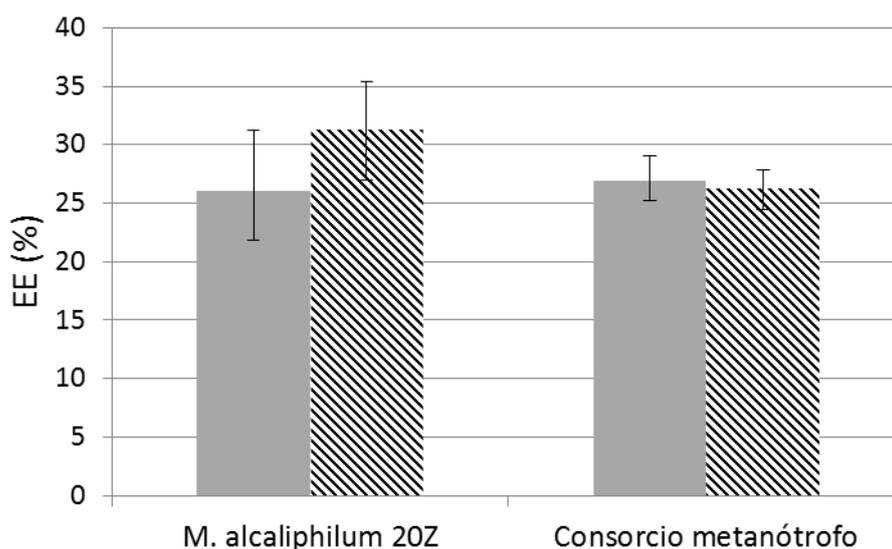


Figura 16: Comparación en la EE (%) entre las condiciones 1 y 2.

Al igual que en la CE, los valores de EE no mostraron diferencias significativas trabajando a diferentes concentraciones de magnesio.

La eficiencia de eliminación obtenida para ambos reactores, al igual que su capacidad de eliminación, no fue muy alta en comparación al $57 \pm 1 \%$ conseguido en reactores similares inoculados con metanótrofos [18]. Sin embargo, estos organismos son capaces de rentabilizar el proceso de degradación de metano al producir altas concentraciones de sustancias de alto valor añadido.





5. Conclusiones



De los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Resulta posible la obtención de manera simultánea de ectoína, PHAs y EPSs a partir de CH_4 mediante el uso de metanótrofos.
- La mayor producción de ectoína intracelular en estado estacionario se obtuvo con una concentración de magnesio de 0.2 g L^{-1} con un valor medio de $98.68 \pm 25.79 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$, obteniéndose además una mayor producción media que investigaciones anteriores. [27].
- Se observó que la disminución de concentración de magnesio en el medio de cultivo afecta negativamente a la producción de ectoína intracelular, ya que este nutriente tiene presencia en la ruta metabólica de dicho subproducto.
- La mayor concentración de PHB-V en estado estacionario se alcanzó en el reactor del consorcio. Además, la falta de magnesio fomentó la producción de PHB-V.
- Por primera vez se demostró producción de PHBs con metanótrofos no considerados de tipo II.
- La producción de EPSs se ve favorecida a altas concentraciones de magnesio en el medio y fue detectada en mayores concentraciones en el reactor consorcio.
- La capacidad de eliminación, la eficiencia de eliminación y la producción de CO_2 no se vieron influenciadas por la concentración de magnesio en el medio en ninguna de las comunidades de microorganismos usadas.



