



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

BIODEGRADACIÓN DE METANO EN UN BIORREACTOR DE COLUMNA DE BURBUJEO CON RECIRCULACIÓN INTERNA ACOPLADO A LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS

Autor: Dña. Laura Merchán Catalina

Tutor 1: Dña. Raquel Lebrero Fernández

Tutor 2: Dña. Yadira Rodríguez Muñoz

Valladolid, Julio 2018



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna**RESUMEN**

En el presente trabajo se estudió un biorreactor de columna de burbujeo alimentado con biogás a escala laboratorio con recirculación interna de gas inoculado con *Methylocystis hirsuta*. El biorreactor fue operado a dos tiempos de retención de gas distintos (30 y 60 minutos) con cuatro diferentes ratios de recirculación interna ($Q_R/Q = 0, 2,5, 5$ y 10 , siendo Q_R el caudal de la recirculación y Q el caudal de entrada). El máximo valor de eliminación de metano, $55,1 \pm 1,7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, se obtuvo operando con un tiempo de retención de 30 minutos y un ratio de recirculación interna $Q_R/Q = 5$. Valores de $Q_R/Q > 5$ no conllevan mejoras en el rendimiento del sistema. El incremento de tiempo de retención del gas se tradujo en capacidades de eliminación menores, mientras que se alcanzaron mayores valores de eficiencia de eliminación, registrándose su máximo ($34,6 \pm 1,7 \%$) a un Q_R/Q de 10 operando a un tiempo de retención de 60 minutos. Además se pudieron optimizar parámetros operacionales determinantes para el buen funcionamiento del sistema como el ratio CH₄:O₂ (0,8 - 1,6), la caída de presión (0,2 - 0,5 bar) y el pH (7,0 - 7,6). Finalmente, el análisis de la energía consumida en la implementación de la recirculación interna del gas frente a la capacidad de eliminación es clave para estimar el valor óptimo de los parámetros de operación.

Palabras clave

Biogás, biorreactor de columna de burbujeo, recirculación interna, eliminación de gases de efecto invernadero, metanotrofos.

ABSTRACT

In the present study, a laboratory-scale bubble column bioreactor (BCB) with internal recirculation of gas fed with biogas and inoculated with *Methylocystis hirsuta* was studied. The bioreactor was operated at two different gas retention times (30 and 60 minutes) under four different internal gas-recycling rates ($Q_R/Q = 0, 2,5, 5$, and 10 , where Q_R and Q are the recycling rate and the flow rate, respectively). The maximum methane removal value ($55,1 \pm 1,7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) was obtained with a retention time of 30 minutes and an internal recirculation rate of $Q_R/Q = 5$. Values of $Q_R/Q > 5$ do not entail an improvement in the system performance. An increase in the gas retention time resulted in lower elimination capacities although it led to higher removal efficiency values, achieving its maximum value ($34,6 \pm 1,7 \%$) at a Q_R/Q of 10 and a retention time of 60 minutes. In addition, it was possible to optimize operational parameters that determine the proper functioning of the system, such as the CH₄: O₂ ratio (0,8 - 1,6), the pressure drop (0,2 - 0,5 bar) and the pH (7,0 - 7,6). Finally, the analysis of the energy consumed in the implementation of the internal gas-recycling over the elimination capacity is essential to determine the optimum operating parameters.

Keywords

Biogas, bubble column bioreactor, greenhouse gas abatement, internal gas-recycling, methanotrophs.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metano y su problemática ambiental	1
1.2. Tecnologías de eliminación de metano	1
1.2.1. Tratamientos físicos y químicos	1
1.2.2. Tratamientos biológicos	2
1.3. Organismos degradadores de CH ₄ : Metanotrofos	7
1.5. Problemática de biotecnologías de CH ₄ y justificación del trabajo	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. Medio mineral, reactivos e inóculo	15
3.2. Configuración del sistema experimental	15
3.3. Modo de operación	16
3.4. Métodos analíticos	17
3.5. Cálculos	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Influencia del ratio de recirculación interna	21
4.2. Influencia del TRG	24
4.3. Evolución de la caída de presión y del ratio O ₂ :CH ₄	26
4.4. Análisis de la fase líquida	27
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXOS	37
ANEXO I. Tablas de datos	37
ANEXO II. Rectas de calibrado	39
ANEXO III. Imágenes del sistema	41



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metano y su problemática ambiental

Los gases de efecto invernadero (GEI) son gases presentes en la atmósfera que devuelven a la superficie terrestre parte de la energía solar re-irradiada por ésta, creando un efecto cubierto que aumenta la temperatura media de nuestro planeta. Sin embargo, debido al aumento de las emisiones antropogénicas anuales de los GEIs desde la era preindustrial, que alcanzaron un valor máximo de producción de 49 Gt CO₂-eq año⁻¹ en 2010 (EPA, 2016), se estima que este aumento de la temperatura media del planeta podría alcanzar entre 1,1 y 6,4 °C. El cambio climático derivado de las emisiones de GEIs se está traduciendo en alteraciones del clima tales como cambios en los patrones de lluvia y olas de calor, el deshielo de los polos y el subsiguiente aumento del nivel de mar, que podría ser de hasta 0,6 metros en el año 2100 (IPCC, 2014). Asimismo, la sucesión de estaciones se ha visto alterada en todo el planeta provocando la migración de especies marinas, terrestres y aves, dando lugar a importantes cambios en la estructura de los ecosistemas (EPA, 2016).

El metano (CH₄) es considerado como el segundo GEI más perjudicial con un potencial de calentamiento 25 veces superior al del dióxido de carbono (CO₂) y con una vida media en la atmósfera de aproximadamente 12,4 años (EPA, 2016). Por lo tanto, mitigar las emisiones de CH₄ tendrá un efecto entre 20 y 60 veces más favorable sobre el calentamiento global que la reducción de emisiones de CO₂ (Alsayed, 2018; Hanson y Hanson, 1996). Las fuentes de emisión del CH₄ pueden ser naturales, como producto final de la degradación anaerobia de la materia orgánica en ecosistemas naturales, o antropogénicas, como producto derivado de las actividades industriales y domésticas humanas. Se estima que las fuentes antropogénicas de CH₄ constituyen el 63% de las emisiones globales (IPCC, 2014; EPA, 2016), incluyendo la actividad ganadera (187 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) y el tratamiento de residuos (146 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014, casi 108 Mt de CO₂-eq por residuos sólidos y unas 27 Mt de CO₂-eq por tratamiento de aguas residuales), contribuyendo en menor medida la agricultura (44 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) y la actividad minera derivada de la extracción del carbón (23 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) (EEA, 2016). Por ello, se hace necesario centrar los esfuerzos en el desarrollo de nuevas tecnologías sostenibles y económicamente rentables para el tratamiento de las emisiones de CH₄.

1.2. Tecnologías de eliminación de metano

1.2.1. Tratamientos físicos y químicos

Los métodos físico-químicos derivados de la industria petroquímica han sido tradicionalmente utilizados para tratar los gases residuales industriales, entre ellos el CH₄. Principalmente se ha empleado la incineración o combustión térmica o catalítica como métodos para este fin. La combustión térmica consiste en la degradación de compuestos orgánicos, como el CH₄, hasta generar agua y CO₂ en presencia de oxígeno. El proceso se lleva a cabo en incineradores, antorchas o quemadores de poscombustión, con temperaturas medias de 650°C y tiempos de residencia de 0,3 - 0,5 s (Brunner, 1996). Debido a la baja concentración de los



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

contaminantes en la fase gas, habitualmente se necesitan combustibles de apoyo, lo que incrementa la huella de CO₂. Los rendimientos de eliminación que se pueden alcanzar están entre el 96 y 99,5 % (Seoáñez, 1998).

La combustión catalítica es una combustión sin llama basada en la utilización de agentes denominados catalizadores que provocan o aceleran la oxidación sin participar directamente. Estos catalizadores suelen estar formados por metales nobles como el platino, paladio, rodio, etc., aunque también se pueden usar otros materiales como el cromito de cobre y los óxidos de cobre, cromo, manganeso, níquel y cobalto (Brunner, 1996). Normalmente se consigue una gran superficie de contacto con pequeñas cantidades de catalizador. La temperatura de ignición en este caso es inferior a la empleada en la combustión térmica, ~ 500°C, por lo que si fuera necesaria la utilización de combustible de apoyo, la cantidad de éste a usar sería menor. Para el correcto funcionamiento del proceso, es indispensable un buen control de la temperatura del gas a través del lecho, asegurar una cantidad suficiente de oxígeno en la corriente gaseosa para obtener un buen rendimiento y que la corriente de gas esté libre de partículas que podrían ensuciar y taponar los poros del catalizador. Este tratamiento puede utilizarse en corrientes con concentraciones de CH₄ inferiores al 25% del límite explosivo inferior (Brunner, 1996).

La condensación es otro método físico-químico utilizado para el tratamiento del CH₄ puesto que puede recuperarse parte del producto tratado en vez de simplemente destruirse como en los dos métodos anteriores. Este método consiste en la separación por condensación de los contaminantes de una corriente gaseosa (Seoáñez, 1998). Existen dos tipos de condensadores: de contacto, que mezclan el condensado y la corriente gaseosa con el refrigerante, y de superficie, que no permiten la mezcla de los vapores y el condensado con el refrigerante. El primer tipo produce mayor cantidad de condensado aunque el consumo de refrigerante es mayor. Las plantas de condensación tienen la tasa más alta de recuperación de metano ~ 98% pero son muy caras (ECEMMP, 2010).

El último de los métodos físico-químicos utilizados es la adsorción basada en la capacidad de algunos sólidos porosos para atraer selectivamente gases y adsorberlos en su superficie. El adsorbente más comúnmente utilizado es el carbón activo, que cuenta con una gran superficie específica, es un material no polar y fácilmente regenerable. Durante el proceso, se hace pasar el aire a través del lecho de carbón activo, el gas contaminante se va quedando retenido en los poros hasta alcanzar el punto de saturación del filtro de carbón activo, momento en el cual se puede desechar el filtro y tratarlo como un residuo sólido o regenerarlo para recuperar el contaminante eliminado de la corriente de aire original (Seoáñez, 1998; Wang *et al.*, 2008).

1.2.2. Tratamientos biológicos

Las biotecnologías son sistemas para la degradación de compuestos perjudiciales basados en la oxidación enzimática de éstos compuestos por microorganismos como las bacterias o los hongos. Pueden aplicarse tanto al tratamiento de compuestos orgánicos volátiles (COVs) como a los compuestos inorgánicos volátiles (CIVs). Entre las grandes ventajas que presentan estos tratamientos frente a los

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

físico-químicos destacan que pueden trabajar a una temperatura y presión ambientes, no requieren de un aporte externo de compuestos químicos, no generan subproductos tóxicos, presentan menores gastos energéticos y son mucho más respetuosos con el medio ambiente al generar menor huella de CO₂ (Estrada *et al.*, 2012).

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes tipos de biorreactores para el tratamiento de CH₄. Éstos se pueden clasificar en biorreactores de ventilación forzada, en los cuales el aire contaminado es suministrado a un recipiente abierto o cerrado mediante un flujo forzado que puede ser ascendente o descendente, y en biorreactores de ventilación pasiva, en los que el CH₄ es suministrado desde la parte baja ascendiendo a través del sistema (generalmente abierto) y el oxígeno difunde desde el aire en la parte superior del reactor (Gebert *et al.*, 2003; Gebert y Gröngröft, 2006; López *et al.*, 2013). Los sistemas abiertos con ventilación pasiva son los que se instalan generalmente para tratar las emisiones de CH₄ generadas en vertedero mientras que a escala laboratorio se prefieren los biorreactores cerrados con ventilación forzada. Para un correcto funcionamiento de los sistemas de degradación biológicos, es necesario que la biomasa esté repartida por todo el volumen del reactor lo más uniformemente posible y que tanto la fuente de carbono y energía como el resto de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos sean eficazmente suministrados para satisfacer el consumo de los mismos.

Los biorreactores también pueden clasificarse según la existencia o ausencia de un medio de soporte para el crecimiento de la biomasa, de esta forma se distinguen sistemas de lecho empacado (biofiltros, biofiltros percoladores y reactores de biopelícula de flujo horizontal) y sistemas de crecimiento suspendido (biorreactores de tanque agitado, *airlift*, columna de burbujeo, reactores de membrana y biorreactores de flujo de Taylor). A continuación se describen el funcionamiento y los parámetros operacionales más importantes de las principales configuraciones de reactores utilizadas para el tratamiento de corrientes de CH₄ (Rittmann y McCarty, 2005; Cantera *et al.*, 2017):

- **Biofiltro (BF)**. Este sistema consta de un tanque cerrado en cuyo interior se hace crecer la biomasa sobre un soporte sólido, que puede ser orgánico o inorgánico, a través del cual se hace circular el aire contaminado previamente humidificado. Los microorganismos que crecen en la biopelícula fijada al material de soporte son los encargados de degradar los contaminantes. El lecho se riega de forma periódica con agua o una solución acuosa de aporte de nutrientes. Estos sistemas se han de diseñar para asegurar un tiempo de residencia de lecho vacío suficientemente alto como para permitir una buena transferencia de masa de la fase gas a la biopelícula. Los BFs permiten trabajar con altas concentraciones de microorganismos proporcionándoles una mayor resistencia a los efectos tóxicos de otros metabolitos y frente a variaciones de pH y temperatura. La principal desventaja que presentan es la colmatación del lecho por crecimiento excesivo de biomasa, lo que favorece la formación de caminos preferenciales y el subsiguiente aumento de la caída de presión (Xue *et al.*, 2013).

