



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Evaluación molecular y macroscópica de la
robustez de sistemas biológicos de
eliminación de metano en corrientes diluidas**

AUTOR: Prieto Ferrero, Patricia

TUTOR 1: Muñoz Torre, Raúl
TUTOR 2: Rodríguez Rodríguez, Elisa
Departamento de Ingeniería
Química y Tecnología del Medio
Ambiente

Valladolid, Julio 2017.

RESUMEN

El metano (CH₄), emitido típicamente a bajas concentraciones por la industria, es considerado el segundo gas de efecto invernadero en importancia. Las biotecnologías constituyen una alternativa eco-eficiente para su eliminación, pero el desconocimiento sobre su robustez ante fluctuaciones y fallos de operación a escala real limita su aplicación. En este sentido, la rápida capacidad de respuesta de las bacterias metanotróficas es clave. Se evaluó la robustez de tres biorreactores frente a condiciones de alimentación-hambruna para la eliminación de CH₄ en emisiones diluidas ($\approx 4\%$ v/v) (R1 previamente operado en continuo, R2 y R3 ya operados en alimentación-hambruna). El análisis del gen *pmoA* (metano-monooxigenasa) y de parámetros macroscópicos (eliminación de CH₄, producción de CO₂...) mostró una recuperación de la actividad metanotrófica (dominada por *Methylocystis*) extremadamente rápida (0.5 - 1.5 horas) tras cinco días de hambruna, independientemente del historial previo de operación de los biorreactores, confirmando así la robustez de esta biotecnología.

Palabras clave

Gas de efecto invernadero, reactor de tanque agitado, *pmoA*, ciclos hambruna-alimentación, robustez.

ABSTRACT

Methane (CH₄), typically emitted at low concentrations by industry, is considered the second most important greenhouse gas. Biotechnologies constitute an eco-efficient alternative for CH₄ treatment, but the lack of knowledge on their robustness towards fluctuations and operational failures at industrial facilities limit their application. In this context, the rapid response of methanotrophic bacteria is a key factor. In this work, the robustness of three bioreactors for the abatement of CH₄ in diluted emissions ($\approx 4\%$ v/v) was evaluated under feast-famine conditions (R1 previously operated in a continuous mode, R2 and R3 previously operated under feast-famine regime). Results from the analysis of the *pmoA* gene (methane-monooxygenase) and macroscopic parameters (CH₄ elimination capacity, CO₂ production...) showed an extremely fast recovery of the methanotrophic activity (dominated by *Methylocystis*) (0.5 - 1.5 hours), regardless of the previous operation history of the reactors, thus supporting the robustness of this biotechnology.

Keywords:

Greenhouse gas, stirred tank reactor, *pmoA*, feast-famine, robustness.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Gases y reactivos químicos.	33
3.2. Inóculo y solución de nutrientes.	33
3.3. Configuración experimental y operación y seguimiento de los biorreactores en estado estacionario.	33
3.4. Análisis fisicoquímicos.....	35
3.5. Ecuaciones empleadas para el cálculo de los parámetros de seguimiento del rendimiento macroscópico.....	36
3.6. Evaluación sistemática de la robustez de los biorreactores frente a los ciclos de alimentación/hambruna.....	37
3.6.1. Toma de muestras para el análisis del gen de la <i>pmoA</i> por QPCR	38
3.6.2. Extracción de ADN de las muestras.....	38
3.6.3. Optimización de la extracción de ARN para el análisis de la expresión del gen <i>pmoA</i> por QPCR	39
3.6.4. Reacción de transcripción reversa o retrotranscripción.....	42
3.6.5. Diseño y optimización del ensayo de QPCR para el análisis del gen <i>pmoA</i>	44
3.6.6. Cuantificación del gen <i>pmoA</i> en las muestras problema por PCR Cuantitativa en Tiempo Real	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1. Rendimiento de los reactores en estado estacionario.....	56
4.1.1. Rendimiento de la eliminación de CH_4 y NH_4^+ en los biorreactores.....	57
4.1.2. Producción de CO_2	63
4.1.3. pH, caída de presión y producción de biomasa	65
4.2. Evaluación de la robustez de los biorreactores	68
4.2.1. Producción de CO_2	74
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN	89
ANEXO II. IMÁGENES DEL SISTEMA.	91
ANEXO III. EQUIPOS UTILIZADOS DURANTE ESTE TRABAJO.	93
ANEXO IV. ENSAYOS DE PCR CUANTITATIVA DE “TOUCHDOWN”	97
ANEXO V. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD.	99