Bibliografía

- [1] R. S. H. A. T. E. HANSON, «Methanotrophic Bacteria,» *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, vol. 60, nº 2, p. 439–471, 1996.
- [2] R. L. L. S. P. A. G.-E. R. M. Sara Cantera, «Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement.».
- [3] «Atmospheric greenhouse gas concentrations,» European Environment Agency, 07 April 2016. [En línea]. Available: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/atmospheric-greenhouse-gas-concentrations-4/assessment>.
- [4] E. Morillo, «Acerca Ciencia,» 29 mayo 2015. [En línea]. Available: <http://www.acercaciencia.com/2015/05/29/el-cambio-climatico/>.
- [5] S. X. a. W. P. C. P. J. Strong, «Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?,» *Environmental Science and Technology.*, p. 4001–4018, 2015.
- [6] «United States Environmental Protection Agency. Global Greenhouse Gas Emissions.,» United States Environmental Protection Agency., 15 April 2016. [En línea]. Available: <https://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.html>.
- [7] IPCC, «Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo,» Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer, IPCC, Ginebra, Suiza, 2014.
- [8] R. L. P. A. G.-E. R. M. Sara Cantera, «Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures.,» *ELSEVIER*, pp. 11-20, 2016.
- [9] «TOX TOWN Inquietudes de salud ambiental y sustancias químicas tóxicas en su lugar de residencia, trabajo y diversión,» U.S. National Library of Medicine, 21 marzo 2017. [En línea]. Available: <https://toxtown.nlm.nih.gov/espanol/chemicals.php?id=93>.
- [10] G. Q. T. S. O. S. J. M. E. R. L. R. M. Juan C. López, «Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges.,» *Springer.*, p. 2277–2303, 2013.

- [11] «EEA,» 10 December 2015. [En línea]. Available: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/greenhouse-gas-emission-trends-5/assessment-1>.
- [12] «ESTRATEGIA ESPAÑOLA DE CAMBIO CLIMÁTICO Y ENERGÍA LIMPIA,» 2 noviembre 2007. [En línea]. Available: http://www.magrama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/est_cc_energ_limp_tcm7-12479.pdf.
- [13] «Medio Ambiente de Castilla y León,» 2 diciembre 2009. [En línea]. Available: http://www.medioambiente.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1259064156693/_/_/_.
- [14] N. (. K. R. L. R. M. José M. Estrada, «A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies.,» *ELSEVIER*, p. 1354–1363, 2012.
- [15] M. R. A. A. B. G. & H. M. Girard, «Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry-Influence of the methane and nitrogen concentrations.,» *Chemical Engineering Journal*, p. 151–158, 2011.
- [16] E. R. J. M. E. P. A. G.-E. R. M. Raquel Lebrero, «Odor abatement in biotrickling filters: Effect of the EBRT on methyl mercaptan and hydrophobic VOCs removal,» *ELSEVIER*, pp. 38-45, 2012.
- [17] S. V. B. G. S. R. Raul Muñoz, «Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds,» *ELSEVIER*, p. 410–422, 2007.
- [18] J. M. E. R. L. P. A. G.-E. R. M. Sara Cantera, «Comparative Performance Evaluation of Conventional and Two-phase Hydrophobic Stirred Tank Reactors for Methane Abatement: Mass Transfer and Biological Considerations,» *Biotechnology and Bioengineering*, pp. 1-10, 2015.
- [19] G. E. K. a. A. C. R. Ramakrishnan Balasubramanian, «Dual Pathways for Copper Uptake by Methanotrophic Bacteria.,» *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 286, nº 43, p. 37313–37319, 2011.
- [20] R. L. P. A. G.-E. R. M. Sara Cantera, «Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures,» *ELSEVIER*, pp. 11-20, 2016.
- [21] N. V. D. a. V. N. K. Yu. A. Trotsenko, «Biotechnological Potential of Aerobic Methylophilic Bacteria: A Review of Current State and Future Prospects.,» *MAIK "Nauka/Interperiodica"*, vol. 41, nº 5, p. 495–503, 2005.
- [22] F.-W. Y. W.-C. C. a. S.-Y. C. Yu-Hong Wei, «Production and characterization of ectoine by *Marinococcus* sp. ECT1 isolated from a high-salinity environment.,» *ELSEVIER.*, vol. 111, nº 3, p. 336–342, 2011.