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

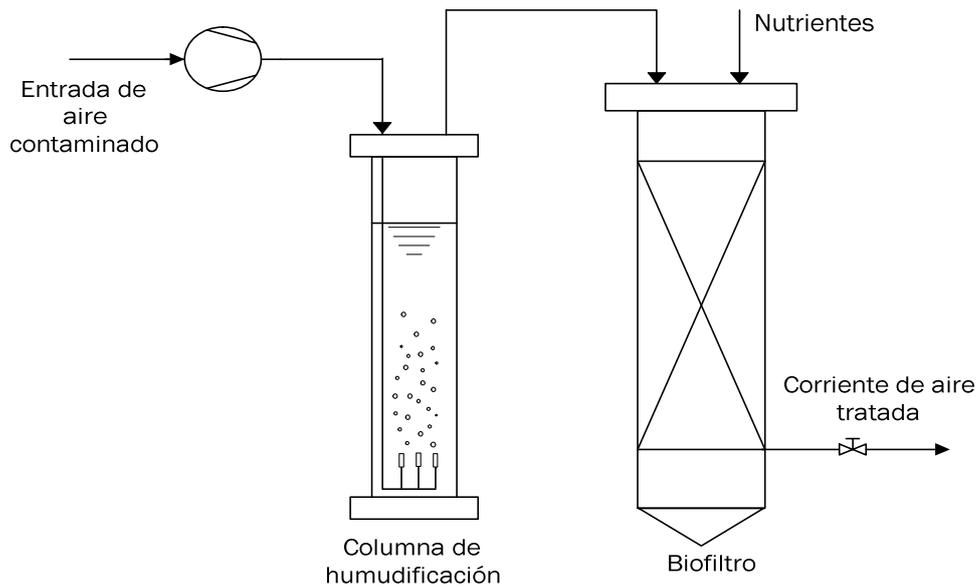


Figura 1. Esquema de un biofiltro.

- Biofiltro percolador (BFP). La configuración de este sistema es similar a la del BF pero cuenta con un sistema de recirculación continua del líquido (Figura 2), en paralelo o en contracorriente con la corriente de aire contaminado, que además de mantener la humedad necesaria en el interior del reactor, favorece la transferencia de compuestos hidrofóbicos desde la fase gas al líquido. La biopelícula crece sobre un soporte inerte. Este tipo de sistemas favorece el mejor lavado de los metabolitos generados durante la degradación del contaminante, además de permitir un mejor control de las condiciones de operación (pH, nutrientes, etc.).

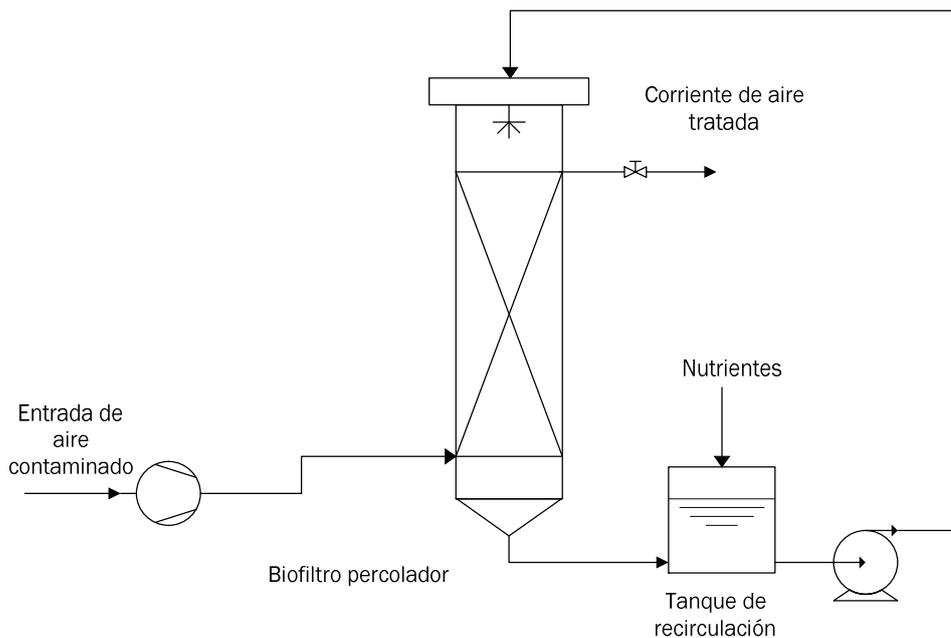


Figura 2. Esquema de un biofiltro percolador.

Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

- **Biorreactor de tanque agitado (BTA).** Se trata de un tanque de reacción con agitación mecánica que proporciona una mezcla perfecta de forma que se mantenga el cultivo microbiano en suspensión y se genere una alta superficie para la transferencia de materia entre la fase gas y el líquido. Los agitadores pueden ser de tipo turbina de disco, de palas planas o de hélice. El gas contaminado se introduce en la base del reactor y es distribuido por todo el seno del líquido con ayuda del agitador. Esta configuración de biorreactor puede ser empleada en gran número de procesos sin grandes modificaciones de diseño debido a que los parámetros que controlan el proceso son la velocidad de agitación y el flujo de gas. Sin embargo, el proceso es mecánicamente complejo y la transferencia de masa quedará limitada por el difusor empleado y el diseño del agitador. Los BTAs son apropiados en procesos de bioconversión en productos de valor añadido debido a que permiten una fácil recuperación de la biomasa.

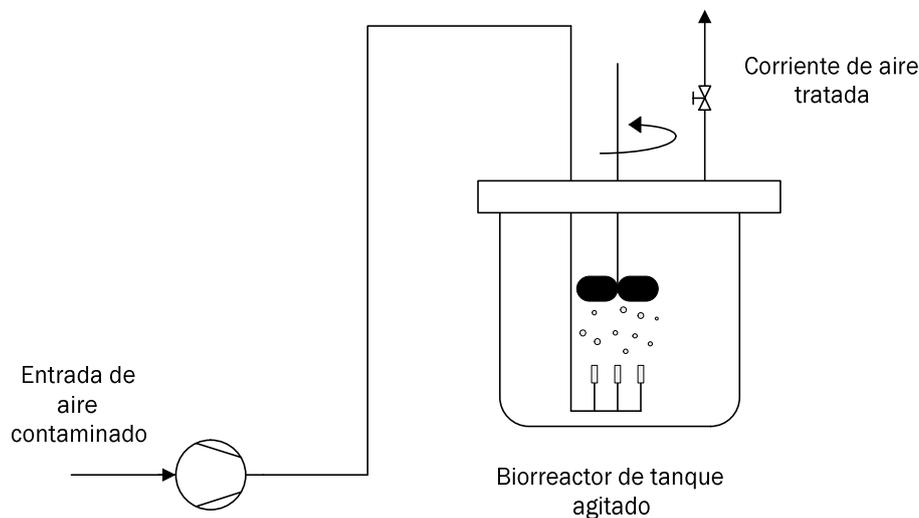


Figura 3. Esquema de un biorreactor de tanque agitado.

- **Reactor *air-lift* (RAL).** En esta configuración el mecanismo de agitación se basa en la turbulencia generada por la inyección del gas contaminado por la parte inferior del reactor (Figura 4). El sistema está formado por dos zonas separadas que se encuentran comunicadas tanto por la parte superior como por la inferior. El aire es inyectado por la parte inferior de la zona ascendente, lo que ocasiona un cambio de densidad del líquido dando lugar a un gradiente de densidades que obliga al líquido a moverse hacia la parte superior. Análogamente, en la zona descendente el líquido se mueve hacia abajo de forma continua, asegurando la mezcla adecuada. Los microorganismos no son sometidos a mucho estrés celular puesto que los esfuerzos cortantes producidos son homogéneos. Como principales ventajas de este sistema se tiene que la mezcla es más homogénea, se mejora la transferencia de materia y el consumo de energía es menor que en el caso de los BTA, sin embargo el diseño de la estructura puede resultar algo más complejo que en los casos anteriores.

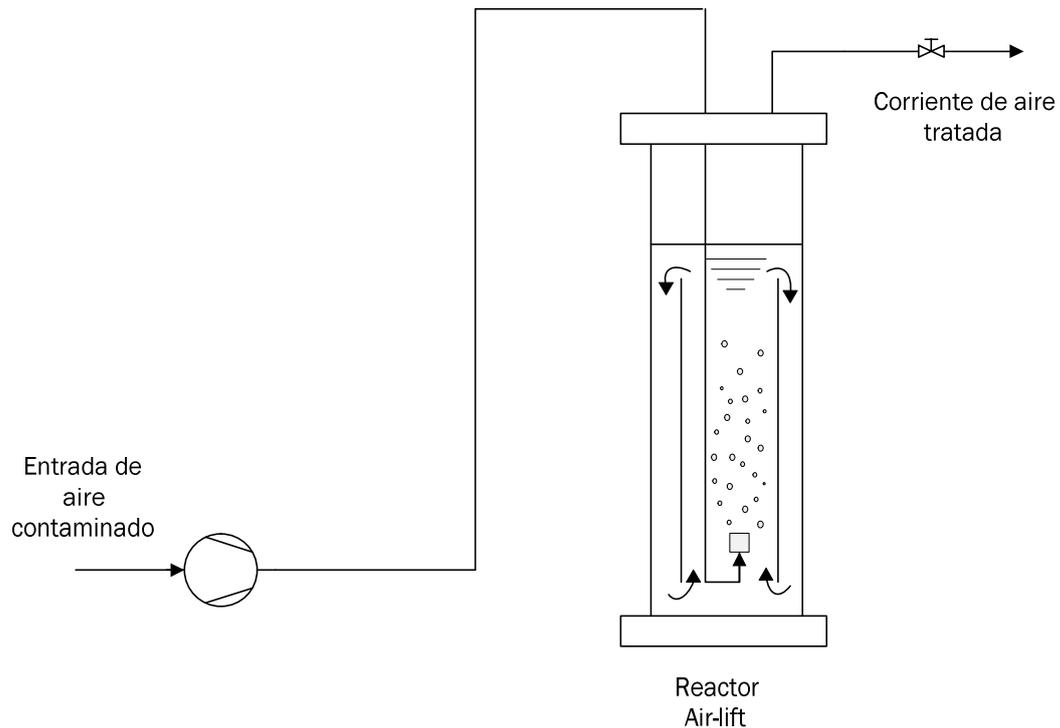
Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Figura 4. Esquema de un biorreactor tipo *air-lift*.

- Biorreactor de columna de burbujeo (BCB). Está compuesto por una columna cilíndrica donde el gas contaminado es introducido desde el fondo de la misma a través de un difusor que burbujea en el seno de la fase líquida (Figura 5), generando como en el caso anterior una agitación por gradiente de densidad. Las pequeñas burbujas de gas producidas mejoran la transferencia de masa al aumentar la superficie de contacto entre el gas y la fase líquida. Comparte muchas de las características del RAL pero con un diseño mucho más sencillo.

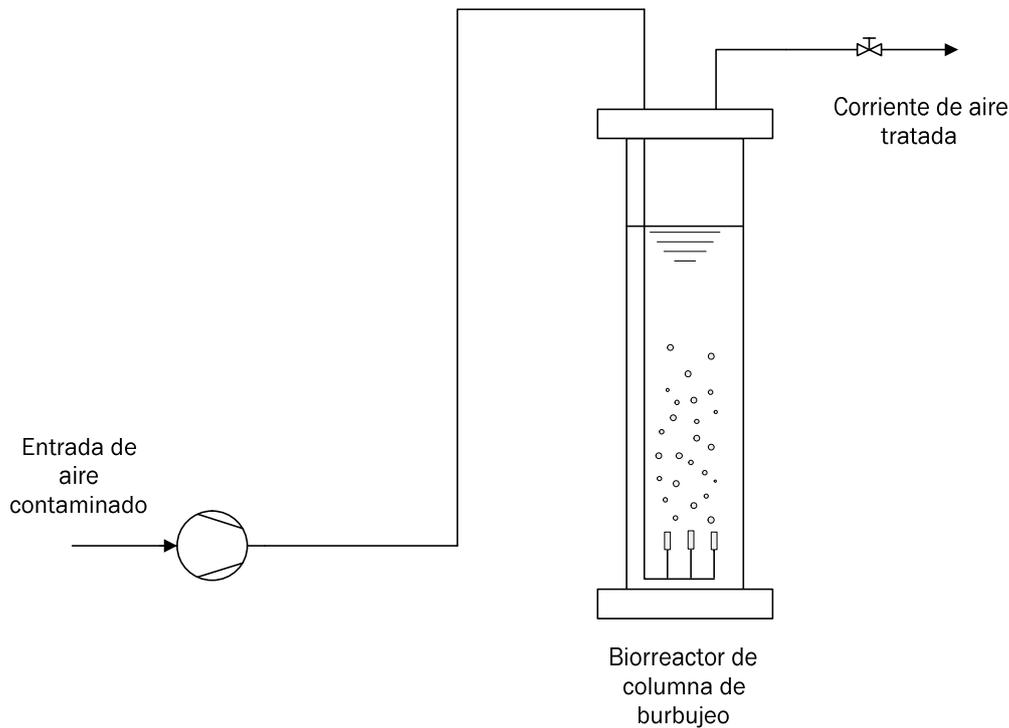
Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Figura 5. Esquema de un biorreactor de columna de burbujeo.