ANEXO VI. CURVAS DE CALIBRADO PARA QPCR 105

1. INTRODUCCIÓN

Los gases de efecto invernadero (GEIs), entre los que figuran el dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4), el óxido nitroso (N_2O), los gases fluorados (F-gases) y el ozono (O_3), son un conjunto de compuestos químicos presentes en la atmósfera, de origen natural y/o antropogénico, que retienen parte de la radiación infrarroja que la Tierra emite tras haber sido calentada por el Sol, provocando así su calentamiento. El efecto invernadero, es, por tanto, un fenómeno natural que permite mantener la temperatura de la Tierra en valores aptos para la vida. Sin embargo, su efecto beneficioso puede verse alterado por la actividad humana, responsable del incremento en la concentración de GEIs en la atmósfera, que provoca el calentamiento progresivo de la superficie terrestre, lo que se conoce como “calentamiento global”. Con diferencia, el principal GEI emitido a causa de la actividad humana es el CO_2 . Este gas representa aproximadamente un 80 % de las emisiones totales de GEIs. Le siguen, en orden de importancia, el CH_4 ($\approx 10\%$), N_2O ($\approx 5\%$) y los F-gases ($\approx 2\%$) (EEA, 2017; EPA, 2016) (Fig. 1).

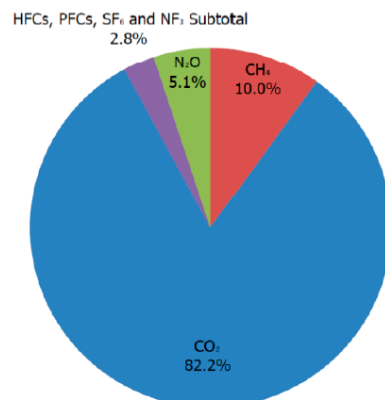


Figura 1. Emisiones de gases de efecto invernadero en Estados Unidos en 2015 (porcentajes basados en millones de toneladas métricas de CO_2 equivalente (EPA, 2016).

Las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero han ido aumentando desde la era pre-industrial hasta la actualidad, impulsadas en gran medida por el crecimiento económico y en menor medida, por el crecimiento demográfico (Fig. 2). Durante el período que abarca los años 1970 y 2010, los mayores incrementos absolutos se observaron entre 2000 y 2010, a pesar del aumento en la implantación de políticas de mitigación del cambio climático. En 2010, las emisiones de GEIs de origen antropogénico alcanzaron las $49 \pm 4.5 \text{ GtCO}_2\text{-eq} / \text{año}$ (Fig. 3).

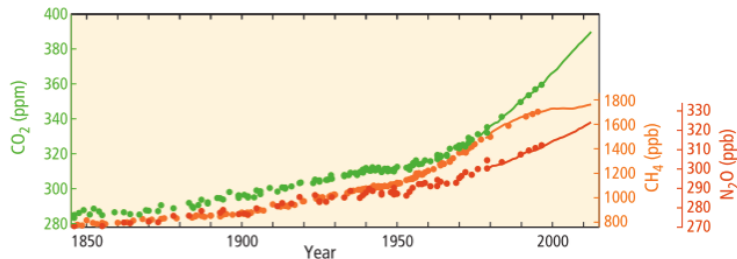


Figura 2. Concentraciones atmosféricas globales de GEIs (CO₂ (verde), CH₄ (naranja) y N₂O (rojo)) determinadas a partir de los datos de núcleos de hielo y de mediciones atmosféricas directas (IPCC, 2014).