- [23] M. S. M. A. V. B. M. R.-B. L. N. C. J. L. I. C. V. J. J. N. M. C. José M. Pastor, «Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production.,» *ELSEVIER.*, p. 782–801, 2010.
- [24] T. M. D. B. H. H. a. U. B. Torsten Schubert, «Continuous Synthesis and Excretion of the Compatible Solute Ectoine by a Transgenic, Nonhalophilic Bacterium.,» *American Society for Microbiology.*, vol. 73, nº 10, p. 3343–3347, 2007.
- [25] M. G. K. N. G. S. N. E. S. Y. A. T. Valentina N. Khmelenina, «Isolation and Characterization of Halotolerant Alkaliphilic Methanotrophic Bacteria from Tuva Soda Lakes.,» *CURRENT MICROBIOLOGY*, vol. 35, p. 257–261, 1997.
- [26] M. G. K. V. G. S. N. E. S. Y. A. T. G. G. Valentina N. Khmelenina, «Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs.,» *Springer-Verlag*, p. 321–329, 1999.
- [27] S. R. Plaza, Diseño de un proceso de valorización de gases de efecto invernadero, Valladolid: Universidad de Valladolid, 2016.
- [28] E. Rudnik, Compostable Polymer Materials, Elsevier, 2008.
- [29] M. M. S. L. B. S. R. C. Zúñiga, «Production of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor.,» *Journal of Hazardous Materials*, p. 876–882, 2011.
- [30] J. A. M. Gómez, Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger.*, Granada: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología., 2006.
- [31] H. Y. J. H. Y. W. S. H. T. Matsumoto, «Influence of extracellular polysaccharides (EPS) produced by two different green unicellular algae on membrane filtration in an algae-based biofuel production process.,» *Water Science Technology*, 2014.
- [32] «American Water Works Association,» 2016. [En línea]. Available: <https://www.standardmethods.org/>.
- [33] G. B. R. L. R. Osvaldo D. Frutos, «Assessing the influence of the carbon source on the abatement of industrial N₂O emissions coupled with the synthesis of added-value bioproducts.,» *Science of the Total Environment*, p. 765–771, 2017.
- [34] A. W. Q. & A. N. Sabri, «BACTERIAL EXOPOLYSACCHARIDE AND BIOFILM FORMATION STIMULATE CHICKPEA GROWTH AND SOIL AGGREGATION UNDER SALT STRESS,» *Brazilian Journal of Microbiology*, pp. 1183-1191, 2012.
- [35] M. S. M. A. V. B. M. R.-B. L. N. C. J. L. I. C. V. J. J. N. M. C. José M. Pastor, «Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production,» *Biotechnology*

- Advances*, nº 28, p. 782–801, 2010.
- [36] R. L. E. R. P. A. G.-E. R. M. Sara Cantera, «Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries,» 2017.
- [37] D. A. M. D. M. F. Leda R. Castilho, «Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation,» *Bioresource Technology*, nº 100, p. 5996–6009, 2009.
- [38] B. L. S. N. S. M. P. D. J. P. A. L. G. T. a. S. P. Peter James Strong, «The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane,» *microorganisms*, 2016.
- [39] E. p. y. J. L. Pilar Aranda, «Magnesio. Scientific Communication: Art o Technique?,» *ARS Pharmaceutica*.
- [40] J. H. & S. G.-C. & F. Omil, «EPS and SMP as Stability Indicators During the Biofiltration of Diffuse Methane Emissions,» *Water Air Soil Pollut*, 2015.
- [41] G. D. Nur Koçberber Kılıç, «Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp.,» *Journal of Hazardous Materials*, p. 1019–1024, 2008.
- [42] L. Rodríguez, «Por qué es importante el límite de 2 °C contra el cambio climático,» *BallenaBlanca*.
- [43] N. K. N. B. S. K. Afshan Malick, «Production of exopolysaccharides by selected *Bacillus* strains: Optimization of media composition to maximize the yield and structural characterization,» *International Journal of Biological Macromolecules*, nº 102, p. 539–549, 2017.