Los BFs son posiblemente la configuración más utilizada para el tratamiento de CH_4 y han demostrado unas eficiencias de eliminación (60-90%) comparables a los métodos físico-químicos en el tratamiento de COVs (Estrada *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013). Sin embargo, la mala transferencia de masa de la fase gas a la biopelícula y la obstrucción y canalización del lecho como consecuencia del crecimiento en exceso de la biomasa y su distribución heterogénea a lo largo del relleno, limitan su rendimiento a largo plazo (Xue *et al.*, 2013; Lebrero *et al.*, 2015; López *et al.*, 2016). Por ello, los biorreactores de crecimiento suspendido resultan más interesantes, y concretamente los de agitación no mecánica, como los BCB, por su menor consumo energético, su gran capacidad para tratar altas cargas de gas y la mejor distribución del contaminante y de los nutrientes debido a la turbulencia generada por la agitación. Además, estrategias de operación como la implementación de una recirculación interna del gas en el BCB puede suponer una mejora de su capacidad de tratamiento (García-Pérez *et al.*, 2018).

1.3. Organismos degradadores de CH_4 : Metanotrofos

Los metanotrofos son microorganismos capaces de utilizar el CH_4 como única fuente de carbono y energía. Estos microorganismos son principalmente bacterias aunque también se han descrito arqueas, levaduras y hongos (Wolf y Hanson, 1979; Cui *et al.*, 2015). La mayoría de los metanotrofos oxidan CH_4 a CO_2 y agua en presencia de O_2 , aunque en los últimos años se han descrito microorganismos que pueden acoplar la oxidación de CH_4 a la reducción de sulfato, nitrato, nitrito, manganeso o hierro (Knittel y Boetius 2009; Ettwig *et al.*, 2010). Los metanotrofos se encuentran presentes de forma generalizada en el medio ambiente (tundra y

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

humedales, lagos de agua dulce, lodos de depuradora, arrozales, suelos agrícolas, turberas), y tienden a disponerse preferentemente en la interfase entre zonas aerobias y anaerobias con flujos sustanciales de CH₄ (Hanson y Hanson, 1996; Bowman, 2006; López *et al.*, 2014).

Los metanotrofos aerobios se clasifican en función del gen rRNA 16S localizándose en el filo *Verrucomicrobia* y en las subdivisiones *Gamma* y *Alpha* del filo *Proteobacterias* (Semrau *et al.*, 2010; López *et al.*, 2016; Cantera *et al.*, 2017). A su vez se agrupan en tres tipos diferentes: I, II y X. Los metanotrofos de tipo I se puede encontrar en muchos ambientes, incluyendo agua dulce y sedimentos, ambientes marinos, campos de arroz, aguas termales, suelos, vertederos, superficie de minas de carbón o aguas de drenaje (Semrau *et al.* 2010; Bowman 2014). Estos metanotrofos pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*, poseen una típica membrana intracitoplasmática bien desarrollada a lo largo de la célula en forma de vesículas apiladas compactas y utilizan la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) como ruta de asimilación del carbono. Incluyen los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylosarcina* (Bratina *et al.*, 1992). Recientemente se han identificado como metanotrofos tipo I a las bacterias encapsuladas *Clonothrix* y *Crenothrix* de la familia *Methylococcaceae* (Op den Camp *et al.*, 2009). Los metanotrofos del tipo II existen extensamente en diversos ambientes, especialmente con bajo nivel de oxígeno y concentraciones de CH₄ como acuíferos de aguas subterráneas y lodos de alcantarillado (Amaral y Knowles, 1995; Marín y Arahál, 2014; Knief, 2015), se caracterizan por formar membranas intercitoplasmáticas en forma de laminillas dispuestas a lo largo de la parte periférica de la célula y utilizan la vía de la serina para asimilar el carbono (Bowman, 2006; López *et al.*, 2013; Marín y Arahál, 2014). Los géneros más representativos son *Methylosinus* y *Methylocystis* y pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria*. Los metanotrofos del tipo X presentan características tanto del tipo I como del II, utilizan la vía de la RuMP, crecen a temperaturas más altas que los otros dos tipos y tienen como representante principal al género *Methylococcus* (Hanson y Hanson, 1996; Op den Camp, 2009; Semrau, 2011; López *et al.*, 2013).

Los metanotrofos aerobios llevan a cabo la oxidación del CH₄ a metanol mediante la acción metabólica de la enzima metano monooxigenasa (MMO), que puede presentarse en dos formas: particulada (pMMO) asociada a la membrana periplasmática interna y soluble (sMMO) dentro del citoplasma. La pMMO oxida el metano más eficientemente que la sMMO debido a que tiene mayor afinidad por el metano y rendimientos de crecimiento más elevados (Kalyuzhnaya *et al.*, 2015). Por otro lado, la sMMO tienen una gama más amplia de sustrato que la pMMO, lo que la hace más atractiva para varios procesos biotecnológicos (Smith *et al.*, 2010). La expresión de las enzimas sMMO y pMMO está controlada por la concentración de cobre, mientras que el hierro es un cofactor importante en el centro de reacción (Choi *et al.*, 2003): para concentraciones de 0,86 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en peso seco de Cu²⁺ se inhibe la síntesis de sMMO mientras que para concentraciones de Cu²⁺ y Fe superiores a 0,8 μM aparece la pMMO de forma constitutiva en todos los metanotrofos (Strong *et al.*, 2015; López *et al.*, 2013; Semrau *et al.*, 2010).

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

La oxidación inicial del CH₄ es catalizada por la MMO que divide la molécula de oxígeno en 2 átomos. Uno de estos átomos se utiliza en la hidroxilación del CH₄ formándose el metanol, mientras que el otro átomo se reduce a agua (Madigan *et al.*, 2015). A continuación, la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) cataliza la conversión del metanol a formaldehído. A partir de aquí se produce un desdoble de la ruta metabólica, parte del carbono es dirigido a la mineralización hacia CO₂ y parte es utilizada para la formación de nuevo material celular. Los caminos de asimilación de CH₄ para la formación de nueva biomasa son, como se mencionó anteriormente, la ruta RuMP en metanotrofos tipo I y X, o de la ruta de la serina en metanotrofos tipo II (Figura 6).

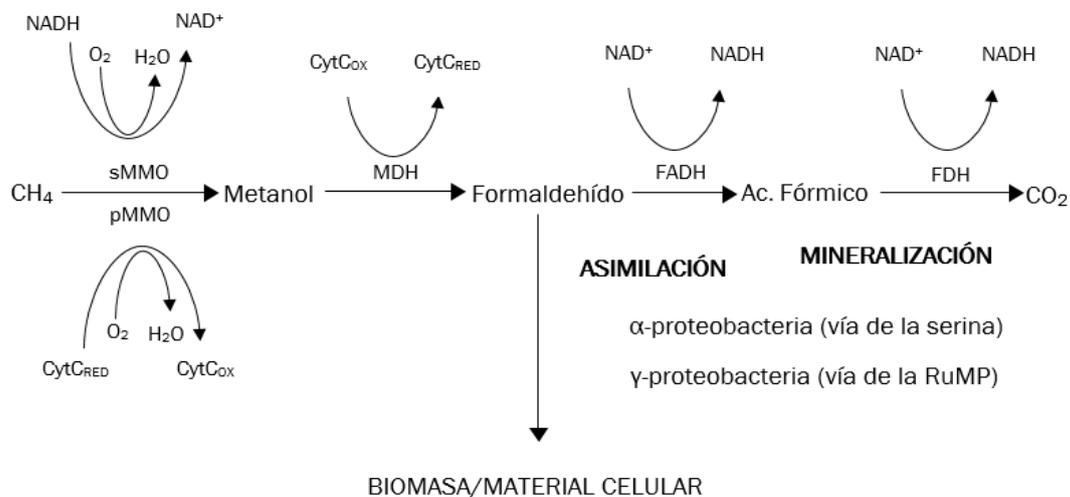


Figura 6. Ruta de la asimilación y mineralización del CH₄ por los metanotrofos (adaptado de Hanson y Hanson, 1996 y Strong *et al.* 2015).

Cada tipo de metanotrofo tiene unas condiciones favorables de crecimiento para factores tales como el pH, la temperatura, los nutrientes (macro- y micro-), disponibilidad de CH₄ y oxígeno. La mayoría de los metanotrofos crecen de forma óptima entre 20 y 35 °C, con pH entre 5,5 y 8, aunque hay metanotrofos muy acidófilos que crecen en pH inferiores entorno al 0,5 (Op den Camp *et al.*, 2009; van Teeseling *et al.*, 2014) y otros que prefieren pHs básicos de 8 - 10 (Bowman, 2006; Kalyuzhnaya *et al.*, 2008), y con concentraciones de NH₄⁺ y Cu²⁺ en el rango 10 - 60 μM y por debajo de 4,3 μM, respectivamente (Bender y Conrad, 1995; López *et al.*, 2013). En cuanto a las concentraciones de CH₄ y O₂, el crecimiento de los metanotrofos de tipo II se ven favorecido por bajas concentraciones de O₂ con alto ratio de CH₄:O₂ (Semrau *et al.*, 2010; López *et al.*, 2018) mientras que los metanotrofos de tipo I prefieren los ratios bajos de CH₄:O₂ (Bender y Conrad, 1995).

En cuanto a las fuentes de nitrógeno, los metanotrofos prefieren crecer con nitrato y amonio como fuente de nitrógeno celular, y en menor medida con el nitrito, el cual puede resultar tóxico a altas concentraciones (Bédard y Knowles, 1989; Stein *et al.*, 2012). La enzima amonio monooxigenasa (AMO) es la catalizadora de la oxidación del amonio por las bacterias nitrificantes; debido a la baja especificidad por el sustrato de la MMO, esta enzima es capaz de mediar la oxidación del amonio en los metanotrofos. En este sentido, los metanotrofos pueden establecer interacciones con microorganismos nitrificantes y desnitrificantes y competir con ellos por las fuentes de nitrógeno (Bédard y Knowles, 1989; Stein *et al.* 2012). En este aspecto,

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

las similitudes existentes entre los genes que codifican para ambas enzimas clave explica la capacidad de éstas para co-oxidar el sustrato alternativo, permitiendo así el uso combinado de ambos grupos de microorganismos, no sólo para la eliminación de CH₄, sino también para la eliminación de compuestos nitrogenados en biorremediación (Lee *et al.*, 2009; Acton y Baggs, 2011; Stein *et al.*, 2012).

1.4. Obtención de productos de valor añadido: biopolímeros

En las últimas dos décadas se han desarrollado diferentes investigaciones encaminadas a la obtención de productos comerciales de valor añadido como la ectoína, los bioplásticos (PHAs), proteínas de una sola célula (*single cells protein* (SCP)), biocombustibles y polisacáridos extracelulares (EPS).

Los PHAs son biopolímeros intracelulares producidos por una amplia gama de microorganismos como material de reserva de carbono y energía bajo condiciones de limitación de nutrientes y exceso de fuente de carbono (Khanna y Srivastava, 2005). Los PHAs se forman por la acción de enzimas intracelulares y son acumulados en el citoplasma en forma de gránulos insolubles en agua. La polimerización se produce mediante la formación de un enlace éster entre dos monómeros de ácido hidroxialcanoico, por ello a estos polímeros también se les denomina biopoliésteres. Se pueden encontrar alrededor de 150 monómeros distintos en los PHAs configurando diversas estructuras: lineal, ramificada, saturada, insaturada y aromática (Zinn *et al.*, 2001).

Las propiedades mecánicas de los PHAs son excelentes para ser utilizados como materiales plásticos. Estas características, junto con su biodegradabilidad, convierten a los PHAs en una alternativa muy atractiva a los plásticos derivados de la industria petroquímica (Chen *et al.*, 2015; Strong *et al.*, 2016). En este sentido, una treintena de empresas se dedican a la fabricación de PHAs, siendo los principales productores Meredian Inc. (producción anual de 300 kt) en Estados Unidos y Bio-On (producción anual de 10 kt) en Europa (Chen *et al.*, 2015). Actualmente las fuentes de carbono utilizadas para la producción de PHAs son la glucosa y la fructosa, cuyo coste supone el 30 - 40% de los costes totales de producción, lo que resulta en un precio de venta de los PHAs poco competitivo (Bugnicourt *et al.*, 2014; Koller *et al.*, 2017). Sin embargo recientemente ha emergido el uso de CH₄ como potencial materia prima para la producción de PHAs, lo que disminuiría los costes de producción al mismo tiempo que se reducirían los impactos ambientales de las emisiones de CH₄ a la atmósfera (Rostkoski *et al.*, 2012; Strong *et al.*, 2016).