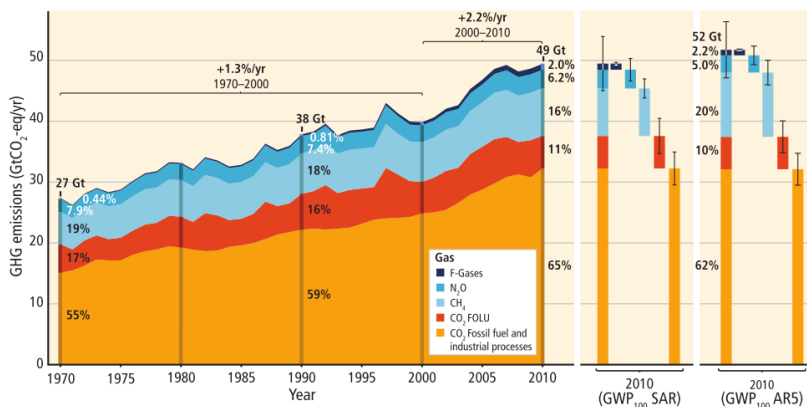


Figura 3. Emisiones antropogénicas anuales de los gases de efecto invernadero (CO₂ procedente de la combustión de combustibles fósiles y procesos industriales (amarillo), CO₂ procedente del sector forestal y otros usos del suelo (rojo), CH₄ (azul celeste), N₂O (azul), F-gases (azul oscuro)) incluidos en el Protocolo de Kioto (IPCC, 2014).

Como consecuencia del aumento en la concentración de GEIs en la atmósfera, la temperatura media del planeta ha aumentado. El promedio global combinado de los datos de temperatura de la superficie terrestre y oceánica muestra un calentamiento de 0.85 °C [0.65 °C – 1.06 °C] durante el periodo correspondiente a los años 1880 - 2012 (Fig. 4). En los océanos, el calentamiento es mayor cerca de la superficie; en los primeros 75 metros el agua se calentó en 0.11 °C [0.09 °C – 0.13 °C] por década durante el periodo de 1971 -2010 (IPCC, 2014).

El aumento en la concentración atmosférica de GEIs (principalmente CO₂, CH₄ y N₂O) parece además estar relacionado con cambios en la salinidad y el pH de los océanos. Así, es altamente probable que las regiones con elevada salinidad,

donde domina la evaporación, se hayan vuelto más salinas, mientras que en las regiones donde predomina la precipitación, se haya perdido contenido en sales a lo largo de los últimos cincuenta años. La acidificación de los océanos a consecuencia de la absorción del CO₂ presente en exceso en la atmósfera se ha constatado por la disminución en el pH de 0.1, lo que corresponde a un aumento del 26% de la acidez, medida como concentración de iones de hidrogeno. Esta acidificación repercute a su vez en la fauna marina y los ecosistemas (IPCC, 2014).

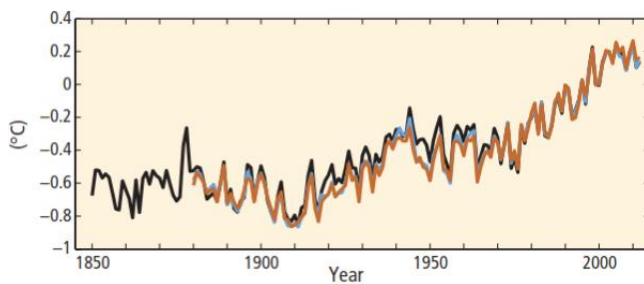


Figura 4. Anomalía de la temperatura media global combinada de la superficie terrestre y los océanos (IPCC, 2014).