Anexos



Anexo I. Rectas de calibrado

Recta de calibración del CH₄:

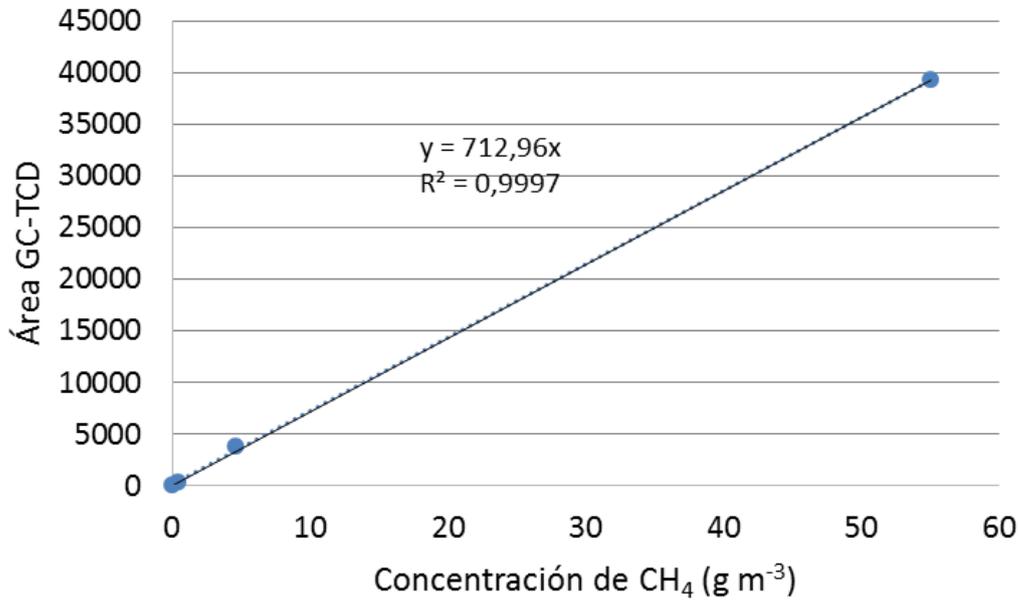


Figura 17: Recta de calibración de la concentración de CH₄ respecto al área proporcionada por el GC-TCD.

Recta de calibración del CO₂:

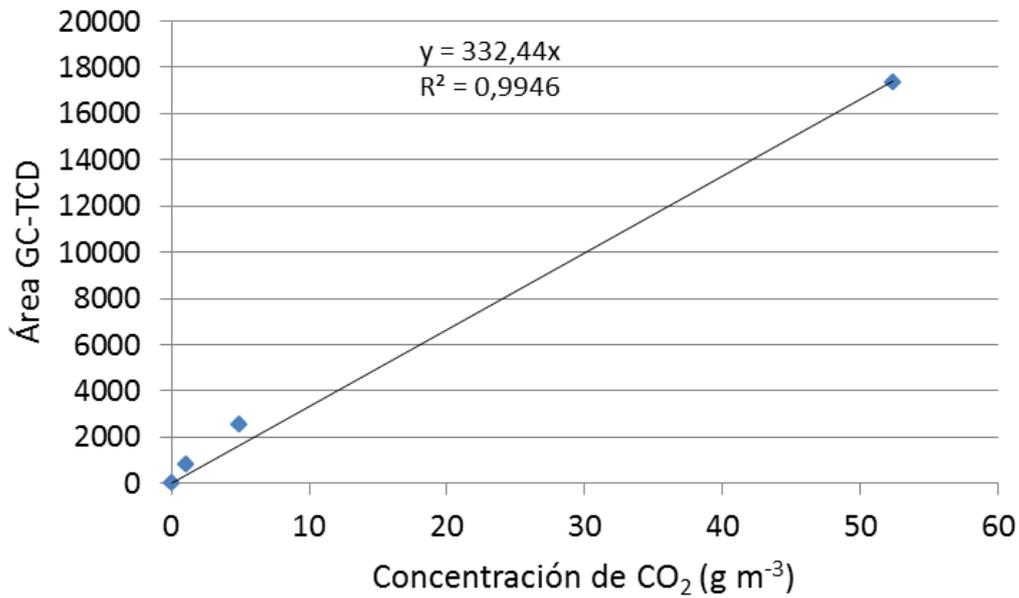


Figura 18: Recta de calibración de la concentración de CO₂ respecto al área proporcionada por el GC-TCD.