1.5. Problemática de biotecnologías de CH₄ y justificación del trabajo

Aunque las biotecnologías presentan un gran potencial para el tratamiento de gases, el CH₄ posee una baja solubilidad en agua (la constante de Henry adimensional, $H = C_g/C_l$, es 30 a 25°C y 1 atm) (Ordaz *et al.* 2014), lo que dificulta la transferencia desde la fase gaseosa a la fase líquida que contiene a los microorganismos encargados de su degradación. Esto conlleva que el tiempo de residencia del gas en el biorreactor sea elevado produciendo unos altos costes de inversión y operación (Estrada *et al.*, 2012). Además, la baja solubilidad del CH₄



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

limita el rendimiento del proceso dando como resultado bajas tasas de eliminación y bajas concentraciones de biomasa.

Con el fin de aumentar la solubilidad del CH₄ y favorecer la acumulación de biomasa se han evaluado hasta la fecha distintos sistemas. Mediante el uso de un biorreactor a presión se obtuvieron concentraciones de biomasa de 18 a 65 g L⁻¹, pero estos biorreactores conllevan un alto coste y son menos seguros que los reactores que trabajan a presión atmosférica (Wendlandt *et al.*, 2001, 2005; Helm *et al.*, 2008). De igual modo, se ha estudiado el desempeño de un biorreactor de partición de dos fases (TPPB) en el que se emplea una fase no acuosa con mayor afinidad hacia el metano (Rocha-Rios *et al.*, 2009; Avalos Ramírez *et al.*, 2012; Lebrero *et al.*, 2014). Por último, se han utilizado biorreactores de columna de burbujeo para el crecimiento de biomasa en suspensión que permiten mayor control y una recolección más sencilla de la biomasa, superando las limitaciones de transferencia de materia gracias a la reciente disponibilidad de difusores de burbuja ultrafina. Usando *Methylocystis hirsuta* como cepa, Rahnama *et al.* (2012) estudió la capacidad de eliminación de metano de dos biorreactores con recirculación con diferentes configuraciones: un biorreactor de columna de burbujeo y un biorreactor de flujo vertical forzado. Se consiguió con éxito una densidad de biomasa de hasta 2,9 g L⁻¹.

A pesar de que la implementación de una recirculación de la corriente gaseosa mejora significativamente la disponibilidad de CH₄ como sustrato en el medio para los microorganismos, su potencial en el tratamiento de emisiones de CH₄ no diluidas no ha sido aún estudiado. Por tanto, en este trabajo se pretende evaluar la capacidad de tratamiento de un BCB con recirculación interna usando biogás (CH₄/CO₂) como fuente de CH₄.



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño de un biorreactor de columna de burbujeo (BCB) orientado a la eliminación simultánea de metano en corrientes no diluidas (>4 % v/v) y sin posibilidad de aprovechamiento térmico y a la producción de biopolímeros, evaluando su desempeño en términos de capacidad de eliminación de CH₄ y mineralización de CO₂. Como objetivos específicos del presente trabajo fin de máster se plantearon:

- Estudio de la influencia de diferentes ratios de recirculación interna (0, 2,5, 5 y 10) en el desempeño del sistema en estado estacionario.
- Estudio de la influencia de diferentes tiempos de retención del gas (30 y 60 minutos) en el funcionamiento del sistema en estado estacionario.
- Obtención de los parámetros óptimos de operación (pH; ratio CH₄:O₂; concentración de nitritos en el medio de cultivo; pérdida de carga)



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Medio mineral, reactivos e inóculo

El medio mineral utilizado en la experimentación fue una modificación del medio mineral salino con nitrato (MMSN) de Whittenbury para el cultivo de metanotrofos (Whittenbury et al., 1970). La composición del MMSN fue (g L⁻¹): KNO₃, 1,0; MgSO₄·7H₂O, 1,08; CaCl₂·2H₂O, 0,2; FeEDTA, 1,9·10⁻³; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,087·10⁻³; Na₂EDTA·2H₂O, 0,28·10⁻³; CuSO₄·5H₂O, 0,1·10⁻³; FeSO₄·7H₂O, 0,05·10⁻³; ZnSO₄·7H₂O, 0,04·10⁻³; H₃BO₃, 0,0015·10⁻³; CoCl₂, 0,00027·10⁻³; MnCl₂·4H₂O, 0,002·10⁻³; NiCl₂·6H₂O, 0,001·10⁻³; KH₂PO₄, 0,26·10⁻³; Na₂HPO₄·12H₂O, 0,83·10⁻³. El pH final del medio se ajustó a 6,8.

El biogás sintético desulfurado fue adquirido de Abelló-Linde, S.A. (Barcelona, España) con una concentración 70:30% (v/v) CH₄:CO₂. Todos los reactivos fueron adquiridos de Panreac® (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich® (St. Louis, E.E.U.U.) con una pureza de al menos 99%.

El inóculo de *M. hirsuta* fue preparado inicialmente de forma estéril en botellas herméticas de 125 mL conteniendo 45 mL de medio e inoculadas al 10% (v/v). Estos cultivos se incubaron a 30°C y 200 rpm en un agitador orbital MaxQ 4000 (Thermo Scientific, E.E.U.U.) con una composición del espacio de cabeza de 33:67% (v/v) CH₄:O₂. El crecimiento del inóculo se llevó a cabo con 5 reemplazos del espacio de cabeza, teniendo lugar éstos una vez que el CH₄ se había agotado. La composición de dicho espacio se monitoreó diariamente mediante cromatografía de gases. Seguidamente se continuó el crecimiento en botellas estériles de 2,15 L inoculando al 2,5% (v/v) en MMSN hasta un volumen final de líquido de 400 mL. Al igual que en la etapa anterior, la composición del espacio de cabeza fue de 33:67% (v/v) CH₄:O₂. Esta composición se alcanzó haciendo pasar 20L de una mezcla de biogás sintético desulfurado y O₂ por el espacio de cabeza de cada una de las botellas. Las botellas fueron colocadas sobre una placa de agitación magnética constante Variomag Poly (Thermo Scientific, E.E.U.U.) a 300 rpm y a 25°C en una habitación con temperatura controlada. El crecimiento se realizó hasta alcanzar una densidad óptica final a 600 nm (DO₆₀₀) de ~1,1.

3.2. Configuración del sistema experimental

El montaje experimental (Figura 7) consistió en una columna cilíndrica de PVC de una altura de 80 cm y un diámetro interior de 0,6 cm (Plasthermar, España) con un volumen de trabajo de 2,5 L. Ésta poseía cuatro conexiones en la tapa superior y otra en la parte baja de la torre. Por una de las conexiones de la tapa superior se realizaba la alimentación de la corriente gaseosa, mediante una conducción por la que se introducía el gas hasta la parte inferior del biorreactor, difundiendo a la fase líquida a través de tres difusores de acero inoxidable de 2 µm de poro (Supelco, E.E.U.U.). Otra de las conexiones de la parte superior fue utilizada como salida de la corriente gaseosa. La tercera de las conexiones sirvió como válvula de seguridad para despresurizar el reactor en caso de necesidad. La última de las conexiones de la parte superior y la conexión de la parte inferior fueron utilizadas para realizar el intercambio del medio mineral y para tomar muestras para el análisis de la fase líquida. Se mantuvo el interior del reactor a 25°C y en continua agitación mediante

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

un agitador magnético a 500 rpm para asegurar una mezcla lo más perfecta posible.

El biogás sintético se bombeaba desde una bolsa Tedlar mediante una bomba peristáltica Masterflex® Easy-Load 7518-00 (Cole-Parmer®, E.E.U.U.), mezclándose en una cámara de mezcla externa de 1 L con aire proporcionado por el compresor de uso común en las instalaciones del laboratorio. La mezcla resultante se alimentaba de forma continua al BCB.

Para mejorar la transferencia del CH₄, se estudió la implementación de una recirculación interna. Para ello, parte de la corriente gaseosa de salida era recirculada pasando por un condensador de camisa de 1L de volumen, refrescado con agua a 10°C, para retirar el vapor de agua contenido en la corriente gaseosa antes de ser bombeada mediante una bomba peristáltica (Watson-Marlow, E.E.U.U.) hacia la corriente gaseosa de entrada.

Los flujos fueron controlados mediante rotámetros colocados en la corriente de gas de entrada y en la corriente de recirculación. Además, se colocaron tomamuestras en la línea de entrada, antes y después de la unión con la línea de recirculación, y en la línea de salida para determinar la presión en el reactor y realizar el monitoreo de los gases.

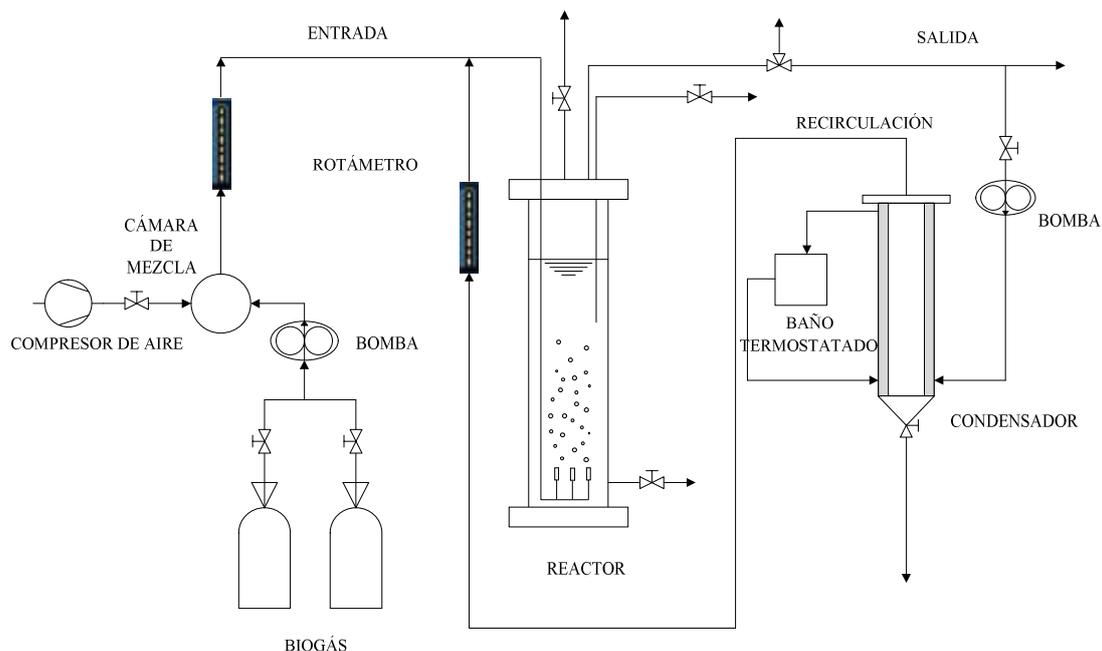


Figura 7. Diagrama del sistema experimental empleado en el laboratorio.

3.3. Modo de operación

Inicialmente el BCB se inoculó y fue operado a un tiempo de residencia de 30 min sin recirculación con una carga de alimentación (CA) de $226 \pm 15,17 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y un ratio CH₄:O₂ de $1,10 \pm 0,08\%$ (v/v) hasta alcanzar el estado estacionario. Se estudiaron dos tiempos de residencia del gas (TRG) distintos (30 min, etapa I y 60 min, etapa II), y en cada uno de ellos se operó el reactor a diferentes tasas de

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

recirculación (Q_R/Q ; siendo Q_R el flujo volumétrico de la corriente de recirculación y Q el caudal de gas alimentado al sistema general) como se resume en la tabla 1:

Tabla 1. Resumen del modo de operación de las dos etapas del experimento.

Etapas	TRG (min)	Q_R/Q	CA (g m ⁻³ h ⁻¹)	ratio CH ₄ :O ₂ (v/v)
I	30	0, 2,5, 5, 10	208,1 ± 23,4	1,2 ± 0,08
II	60	0, 2,5, 5, 10	83,5 ± 6,3	1,3 ± 0,12

Durante todo el experimento se retiraban diariamente 500 mL de caldo de cultivo, que eran centrifugadas a 10000 rpm durante 8 min. Parte de la biomasa era resuspendida en MMSN fresco y devuelta al reactor para mantener la concentración de sólidos en torno a los 3,5 g L⁻¹. La concentración de nitrato se fue ajustando a las necesidades de operación en función de la carga alimentada al reactor para evitar limitación de nitrógeno en el caldo de cultivo. Se comenzó utilizando el MMSN sin suplemento de N (ensayo sin recirculación) y se fue incrementando el N por 2, 3 y 4 veces la cantidad de KNO₃ inicial según se iba aumentando el ratio de recirculación.

Se tomaron muestras de gas periódicas de las corrientes de entrada, salida y recirculación para controlar la evolución de las concentraciones de CH₄, O₂ y CO₂ mediante cromatografía de gases (GC-TCD). Se tomaron muestras líquidas del medio de cultivo del interior del reactor para medir el pH y la concentración de sólidos suspendido totales (SST) diariamente y para determinar las concentraciones de nitrógeno total (TN), nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻) dos veces por semana. La caída de presión fue medida coincidiendo con los momentos de toma de muestra de gases.