Por otro lado, el aumento en la concentración de GEIs ha generado un impacto sobre el nivel del mar. Entre 1992 y 2011, las capas de hielo de Groenlandia y La Antártida Occidental han perdido masa. Los glaciares han seguido reduciéndose casi en todo el mundo; las temperaturas del permafrost han aumentado en la mayoría de las regiones desde comienzo de los años ochenta en respuesta al aumento de temperatura de la superficie y a la variación de la masa de nieve. Entre 1901 y 2010, el nivel medio del mar subió 0.19 m [0.17 m a 0.21 m] (IPCC, 2014) (Fig. 5).

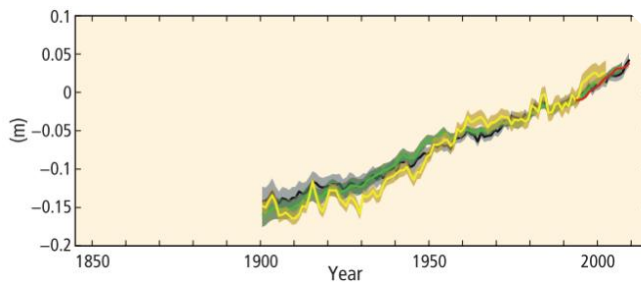


Figura 5. Cambio promedio global del nivel del mar correspondiente al período 1986-2005 (IPCC, 2014).

Formatted: Font: +Body (Calibri)

Formatted: Normal, Left, Line spacing: single

A parte del calentamiento global y el deshielo, otra consecuencia importante es el smog, un tipo de contaminación atmosférica que se genera debido a las emisiones de GEIs procedentes de la actividad humana y mediante reacciones fotoquímicas de estas emisiones. El smog contiene óxidos de nitrógeno, compuestos orgánicos volátiles (COVs) y O_3 , entre otros compuestos, que provocan un claro impacto negativo sobre la salud humana y los ecosistemas (IPCC, 2014) (Fig. 6). Concretamente, el O_3 troposférico se genera mediante reacciones fotoquímicas con otros gases resultantes de la actividad humana (óxidos de nitrógeno, COVs,...) (IPCC, 2014). Esto ha provocado el aumento en las concentraciones mundiales de O_3 a nivel de suelo, lo que reduce la esperanza de vida de la población y el rendimiento de los cultivos bajo exposición a largo plazo. Se estima que el O_3 antropogénico está asociado a 0.7 ± 0.3 millones de muertes por causas respiratorias cada año en todo el mundo (Anenberg et al., 2010). Por otro lado, la producción mundial de maíz, soja y trigo se ha reducido entre un 2 y un 15% debido a esta exposición al O_3 antropogénico (Avnery et al., 2013).



Figura 6. Smog generado a consecuencia de las emisiones antropogénicas de GEIs en la ciudad de Beijing (China).

Ante este escenario mundial, 195 países adoptaron en diciembre de 2015, el primer acuerdo vinculante para reducir las emisiones de GEIs con el fin de mantener el aumento de la temperatura media mundial por debajo de los $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ("Acuerdo de París", alcanzado durante la Conferencia de París sobre el Clima (COP21)). A nivel europeo, el objetivo es disminuir en un 20 % las emisiones de GEIs para el año 2020 y en un 40 % para el año 2030 ("Climate Action," n.d.) De hecho, la Unión Europea está actualmente evaluando la posibilidad de modificar el objetivo para 2020 a un 30 %, puesto que, a pesar de que en el año 2015 se constató el primer aumento en la emisión de GEIs desde el año 2010, desde 1990 a 2015 las emisiones de GEIs se han reducido en un 22.1 %, al tiempo que la economía de la Unión Europea creció un 50 % durante este período (Fig. 7). Esto demuestra, que el crecimiento económico a largo plazo es

compatible con la reducción de GEIs y que por, tanto, deben mantenerse y renovarse las medidas políticas encaminadas a reducir progresivamente las emisiones.