Recta de calibración de la ectoína:

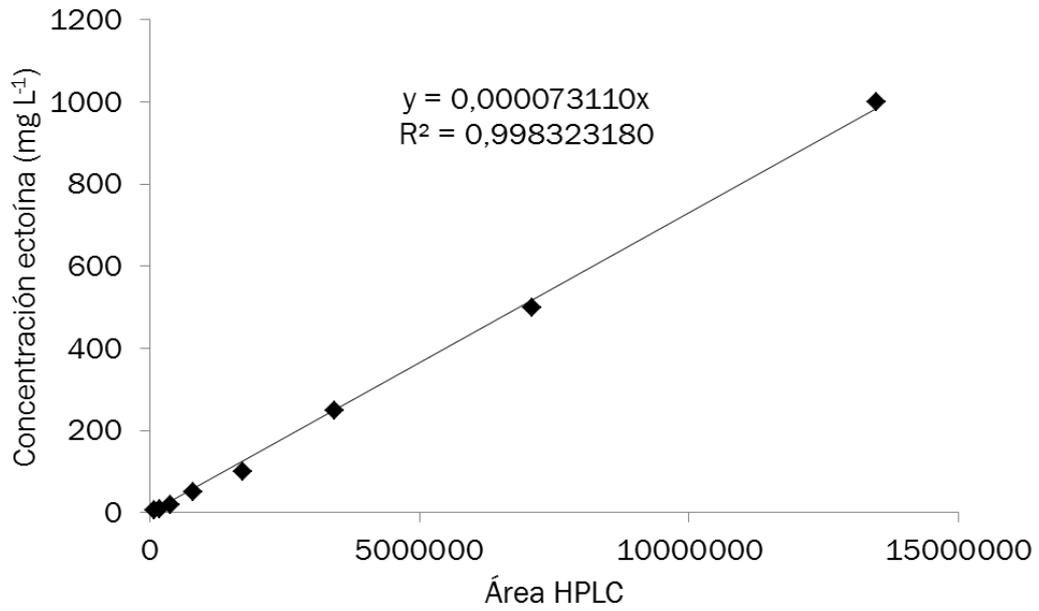


Figura 19: Recta de calibración de la concentración de ectoína en mg L⁻¹ respecto al área del HPLC.

Cromatogramas de HPLC para la detección de ectoína:

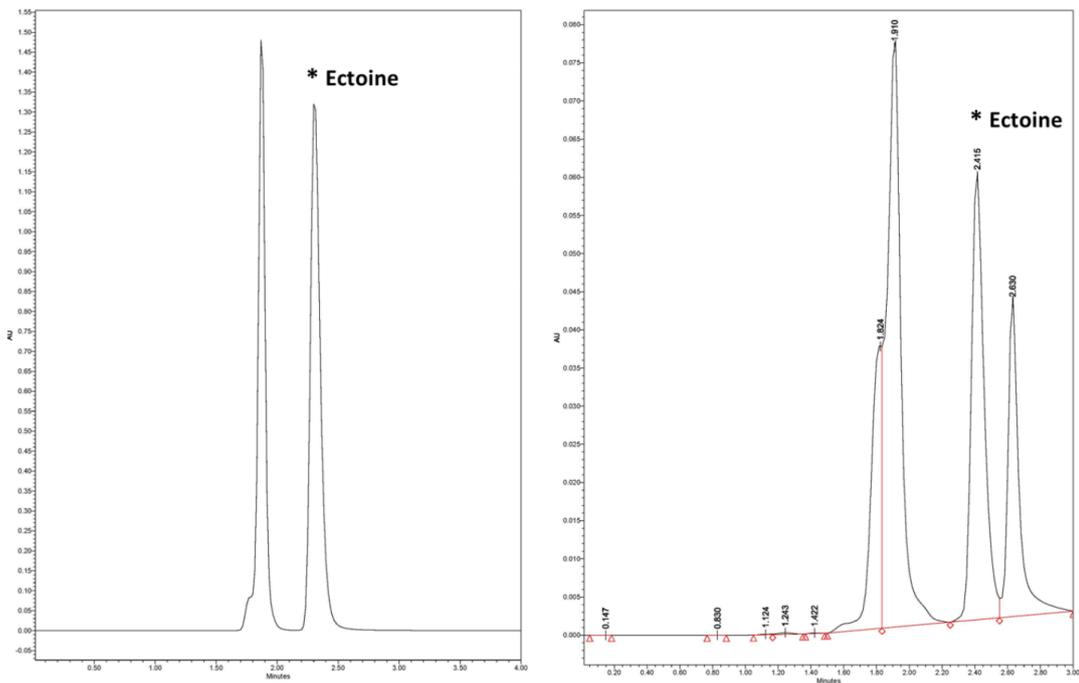


Figura 20: Cromatogramas de HPLC a) Estándar de ectoína a 100 mg L⁻¹ en MMS b) extracto de etanol de *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z cultivado con un 3% de NaCl, 0.05 μM de Cu²⁺, 4% de CH₄, a 25°C en MMS.

Recta de calibración de los PHB:

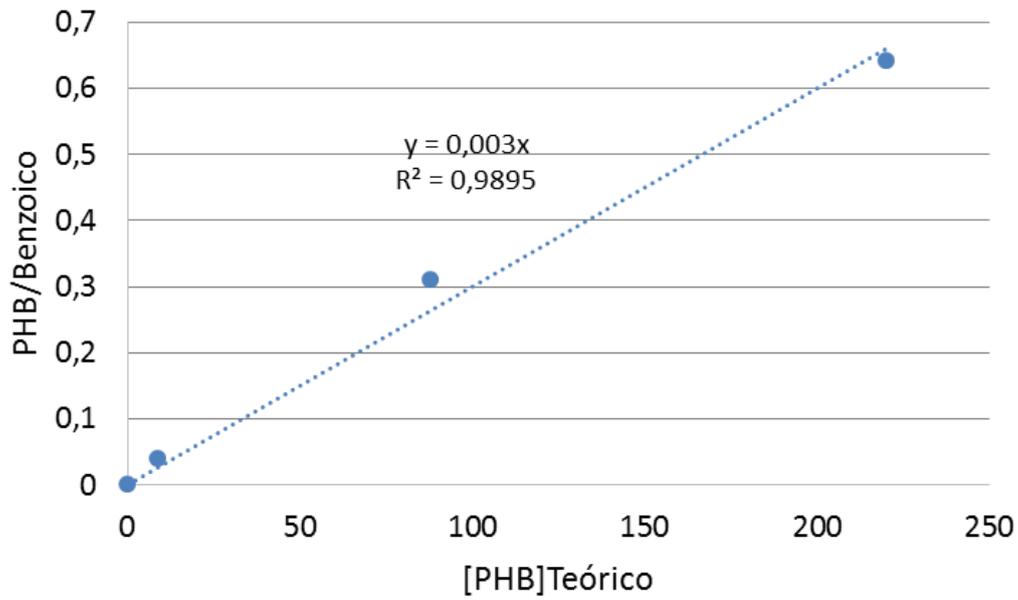


Figura 21: Recta de calibración de la concentración teórica de PHB respecto a la fracción de PHB en ácido benzoico.

Recta de calibración de los PHV:

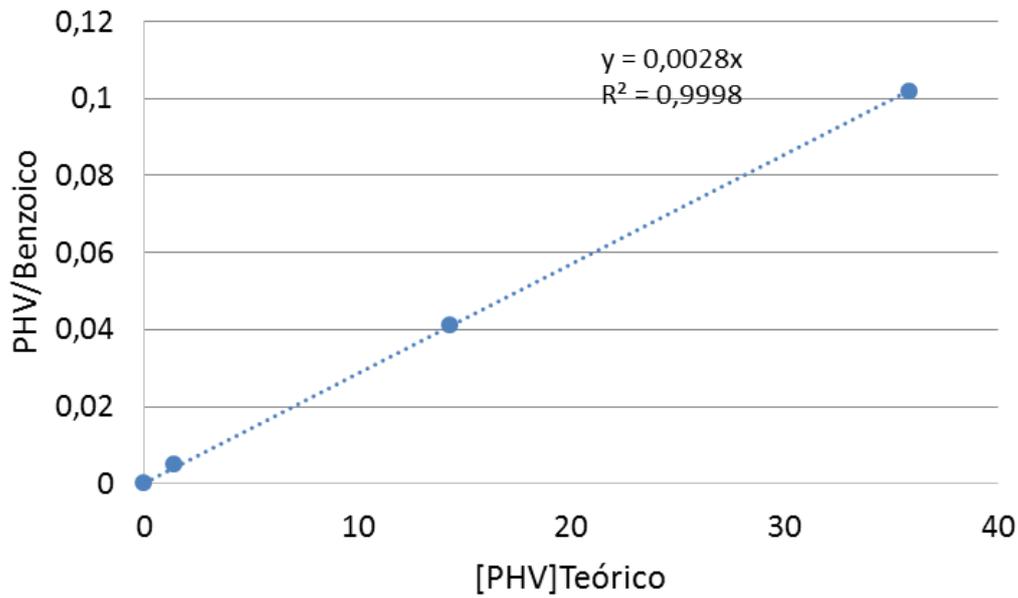


Figura 22: Recta de calibración de la concentración teórica de PHV respecto a la fracción de PHV en ácido benzoico.

Anexo II. Tablas de datos

Tabla de datos medios de ectoína en la condición 1:

Tabla 2: Datos medios obtenidos de ectoína intracelular durante la condición 1 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 1	<i>M. alcaliphilum</i> 20 Z			Consortio		
	Días	SST (g L ⁻¹)	Ect mg L ⁻¹	Ect mg g SST ⁻¹	SST (g L ⁻¹)	Ect mg L ⁻¹
1	0,83	69,66	83,93	1,28	80,59	62,96
5	1,42	127,66	89,90	2,08	154,41	74,23
7	1,36	121,75	89,52	1,9	124,96	65,77
8	1,28	135,14	105,58	1,7	119,73	70,43
10	0,815	132,07	162,05	1,075	122,17	113,64
12	0,895	127,42	142,37	1,115	122,93	110,25
13	1,615	100,52	62,24	1,375	98,15	71,38
15	1,16	120,45	103,84	1,48	98,95	66,86
17	0,92	116,89	127,05	1,5	92,35	61,57
19	1,28	112,93	88,23	1,22	98,64	80,85
21	1,22	116,95	61,55	1,4	106,76	82,12
22	1,9	102,33	82,52	1,3	100,95	77,65
24	1,24	111,52	89,94	1,26	90,11	71,51
26	1,3	120,60	92,77	1,34	94,13	70,25
28	1,14	125,88	110,42	1,16	89,27	76,96

Tabla de datos medios de ectoína en la condición 2:

Tabla 3: Datos medios obtenidos de ectoína intracelular durante la condición 2 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 2	<i>M. alcaliphilum</i> 20 Z			Consortio		
	Días	SST (g L ⁻¹)	Ect mg L ⁻¹	Ect mg g SST ⁻¹	SST (g L ⁻¹)	Ect mg L ⁻¹
1	1,76	132,25	75,14	1,32	89,71	67,96
3	1,34	77,22	57,63	1,22	76,71	62,88
5	1,52	79,90	52,57	1,04	57,47	55,26
6	0,96	68,50	71,35	1,06	49,60	46,79
9	1,84	71,96	39,11	1,08	48,77	45,16
12	1,89	55,43	29,33	1,38	50,77	36,79
13	1,88	100,46	53,44	1,23	53,42	43,43
15	2,15	73,06	33,98	1,2	57,19	47,66
17	1,86	86,31	46,40	1,09	64,48	59,16
19	1,3	88,49	68,07	1,02	72,45	71,03
20	1,48	80,59	54,45	1,02	69,89	68,52
22	1,45	79,36	54,73	0,99	65,95	66,62

Tabla de datos medios de PHAs en la condición 1:

Tabla 4: Datos medios obtenidos de PHAs durante la condición 1 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 1 Día	<i>M. alcaliphilum</i> 20 Z				Consortio			
	PHB (mg L ⁻¹)	PHV (mg L ⁻¹)	mg PHB g SST ⁻¹	mg PHV g SST ⁻¹	PHB (mg L ⁻¹)	PHV (mg L ⁻¹)	mg PHB g SST ⁻¹	mg PHV g SST ⁻¹
1	1,65	0,10	1,99	0,12	3,40	0,06	2,66	0,04
5	1,20	0,00	0,85	0,00	3,77	0,00	1,81	0,00
7	0,98	0,03	0,72	0,02	2,44	0,12	1,28	0,06
10	1,37	0,04	1,68	0,05	2,37	0,10	2,20	0,10
12	1,23	0,00	1,38	0,00	1,81	0,00	1,62	0,00
15	1,13	0,08	0,97	0,07	1,89	0,00	1,27	0,00
17	1,26	0,18	1,37	0,20	1,74	0,05	1,16	0,03
19	1,26	0,18	0,99	0,14	1,80	0,08	1,48	0,06
24	1,38	0,08	1,11	0,06	2,27	0,19	1,80	0,15
26	1,11	0,10	0,86	0,08	1,60	0,19	1,19	0,14
28	1,58	0,10	1,39	0,09	2,05	0,14	1,77	0,12

Tabla de datos medios de PHAs en la condición 2:

Tabla 5: Datos medios obtenidos de PHAs durante la condición 2 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 2 Día	<i>M. alcaliphilum</i> 20 Z				Consortio			
	PHB (mg L ⁻¹)	PHV (mg L ⁻¹)	mg PHB g SST ⁻¹	mg PHV g SST ⁻¹	PHB (mg L ⁻¹)	PHV (mg L ⁻¹)	mg PHB g SST ⁻¹	mg PHV g SST ⁻¹
1	2,79	1,88	1,58	1,07	3,98	1,33	3,02	1,01
3	2,04	1,34	1,52	1,00	2,97	1,40	2,43	1,15
5	1,08	1,50	0,71	0,99	2,21	1,25	2,13	1,21
8	1,06	1,88	0,58	1,02	2,85	1,06	2,64	0,98
13	1,23	1,93	0,57	0,90	3,32	1,69	2,76	1,41
15	0,46	2,10	0,25	1,13	3,06	2,00	2,81	1,84
17	1,92	1,40	1,48	1,07	2,83	2,41	2,78	2,37
19	1,30	1,25	0,88	0,85	2,82	2,41	2,76	2,37
20	0,70	1,70	0,48	1,17	2,32	1,47	2,34	1,48
22	0,78	1,06	0,28	0,38	2,64	1,01	2,02	0,77
24	0,80	1,54	0,26	0,50	1,74	1,43	1,29	1,06

Tabla de datos medios de EPSs en la condición 1:

Tabla 6: Datos medios obtenidos de EPSs durante la condición 1 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 1	<i>M. alcaliphilum 20 Z</i>		Consortio	
	Días	EPS (mg L ⁻¹)	EPS (mg g SST ⁻¹)	EPS (mg L ⁻¹)
5	7000	4929,58	33200	15961,54
8	6800	5312,50	19400	11411,76
10	7000	8588,96	7400	6883,72
12	4400	4916,20	4600	4125,56
22	2200	1157,89	3600	2769,23
24	2200	1774,19	3400	2698,41
26	2600	2000,00	2200	1641,79
28	1600	1403,51	2400	2068,97

Tabla de datos medios de EPSs en la condición 2:

Tabla 7: Datos medios obtenidos de EPSs durante la condición 2 para ambos inóculos.

CONDICIÓN 2	<i>M. alcaliphilum 20 Z</i>		Consortio	
	Días	EPS (mg L ⁻¹)	EPS (mg g SST ⁻¹)	EPS (mg L ⁻¹)
1	1200	681,82	800	606,06
3	600	447,76	1000	819,67
5	1200	789,47	1200	1153,85
6	2000	2083,33	1200	1132,08
8	1600	869,57	800	740,74
13	3100	2583,33	3400	2833,33
15	2200	2018,35	2500	2293,58
17	700	686,27	600	588,24
19	1200	1176,47	800	784,31
20	1700	1717,17	2700	2727,27
22	700	534,35	2000	1526,72
24	1300	962,96	1200	888,89
26	900	616,44	800	547,95