3.4. Métodos analíticos

Las concentraciones de los gases CH₄, O₂ y CO₂ en las corrientes gaseosas de entrada, salida y recirculación del reactor se determinaron en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, E.E.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, siendo el tiempo del análisis de 5 min (López *et al.*, 2014). La caída de presión en el reactor se midió con un medidor de presión digital PI1696 (Ifm electronic, Alemania). El pH se determinó utilizando un electrodo de membrana de vidrio modelo PH BASIC 20 (Crison, España). Las concentraciones de iones NO₃⁻ y NO₂⁻ presentes en el MMSN fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC-IC después de ser filtradas las muestras (1 mL) a través de filtros de nylon de 0,22 μm. El equipo utilizado para este análisis es un 515 HPLC acoplado con un detector de conductividad Waters 432 y equipado con una columna IC-PAK Anion HC (4,6 x150 mm) y un protector de aniones IC-PAK (Waters, E.E.U.U.) (López *et al.*, 2016).

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

El análisis del nitrógeno total (TN) presente en el caldo de cultivo se llevó a cabo mediante un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, Japón) equipado con un módulo de TNM-1 de quimioluminiscencia.

El análisis de sólidos suspendidos totales (SST) se realizó de acuerdo al método estándar (APHA, 2005), lo que conlleva el filtrado a vacío de las muestras sobre un filtro previamente preparado y pesado, que fue introducido posteriormente en una estufa a 105°C durante aproximadamente 24 h. Finalmente, se dejaron enfriar los filtros en un desecador durante 10-15 minutos y se pesaron para determinar los SST.

3.5. Cálculos

Para evaluar la eficacia del proceso, se calculó la capacidad de eliminación de CH₄ (CE), la tasa de producción de CO₂ (PCO₂), la mineralización de CH₄ (RCO₂) y el rendimiento de producción de CO₂ (YCO₂) en la fase gaseosa. Los cálculos realizados para cada parámetro se detallan a continuación:

$$\text{Carga de alimentación (g m}^{-3} \text{ h}^{-1}\text{): } CA = \frac{[CH_4]_e \times Q}{V}$$

$$\text{Eficiencia de eliminación de i (%): } EE = \frac{[i]_e - [i]_s}{[i]_e} \times 100$$

$$\text{Capacidad de eliminación de CH}_4 \text{ (g m}^{-3} \text{ h}^{-1}\text{): } CE = CA \times EE_{CH_4}$$

$$\text{Tasa de producción de CO}_2 \text{ (g m}^{-3} \text{ h}^{-1}\text{): } PCO_2 = \frac{([CO_2]_s - [CO_2]_e) \times Q}{V}$$

$$\text{Tasa de producción máxima de CO}_2 \text{ (g m}^{-3} \text{ h}^{-1}\text{): } PCO_{2max} = CE \times \alpha$$

$$\text{Mineralización de CH}_4 \text{ (%): } RCO_2 = \frac{PCO_2}{PCO_{2max}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento de mineralización (g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CH}_4\text{): } YCO_2 = \frac{PCO_{2max}}{CE}$$

Donde [i]_e y [i]_s representan la concentración de la sustancia i en g m⁻³ a la entrada y a la salida respectivamente; i pudiendo ser CH₄ o O₂. Q es el caudal de aire total en m³ h⁻¹ y V el volumen de trabajo en m³. α es el cociente entre el peso molecular del CO₂ y el peso molecular el CH₄ (2,75) y representa la cantidad máxima de CO₂ que se puede producir por oxidación de todo el CH₄, asumiendo que no haya producción de biomasa.



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

Para realizar el cálculo del consumo energético asociado a la recirculación se utilizó la fórmula:

$$E \text{ (kW)} = \Delta P \times Q_T \times \eta$$

Donde ΔP es la suma de las caídas de presión de la columna de agua y de los difusores supuesta como 7000 Pa (Estrada *et al.*, 2010), Q_T es el caudal total bombeado ($Q + Q_R$) y η es la eficiencia supuesta 0,7 (Estrada *et al.*, 2010).



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Influencia del ratio de recirculación interna

Para el estudio de la influencia del ratio de recirculación interna Q_R/Q , se comenzó operando el reactor a un TRG de 30 minutos sin recirculación bajo una CA de CH₄ de $223,7 \pm 14,2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ obteniéndose valores de CE iniciales que oscilaron entre 10,9 y $31,9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y valores de PCO₂ en torno a $42,9 \pm 9,4 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Una vez alcanzado el estado estacionario, se obtuvieron valores de CE de $29,8 \pm 2,0 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y eficacias de eliminación de $13,3 \pm 0,6 \%$ (Figura 8). La producción de CO₂ en esta primera etapa fue $PCO_2 = 63,5 \pm 3,8 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, resultando en valores de RCO₂ de $77,8 \pm 9,0 \%$ que se corresponde con un YCO₂ de $2,1 \pm 0,2$ (Tabla 2).

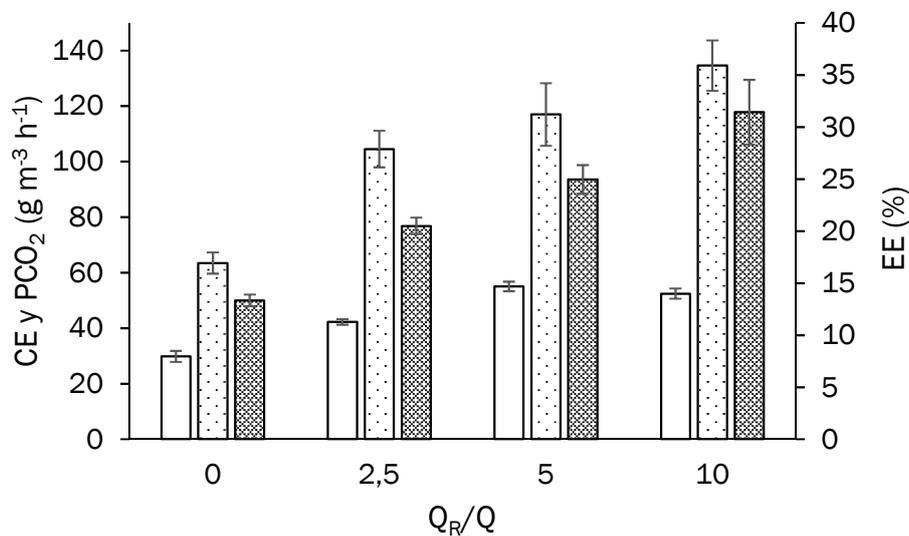


Figura 8. Influencia del ratio de recirculación interna Q_R/Q en la CE \square , PCO₂ \square y EE \square en la etapa I del experimento (TRG = 30 min).

Cuando se introdujo la recirculación de 2,5, la CE aumentó hasta valores de $42,2 \pm 1,0 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, con el consecuente aumento de la EE hasta $20,5 \pm 0,8 \%$. Este incremento en la capacidad de eliminación de metano indica que el sistema estaba limitado por transferencia de masa. Del mismo modo, el paso a operar con un ratio de recirculación $Q_R/Q = 5$, se tradujo en un aumento de la CE a su valor máximo de $55,1 \pm 1,7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Sin embargo, valores superiores de recirculación interna no resultaron en un aumento de la capacidad de eliminación, que se mantuvo en $52,5 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Por el contrario, la EE alcanzó valores de $25,0 \pm 1,4$ y $31,4 \pm 3,1 \%$ para ratios de recirculación de 5 y 10, respectivamente.

El aumento de la recirculación interna también se tradujo en mayores producciones de CO₂, obteniéndose valores de $117,0 \pm 11,3$ a un $Q_R/Q = 5$ y $134,6 \pm 9,1 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para $Q_R/Q = 10$, respectivamente. El valor medio de YCO₂ obtenido para el ratio de recirculación 10 es de $2,6 \pm 0,2 \text{ g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ CH}_4$, lo que señala el lento crecimiento de la biomasa en esta fase.

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

Tabla 2. Valores medios de RCO₂ y YCO₂ obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas a lo largo del experimento.

Etapa	TRG (min)	Q _R /Q	RCO ₂ (%)	YCO ₂ (g CO ₂ g ⁻¹ CH ₄)
I	30	0	77,8 ± 9,0	2,1 ± 0,2
		2,5	90,1 ± 7,7	2,5 ± 0,2
		5	77,4 ± 8,8	2,1 ± 0,2
		10	93,4 ± 6,7	2,6 ± 0,2
II	60	0	74,1 ± 12,3	2,0 ± 0,3
		2,5	83,3 ± 2,8	2,3 ± 0,1
		5	76,9 ± 7,7	2,1 ± 0,2
		10	84,6 ± 3,2	2,3 ± 0,1

En la etapa II del experimento se operó con un TRG de 60 minutos y con una CA media de CH₄ de 83,5 ± 6,3 g m⁻³ h⁻¹. Al inicio de esta etapa se operó sin recirculación obteniéndose valores medios para el estado estacionario de CE y PCO₂ de 11,0 ± 1,7 y 21,9 ± 1,0 g m⁻³ h⁻¹ respectivamente (Figura 9). Al implementar la recirculación y aumentar progresivamente el ratio Q_R/Q a 2,5, 5 y 10, se observaron incrementos progresivos en los estados estacionarios correspondientes tanto de CE como de PCO₂ hasta alcanzar valores de 28,8 ± 0,9 g CH₄ m⁻³ h⁻¹ y 66,9 ± 1,7 g CO₂ m⁻³ h⁻¹, respectivamente para un ratio de recirculación de 10. Este aumento progresivo en los valores de la CE como consecuencia del aumento paulatino del ratio de recirculación interno indica nuevamente una limitación por transferencia. La recirculación aumenta la turbulencia interna del reactor y esto promueve la transferencia de CH₄ de la fase gas a la fase líquida.

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

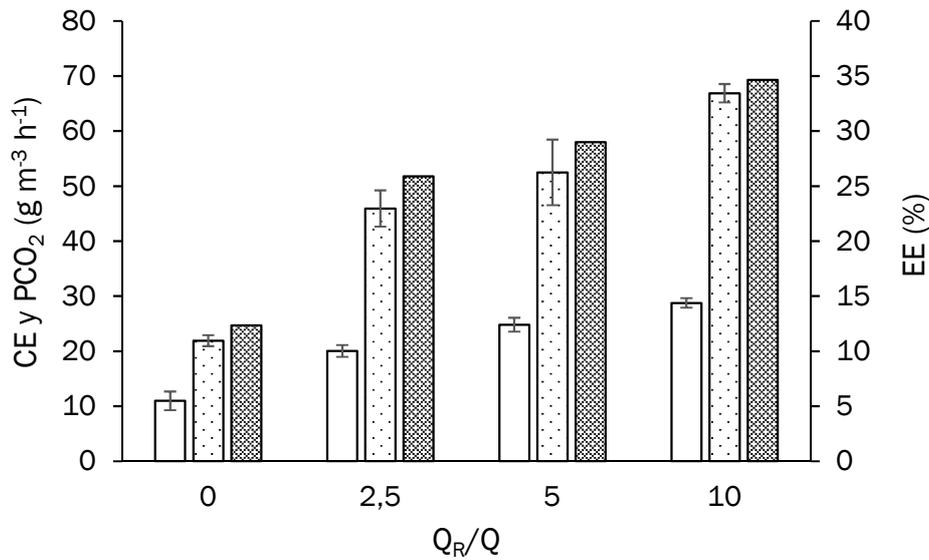


Figura 9. Influencia del ratio de recirculación interna Q_R/Q en la CE \square , PCO_2 \square y EE \square en la etapa II del experimento (TRG = 60 minutos).

En cuanto a las EE en la etapa II, se observa, al igual que en la etapa I, un progresivo aumento asociado al ratio de recirculación, obteniéndose valores de $12,3 \pm 1,7$, $25,9 \pm 2,5$, $29,0 \pm 1,7$ y $34,6 \pm 1,7$ % para Q_R/Q de 0, 2,5, 5 y 10, respectivamente. En este sentido, cabe destacar que los valores de EE obtenidos al aplicar una relación de Q_R/Q de 10 son 2,4 y 2,8 veces superiores a los valores de EE obtenidos en el BCB en las etapas I y II, respectivamente, cuando no se implementa ninguna recirculación. Estos valores están de acuerdo con los reportados para un BCB que opera con un ratio Q_R/Q de 15 a TRG de 120 y 60 minutos (García-Pérez *et al.*, 2018). En nuestro caso particular, se obtuvieron capacidades de eliminación similares operando a un tiempo de residencia del gas considerablemente inferior y menores tasas de recirculación, lo que se traduciría en volúmenes menores de reactor y menores gastos energéticos. Otros estudios de eliminación de metano en BFP han reportado incrementos similares al pasar de operar sin recirculación a utilizar un Q_R/Q de 18 a un TRG de 4 minutos con una CA similar a la utilizada en esta experimentación (Estrada *et al.*, 2014).

Los valores de RCO_2 e YCO_2 no presentan una clara tendencia a lo largo de los diferentes estados estacionarios de ambas etapas, aunque sí se observa (Tabla 2) que por lo general son valores elevados, llegándose a alcanzar en el estado estacionario correspondiente a un TRG de 30 minutos y un ratio de recirculación de 10 un valor medio de $93,4 \pm 6,7$ % de RCO_2 . Las altas tasas de mineralización observadas indican una utilización preferente del carbono del sustrato para oxidación a CO_2 , lo que resulta en un crecimiento más lento de la biomasa.