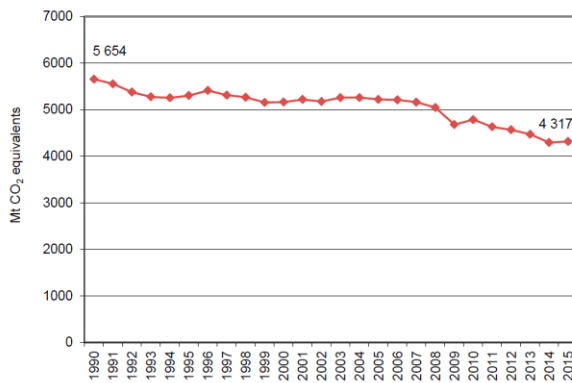


Figura 7. Emisiones de GEIs en la Unión Europea-28 e Islandia desde 1990 a 2015 (EEA, 2017).

CO₂ y CH₄ constituyen los principales GEIs emitidos a consecuencia de la actividad humana. Ambos representan el 92 % del total de las emisiones (EEA, 2017; EPA, 2017). El CO₂ antropogénico procede principalmente de la utilización de combustibles fósiles, la producción industrial y la deforestación. Las emisiones mundiales de CO₂ procedentes de la combustión de combustibles fósiles y de los procesos industriales contribuyen alrededor del 78 % de las emisiones totales de GEIs (IPCC, 2014). En los Estados Unidos, en 2015, el 93.3 % de las emisiones de CO₂ se originaron por el uso de combustibles fósiles, siendo el sector transportes y el sector energético los que más contribuyeron en la generación de estas emisiones (32 % y 35 % del total, respectivamente) (Fig. 8) (EPA, 2017). De forma similar, en la Unión Europea el sector transportes contribuyó un 24 % al total de las emisiones de CO₂ en 2015 (Fig. 9) (EEA, 2017).

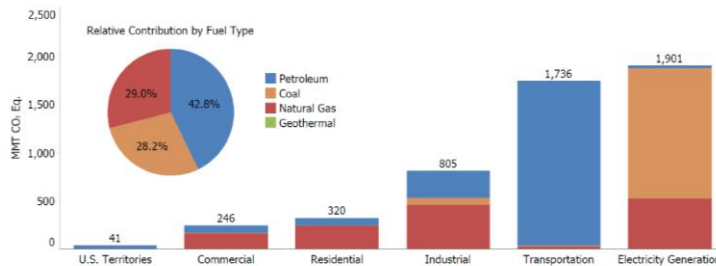


Figura 8. Fuentes de emisiones de CO₂ procedentes del uso de combustibles fósiles por sector y tipo de combustible en Estados Unidos (2015) (EPA, 2017).

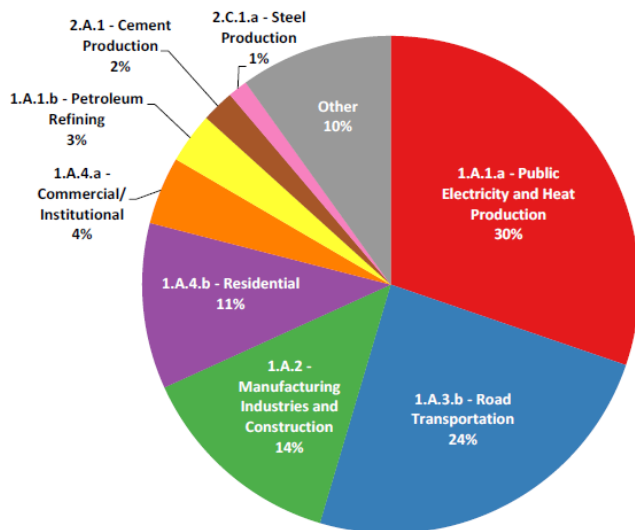


Figura 9. Fuentes de emisiones de CO₂ por sector en la Unión Europea (2015) (EEA, 2017).