En este sentido, los valores medios de crecimiento metanotrófico a lo largo del experimento tampoco muestran una tendencia clara, obteniéndose valores de $1,97 \pm 0,5$ g d⁻¹ en algunas fases del experimento. Sin embargo, el cálculo de este valor no es muy fiable bien debido a un crecimiento microbiano menor del esperado en el

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

momento de hacer la retirada diaria de biomasa (que se realizaba en función a valores estimados), o bien a la pérdida de biomasa por la parte superior del reactor (arrastre de biomasa que tiene lugar como consecuencia del fenómeno de coalescencia). Este fenómeno se presenta a velocidades superficiales del gas elevadas (Moshtari *et al.*, 2009), consecuencia directa del aumento de la recirculación, y consiste en la unión de las pequeñas burbujas de gas que salen por los difusores, dando lugar a otras de mayor tamaño que ascienden más rápidamente y arrastrando en su camino biomasa suspendida en el caldo de cultivo.

4.2. Influencia del TRG

En las Figuras 10 (A) y (B) se representa la influencia en la CE y la PCO₂ que tienen las diferentes recirculaciones ensayadas en este experimento para los diferentes TRG. Se puede observar claramente la tendencia creciente en los valores medios recogidos para los estados estacionarios tanto de la CE y de la PCO₂ en las dos etapas del experimento conforme se incrementa el ratio de recirculación interna. Así mismo, es fácilmente observable que el aumento del TRG da lugar a valores más bajos tanto de CE como de PCO₂. Se pudo observar que, a TRG de 60 minutos y valores bajos de Q_R/Q la agitación total dentro del reactor es menor y por tanto la biomasa tiende a no distribuirse homogéneamente en todo el volumen quedando la parte de ella depositada en el fondo del reactor.

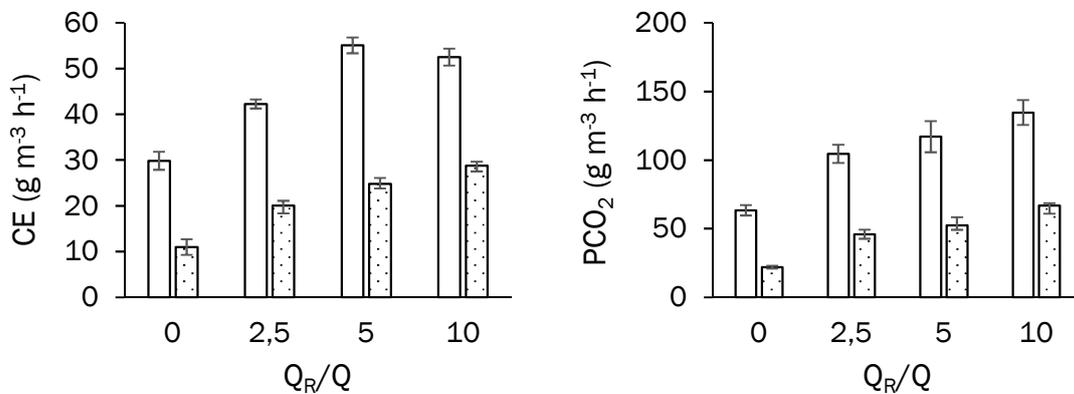


Figura 10. Influencia del ratio de recirculación interna Q_R/Q en la CE (A) y PCO₂ (B) para TRG 30 minutos □ y TRG 60 minutos ▨.

En cuanto a las EE, siguen una tendencia al alza (Figura 11) para ambos TRG ensayados conforme se incrementa la relación Q_R/Q como se comentó anteriormente, sin embargo, al aumentar el TRG, se observa que las EE medias para un tiempo de 60 minutos son superiores a las obtenidas para un tiempo de 30 minutos. Estas observaciones están en consonancia con lo reportado para ensayos con TRG de 120, 60, 30 y 15 minutos y Q_R/Q de 15 (García-Pérez *et al.*, 2018).

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

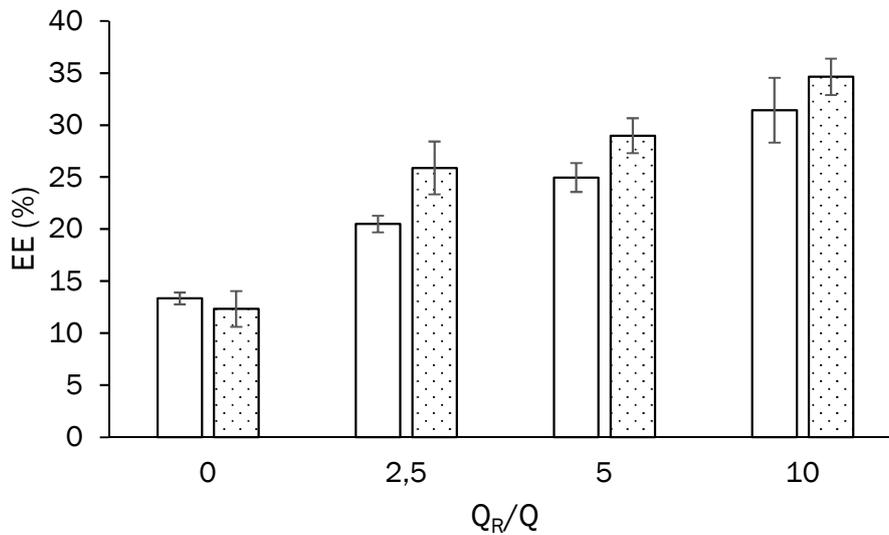


Figura 11. Influencia del ratio de recirculación interna Q_R/Q en la EE para TRG 30 minutos \square y TRG 60 minutos \square .

Como se puede apreciar en la Figura 12, el TRG de 60 minutos lleva asociado un consumo energético inferior al TRG de 30, pero como se ha comentado antes, este aumento del tiempo de residencia del gas también conlleva unos valores de CE inferiores. La relación entre la CE y la energía empleada para la recirculación interna sigue una tendencia logarítmica. A un TRG de 30 minutos se observa que un aumento de la recirculación de 5 a 10 no supone una mejora en la CE y lleva asociado un mayor gasto energético, por lo que a este tiempo de residencia se puede considerar que se alcanza un valor óptimo a Q_R/Q de 5. En el caso del TRG = 60, una mejora del 1 % de la CE tiene asociado un aumento del coste energético de 13,1% para una recirculación $Q_R/Q > 10$.

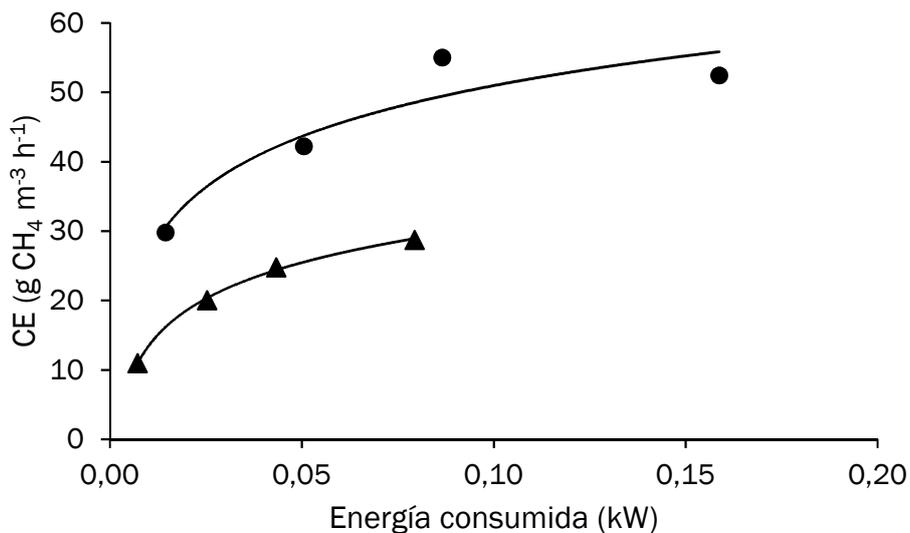


Figura 12. Comparativa del consumo energético frente a la CE media de cada etapa para TRG = 30 minutos \bullet y para TRG = 60 minutos \blacktriangle .

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

4.3. Evolución de la caída de presión y del ratio O₂:CH₄

A lo largo de todo el experimento se observó un aumento progresivo de la caída de presión (Figura 13) debido al taponamiento de los poros de los difusores por sedimentación de parte de la biomasa. Por este motivo, cuando las caídas de presión fueron muy elevadas se procedió al reemplazo de éstos, asegurando así que las caídas de presión se mantenían en el rango 0,2 - 0,5 bar. De este modo, se evitaban cambios significativos en el tamaño de burbuja puesto que las burbujas de mayor tamaño ascienden más rápidamente a través de la columna con lo cual disminuye el tiempo de residencia del gas en el seno de líquido (Moshtari *et al.*, 2009); aunque quizá el mayor problema asociado a las burbujas de mayor tamaño es que la superficie específica de contacto entre el gas y el líquido es menor y por tanto se ve perjudicada la transferencia de materia.

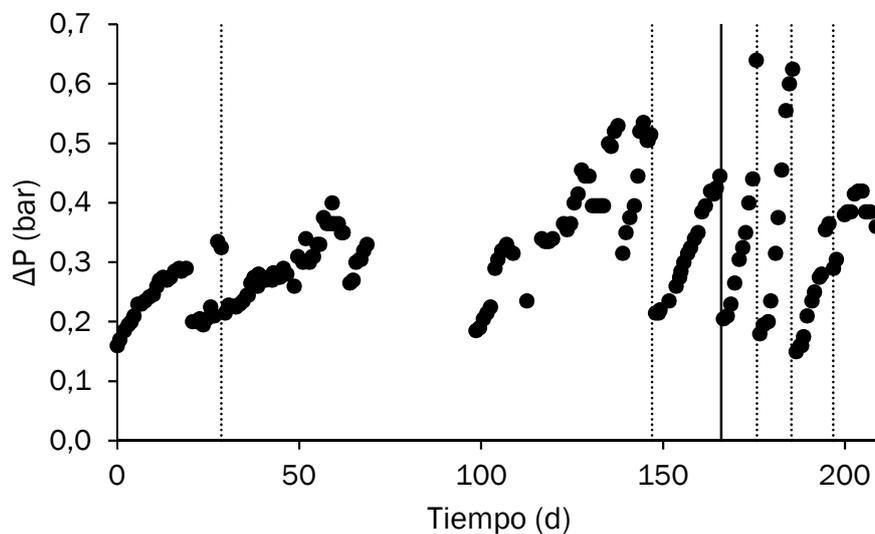


Figura 13. Evolución temporal de la caída de presión.

El ratio O₂:CH₄ efectivo representa la relación O₂/CH₄ obtenida tras la unión de la corriente de entrada al sistema y la corriente de recirculación, es decir, es la relación que realmente le llega a los metanotrofos presentes en el medio de cultivo. Es importante mantener esta relación en un rango moderado para evitar que pueda tener lugar la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ y por tanto, se produzca una acumulación de nitritos en el sistema que provoquen la inhibición de la oxidación de CH₄. Durante todo el experimento se controló este ratio obteniendo valores entre 0,8 y 1,6 (Figura 14), valores que están dentro de los reportados en bibliografía como admisibles para el crecimiento de metanotrofos productores de PHBs (Karthikeyan *et al.*, 2015)

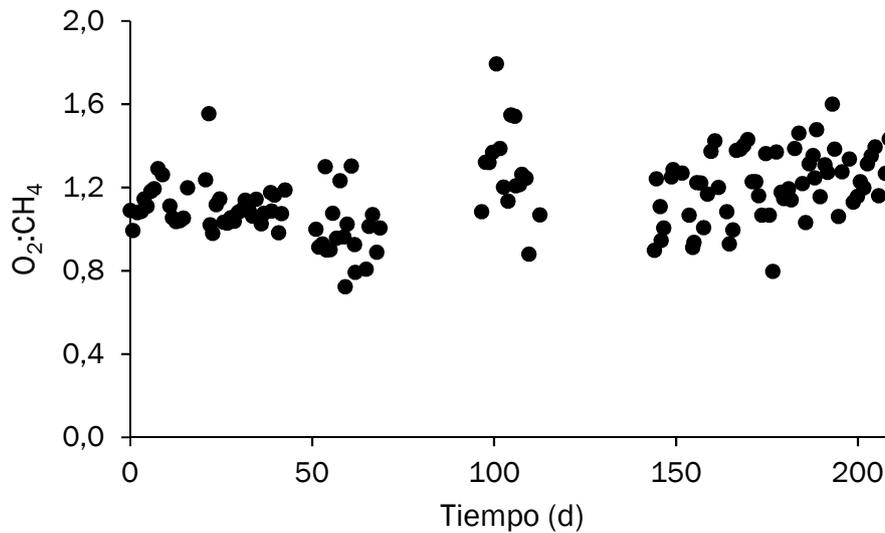
Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Figura 14. Evolución temporal del ratio $\text{O}_2:\text{CH}_4$ efectivo de entrada al reactor.

4.4 Análisis de la fase líquida

El análisis rutinario del pH del caldo de cultivo dio valores comprendidos entre 7,0 y 7,6. Esta estabilidad en el pH es debida al reemplazo diario de 500 mL de medio que permite mantener un pH óptimo para el crecimiento de los metanotrofos. El intercambio de medio mineral permite además retirar posibles metabolitos secundarios derivados de la ruta de degradación del CH_4 que se acumulan en el medio y pueden resultar tóxicos para los microorganismos.

El seguimiento periódico de la concentración de NO_3^- y NO_2^- sirvió para controlar que hubiera siempre disponibilidad de KNO_3 como fuente de nitrógeno, y no limitar el crecimiento de la biomasa, así como que no se generase una acumulación excesiva de NO_2^- que pudiera afectar al metabolismo de los metanotrofos.

De este modo, valores de NO_2^- de ≈ 300 ppm en el medio de cultivo (Figura AIII.2) se asociaron con un empeoramiento del desempeño del biorreactor y por lo tanto menores eliminaciones de CH_4 . Esto apunta a una inhibición por acumulación de NO_2^- en el caldo de cultivo, el cual es tóxico en concentraciones elevadas para los metanotrofos (Bédard y Knowles, 1989; Stein *et al.*, 2012).



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

5. CONCLUSIONES

Este estudio demostró que el aumento del ratio de recirculación interna Q_R/Q derivó en incrementos progresivos de los valores medios de eficacia de eliminación independientemente del tiempo de residencia del gas. Sin embargo, aunque en la etapa II (TRG = 60 min) la CE aumentó conforme se aumentaba Q_R/Q , en la etapa I (TRG = 30 min) se obtuvo el valor máximo a una Q_R/Q de 5 ($CE_{m\acute{a}x} = 55,1 \pm 1,7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$).

El incremento del TRG supuso una disminución de los valores de CE y de PCO_2 y un aumento de las EE. De este modo, un ratio Q_R/Q de 10 se traduce en aumentos de EE de 2,4 y 2,8 veces la eficacia del sistema sin recirculación para las etapas I y II, respectivamente.

El análisis del coste energético derivado de la recirculación nos permite determinar el valor óptimo de Q_R/Q . Por ejemplo, a un TRG = 60 minutos para Q_R/Q superiores a 10, la mejora de un 1 % de la CE tiene asociado un aumento del coste energético del 13,1 %.

Finalmente, el estudio experimental permitió optimizar otros parámetros de operación claves para el buen funcionamiento del sistema, tales como el ratio CH₄:O₂ (0,8 – 1,6), la concentración máxima de nitritos en el medio de cultivo (300 ppm) o la caída de presión (0,2 – 0,5 bar).



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



6. BIBLIOGRAFÍA

Acton, S.D., Baggs, E.M., 2011. Interactions between N application rate, CH₄ oxidation and N₂O production in soil. *Biogeochemistry* 103: 15–26.

Alsayed, A., Fergala, A., Eldyasti, A., 2018. Sustainable biogas mitigation and value-added resources recovery using methanotrophs intergrated into wastewater treatment plants. *Rev Environ Sci Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9464-3>.

Amaral, J. A., Knowles, R., 1995. Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters* 126(3), 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07421.x>.

Avalos-Ramírez, A., García-Aguilar, B.P., Jones, J.P., Heitz, M., 2012. Improvement of methane biofiltration by the addition of non-ionic surfactants to biofilters packed with inert materials. *Process Biochemistry* 47(1), 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.007>.

Bédard, C., Knowles, R., 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiological Reviews*, 53(1), 68–84.

Bender, M., Conrad, R., 1995. Effect of CH₄ concentrations and soil conditions on the induction of CH₄ oxidation activity. *Soil Biology and Biochemistry* 27(12), 1517-1527. doi:10.1016/0038-0717(95)00104-M.

Bowman, J. P., 2006. The methanotrophs—the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*.

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: Álvarez Fernández R., Zubelzu S., Martínez R. (eds) *Carbon Footprint and the Industrial Life Cycle. Green Energy and Technology*. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-54984-2_17.

Chen, G.Q., Hajnal, I., Wu, H., Lv, L., Ye, J., 2015. Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnologies* 33, 565-574.

Choi

Cui, M., Ma, A., Qi, H., Zhuang, X., Zhuang, G., 2015. Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *Microbiology Open* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1002/mbo3.232>

CEMMP, Economic Commission for Europe Methane to Markets Partnership. Best Practice Guideline for effective methane darinage and use in coal mines, 2010. ECE Energy Series, 31. United Nations.

EEA, European Environment Agency. Annual European Union greenhouse gas inventory 1990 - 2014 and inventory report 2016. <http://www.eea.europa.eu/publications/european-union-greenhouse-gas-inventory-2016> (visitado en mayo 2018).

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

EPA, Environmental Protection Agency US. Inventory of US greenhouse gas emissions and sinks: 1990 - 2014. <http://epa.gov/climatechange/ghgemissions/usinventoryreport.html> (visitado en mayo 2018).

Estrada, J.M., Kraakman, N.J.R., Lebrero, R., Muñoz, R., 2012. A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnology Advances* 30, 1354-1363. [doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.010](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.010).

Estrada, J. M., Lebrero, R., Quijano, G., Pérez, R., Figueroa-González, I., García-Encina, P. A., Muñoz, R., 2014. Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chemical Engineering Journal* 253, 385-393. [doi:10.1016/j.cej.2014.05.053](https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053).

Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., De Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J., van Aken, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Paschoonen, K. T., Op den Camp, H. J., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M. S., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543-548. [doi:10.1038/nature08883](https://doi.org/10.1038/nature08883).

García-Pérez, T., López, J. C., Passos, F., Lebrero, R., Revah, R., Muñoz, R., 2018. Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 334, 691-697. [doi:10.1016/j.cej.2017.10.106](https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.106).

Gebert, J., Grönröft, A., Miehl, G., 2003. Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Manag* 23, 609-619. [doi:10.1016/S0956-053X\(03\)00105-3](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(03)00105-3).

Gebert, J., Grönröft, A., 2006. Performance of a passively vented fieldscale biofilter for the microbial oxidation of landfill methane. *Waste Manag* 26, 399-407. [doi:10.1016/j.wasman.2005.11.007](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.11.007).

Hanson, R. S., Hanson, T. E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60, 439-471.

Helm, J., Wendlandt, K.-D., Jechorek, M., Stottmeister, U., 2008. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in a methaneutilizing mixed culture. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1054-1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03831.x>.

IPCC, 2014: Summary for policymakers. In: *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*.

Kalyuzhnaya, M. G., Khmelenina, V., Eshinimaev, B., Sorokin, D., Fuse, H., Lidstrom, M., Trotsenko, Y., 2008. Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali) tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylococcoides* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylococcoides*.



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 591–596.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65317-0>.

Kalyuzhnaya, M. G., Puri, A. W., Lidstrom, M. E., 2015. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering* 29, 142–152.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>.

Karthikeyan, O. P., Chidambarampadmavathy, K., Nadarajan, S., Lee, P. K. H., Heimann, K., 2015. Effect of CH₄/O₂ ratio on fatty acid profile and polyhydroxybutyrate content in a heterotrophic–methanotrophic consortium. *Chemosphere* 141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.054>.

Knief C., 2015. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Frontiers in Microbiology* 6, 1346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>.

Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* 63, 311–334. doi: annurev.pp.08.060157.001521/annurev.micro.61.080706.093130.

Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., Braunegg, G., 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology* 37, 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>.

Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J. M., Muñoz, R., 2014. Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: Exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *Journal of Environmental Management* 151, 124-131. doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.016.

Lebrero, R., López, J. C., Lehtinen, I., Pérez, R., Quijano, G., Muñoz, R., 2016. Exploring the potential of fungi for methane abatement: Performance evaluation of a fungal-bacterial biofilter. *Chemosphere*, 144, 97-106. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.017.

Lee, S.-W., Im, J., DiSpirito, A. A., Bodrossy, L., Barcelona, M. J., Semrau, J. D., 2009. Effect of nutrient and selective inhibitor amendments on methane oxidation, nitrous oxide production, and key gene presence and expression in landfill cover soils: characterization of the role of methanotrophs, nitrifiers, and denitrifiers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(2), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2238-7>

López, J.C., Quijano, G., Souza, T.S., Estrada, J.M, Lebrero, R., Muñoz, R., 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(6), 2277-2303. doi: 10.1007/s00253-013-4734-z.

López, J. C., Quijano, G., Pérez, R., Muñoz, R., 2014. Assessing the influence of CH₄ concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure. *Journal of Environmental Management* 146, 116–123. doi:10.1016/j.jenvman.2014.06.026.

López, J. C., Porca, E., Collins, G., Pérez, R., Rodríguez-Alija, A., Muñoz, R., Quijano, G., 2016. Biogas-based denitrification in a biotrickling filter: influence of nitrate concentration and hydrogen sulfide. *Biotechnology and Bioengineering* 114, 665–673. <https://doi.org/10.1002/bit.26092>.



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

López, J. C., Merchán, L., Lebrero, R., Muñoz, R., 2018. Feast-famine biofilter operation for methane mitigation. *Journal of Cleaner Production* 170, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.157>.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A., 2015. *Brock biology of microorganisms*, 14th edn. Pearson, Boston.

Marín, I., Arahál, D. R., 2014. The family Beijerinckiaceae. In: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The prokaryotes*. Springer, Berlin, pp 115–133. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_255.

Moshtari, B., Babakhani, E. G., Moghaddas, J., 2009. Experimental study of gas hold-up and bubble behavior in gas-liquid bubble column. *Petroleum and Coal* 51(1), 27-32.

Op den Camp, H. J. M., Islam, T., Sttrot, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M. S. M., Birkeland, N. K., Pol, A., Dunfield, P. F., 2009. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environmental Microbiology Reports* 1, 293–306. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x.

Ordaz, A., López, J. C., Figueroa-González, I., Muñoz, R., Quijano, G., 2014. Assessment of methane biodegradation kinetics in two-phase partitioning bioreactors by pulse respirometry. *Water Research* 67, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.054>.

Rahnama, F., Vasheghani-Farahani, E., Yazdian, F., Shojaosadati S.A., 2012. PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 65, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.014>.

Rittmann, B. E., McCarty, P. L., 2005. *Environmental Biotechnology: “Principles and Applications”*. McGraw Hill series in Water Resources and Environmental Engineering.

Rocha-Rios, J., Bordel, S., Hernández, S., Revah, S., 2009. Methane degradation in two-phase partition bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 152, 289–292. doi:10.1016/j.cej.2009.04.028.

Rostkowski, K. H., Criddle, C. S., & Lepech, M. D., 2012. Cradle-to-gate life cycle assessment for a cradle-to-cradle cycle: Biogas-to-bioplastic (and back). *Environmental Science and Technology*, 46(18), 9822–9829. doi:10.1021/es204541w.

Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and cooper. *FEMS Microbiol Rev* 34, 496–531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x.

Semrau, J. D., 2011. Bioremediation via methanotrophy: Overview of recent findings and suggestions for future research. *Frontiers in Microbiology*, 2(10), 1–7. doi:10.3389/fmicb.2011.00209.

Smith, T. J., Trotsenko, Y. A., Murrell, J. C., 2010. Physiology and biochemistry of the aerobic methane oxidizing bacteria. In: Timmis KN (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin, 765–779.



Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

Seoánez Calvo, M., 1998. *Ecología Industrial: Ingeniería medioambiental aplicada a la industria y a la empresa. Manual para responsables medioambientales.* Colección: Ingeniería medioambiental. 2ª Edición. ISBN 84-714-714-9.

Stein, L. Y., Roy, R., & Dunfield, P. F., 2012. Aerobic Methanotrophy and Nitrification: Processes and Connections. ELS. doi:10.1002/9780470015902.a0022213.

Strong, P. J., Xie, S., Clarke, W.P., 2015. Methane as a Resource: Can the Methanotrophs add value?. *Environmental Science and Technology*, 4001–4018.

Strong, P., Laycock, B., Mahamud, S., Jensen, P., Lant, P., Tyson, G., Pratt, S., 2016. The opportunity for high-performance biomaterials from methane. *Microorganisms* 4, 11.

Turk, A., Badosz, T. J., 2001. Adsorption systems for odour treatment. In *Odours in Wastewater Treatment: Measurement, Modelling and Control*; Stuetz, R.; Frenchen, F.-B., Eds.; IWA Publishing.

van Teeseling, M. C. F., Pol, A., Harhangi, H. R., van der Zwart, S., Jetten, M. S. M., den Camp, H. J. M. O., van Niftrik, L., 2014. Expanding the verrucomicrobial methanotrophic world: description of three novel species of *Methylacidimicrobium* gen. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 6782–6791. <https://doi.org/10.1128/AEM.01838-14>.

Wang, Y., Zhou, Y., Liu, C., Zhou, Li., 2008. Comparative studies of CO₂ and CH₄ sorption on activated carbón in presence of water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 322 (1-3), 14-18. Doi:10.1016/j.colsurfa.2008.02.014.

Wendlandt, K. D., Jechorek, M., Helm, J., Stottmeister, U., 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 127–133. doi:10.1016/S0168-1656(00)00408-9.

Wendlandt, K. D., Geyer, W., Mirschel, G., Hemidi, FA. H., 2005. Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *J Biotechnol* 117, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.01.007>.

Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F., 1970. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *Microbiology* 61, 205-218. doi: [10.1099/00221287-61-2-205](https://doi.org/10.1099/00221287-61-2-205).

Wolf, H. J., Hanson, R. S., 1979. Isolation and characterization of methane utilizing yeasts. *Microbiology* 114, 187-194. doi: [10.1099/00221287-114-1-187](https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-187).

Xue, N., Wang, Q., Wang, J., Wang, J., Sun, X., 2013. Odorous composting gas abatement and microbial community diversity in a biotrickling filter.



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

ANEXOS

ANEXO I. Tablas de datos

Tabla AI.1. Datos medios de cada uno de los estados estacionarios para la etapa I y II del experimento.

Q _R /Q	0	2,5	5	10
TRG = 30 min				
CA (g CH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	223,7 ± 14,2	206,3 ± 8,7	226,8 ± 13,8	175,7 ± 20,4
O ₂ :CH ₄ in	1,1 ± 0,06	1,2 ± 0,07	1,1 ± 0,10	1,3 ± 0,16
CE (g m ⁻³ h ⁻¹)	29,8 ± 2,0	42,2 ± 1,0	55,1 ± 1,7	52,5 ± 1,8
PCO ₂ (g m ⁻³ h ⁻¹)	63,5 ± 3,8	104,5 ± 6,6	117,0 ± 11,3	134,6 ± 9,1
EE (%)	13,3 ± 0,6	20,5 ± 0,8	25,0 ± 1,4	31,4 ± 3,1
RCO ₂ (%)	77,8 ± 9,0	90,1 ± 7,7	77,4 ± 8,8	93,4 ± 6,7
YCO ₂ (g CO ₂ g ⁻¹ CH ₄)	2,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,2
TRG = 60 min				
CA (g CH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	89,1 ± 6,6	77,8 ± 6,3	85,7 ± 2,0	83,3 ± 5,7
O ₂ :CH ₄ in	1,3 ± 0,13	1,4 ± 0,13	1,3 ± 0,09	1,4 ± 0,06
CE (g m ⁻³ h ⁻¹)	11,0 ± 1,7	20,0 ± 1,1	24,8 ± 1,3	28,8 ± 0,9
PCO ₂ (g m ⁻³ h ⁻¹)	21,9 ± 1,0	45,9 ± 3,3	52,5 ± 6,0	66,9 ± 1,7
EE (%)	12,3 ± 1,7	25,9 ± 2,5	29,0 ± 1,7	34,6 ± 1,7
RCO ₂ (%)	74,1 ± 12,3	83,3 ± 2,8	76,9 ± 7,7	84,6 ± 3,2
YCO ₂ (g CO ₂ g ⁻¹ CH ₄)	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

ANEXO II. Rectas de calibrado

Recta de calibración CH₄:

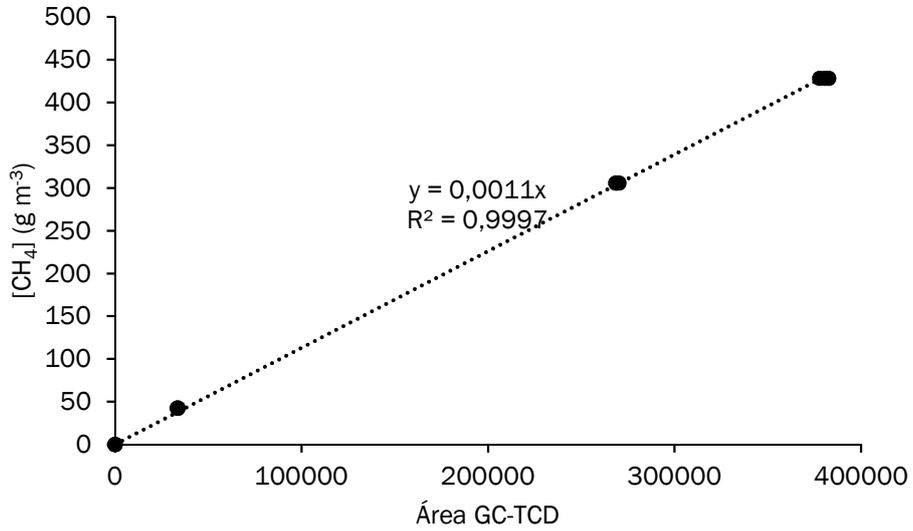


Figura AII.1. Recta de calibración de la concentración de CH₄.

Recta de calibración de CO₂:

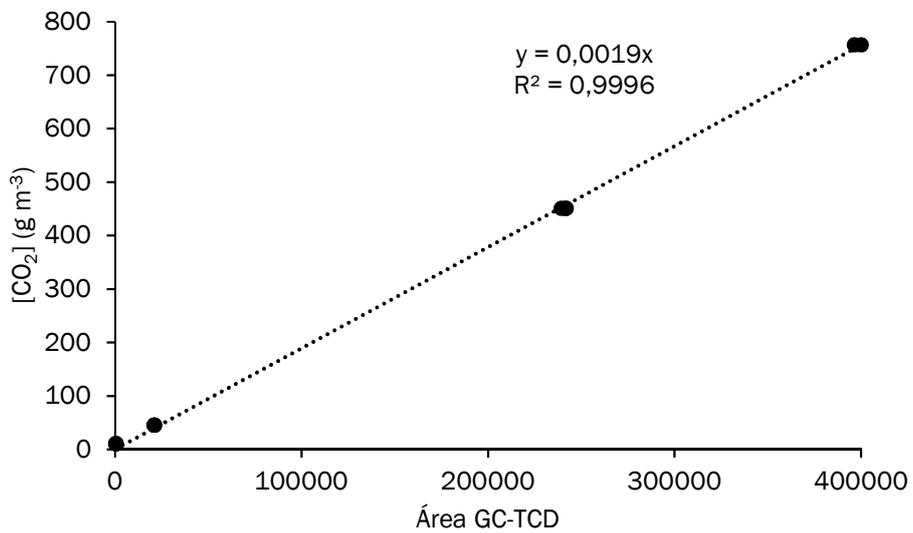


Figura AII.2. Recta de calibración de la concentración de CO₂.

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

Recta de calibración de O₂:

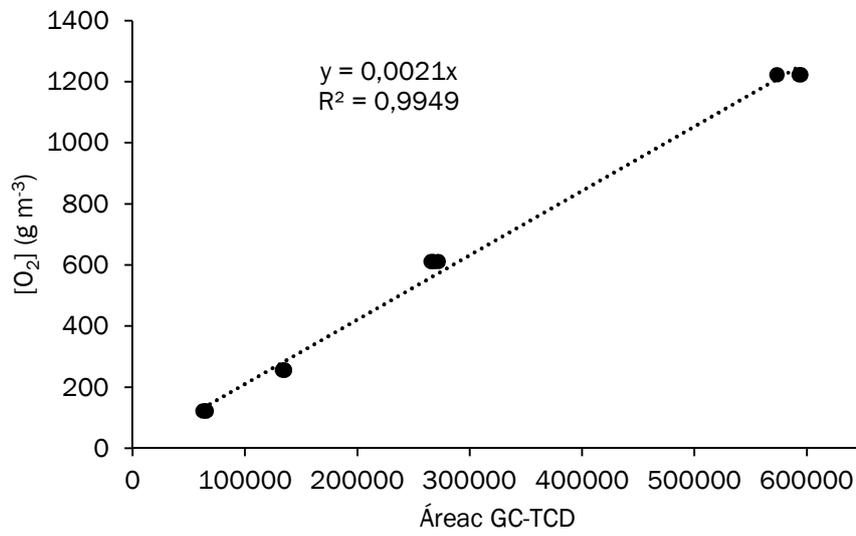


Figura AII.3. Recta de calibración de la concentración de O₂.

Biodegradación de CH₄ en un BCB con recirculación interna

ANEXO III. Imágenes del sistema

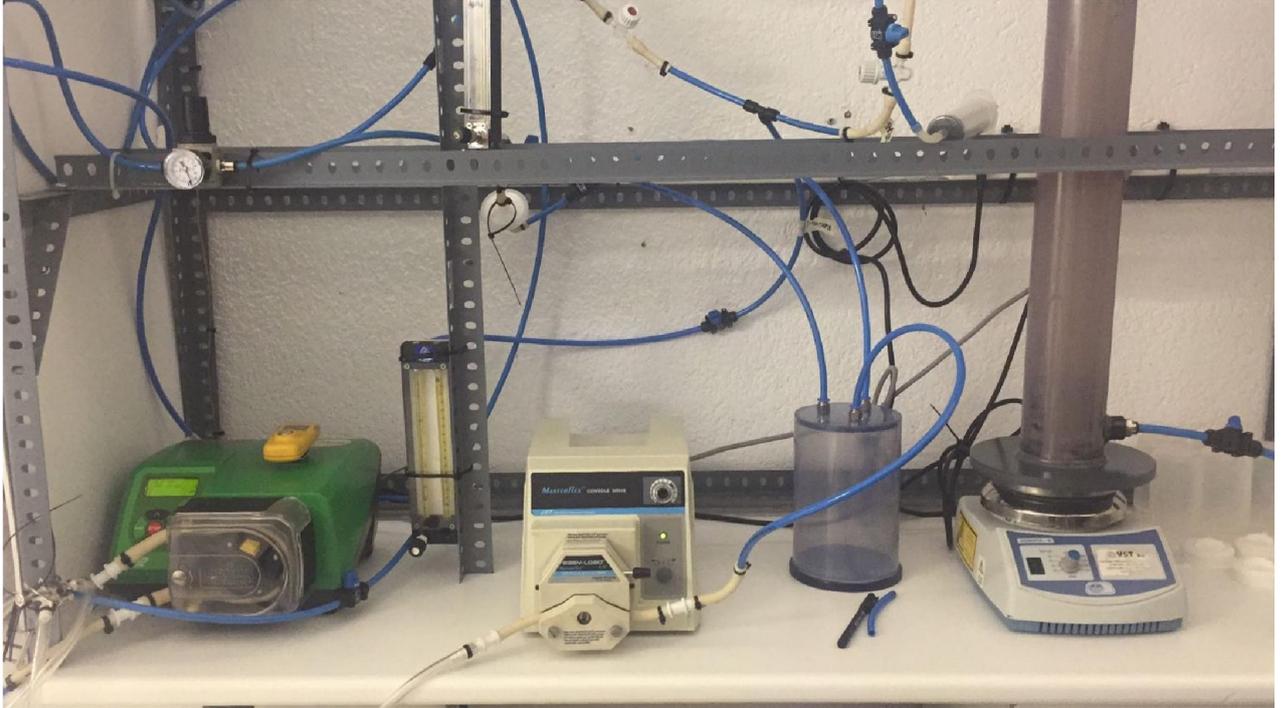


Figura AIII.1. Imagen del montaje a escala de laboratorio.

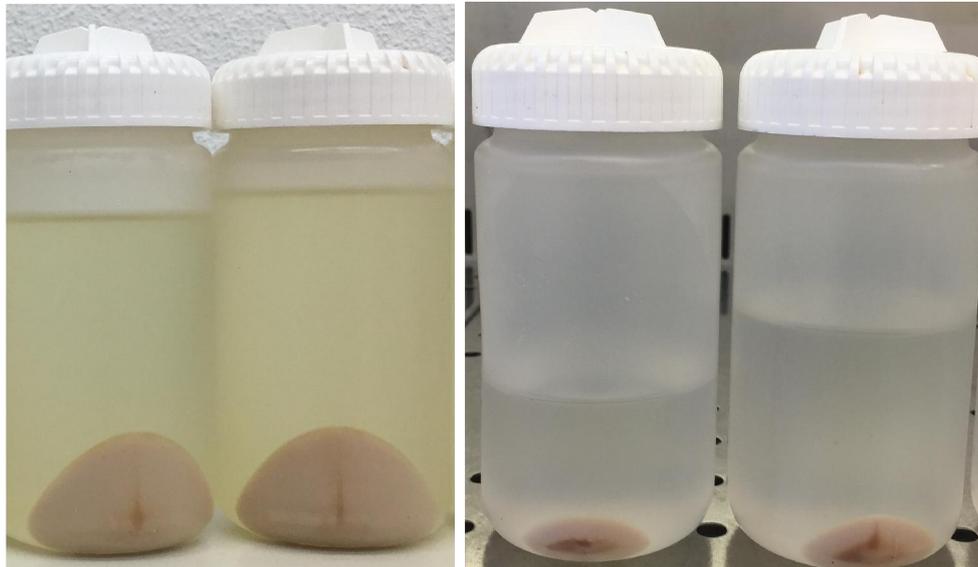


Figura AIII.2. Detalle de la biomasa centrifugada, a la izquierda con acumulación de nitritos y a la derecha sin acumulación de nitritos en el caldo de cultivo.

Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna



Figura AIII.3. Detalle de la fijación de la biomasa a las paredes del reactor por falta de agitación.



Biodegradación de CH_4 en un BCB con recirculación interna