A diferencia del CO₂, que puede permanecer en la atmósfera durante varios siglos, el CH₄, considerado el segundo GEI antropogénico en importancia (EEA, 2017; EPA, 2017; IPCC, 2014), presenta una vida media atmosférica relativamente más corta (≈ 12 años) (Tabla 1) (EPA, 2016; IPCC, 2014). Sin embargo, su Potencial de Calentamiento Global (PCG) es 83 veces mayor que el del CO₂ en un horizonte a 20 años (Tabla 1) (IPCC, 2014). Los responsables políticos generalmente ignoran el PCG del CH₄ a 20 años (duración aproximada de su efecto sobre el planeta), sino que, por una mera cuestión de convención, utilizan el PCG del CH₄ y del resto de GEIs a 100 años en la elaboración de los inventarios de emisiones de la nación (Tabla 2). Esto contribuye a subestimar los efectos perjudiciales del CH₄ sobre la Tierra (subestima su PCG) (Daniel et al., 2012; Ocko et al., 2017). De hecho, investigadores del Fondo para la Defensa del Medio Ambiente (“Environmental Defense Fund,” n.d.), han propuesto que ambas escalas temporales (20 y 100 años) sean publicadas como un par inseparable para cada GEI, de modo que pueda hacerse un análisis más realista de las políticas climáticas (Ocko et al., 2017). Por tanto, los esfuerzos para limitar las emisiones de CH₄ (y de otros GEIs de corta duración en la atmósfera) deben ser parte del esfuerzo global para lograr alcanzar el objetivo de mantener el calentamiento global de la superficie terrestre por debajo de los 2 °C.

Tabla 1. Ejemplo de valores de PCG utilizando diferentes escalas temporales (IPCC, 2014).

	Lifetime (yr)	GWP	
		Cumulative forcing over 20 years	Cumulative forcing over 100 years
CO ₂	^b	1	1
CH ₄	12.4	84	28
N ₂ O	121.0	264	265
CF ₄	50,000.0	4880	6630
HFC-152a	1.5	506	138

Notes:

^b No single lifetime can be given for CO₂. [WGI Box 6.1, 6.1.1, 8.7]

Tabla 2. Potenciales de Calentamiento Global (PCG) calculados para un horizonte temporal de 100 años utilizados por la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) en el Inventario de Emisiones de Efecto Invernadero 1990-2015 (EPA, 2017).

Gas	WPG
CO ₂	1
CH ₄ ^(a)	25

^(a) El PCG del CH₄ incluye los efectos directos y los indirectos debidos a la producción de ozono y vapor de agua troposféricos. El efecto indirecto debido a la producción de CO₂ no está incluido. Fuente: IPCC, 2007.

Durante los últimos 250 años, la concentración de CH₄ en la atmósfera aumentó en un 150 % (IPCC, 2014). Las emisiones antropogénicas de CH₄ constituyen entre un 50 % y un 65 % de las emisiones totales de este GEI (OMM, 2015), y proceden principalmente de la ganadería (fermentación entérica, estiércol), la quema de combustibles fósiles, las actividades agrícolas, los vertederos, sistemas de gas natural, producción de combustibles fósiles, y la quema de biomasa, tratamiento de aguas residuales y ciertos procesos industriales (EPA, 2017). En la Unión Europea, en el año 2015, las emisiones de este GEI constituyeron un 11 % de las emisiones totales de CH₄, siendo las principales fuentes de generación la fermentación entérica y los residuos anaerobios (Fig. 10) (EEA, 2017). En este mismo año, las emisiones antropogénicas de CH₄ en los Estados Unidos, constituyeron un 10 %, siendo las principales fuentes de generación de este gas la fermentación entérica, los sistemas de gas natural y los vertederos (EPA, 2017).

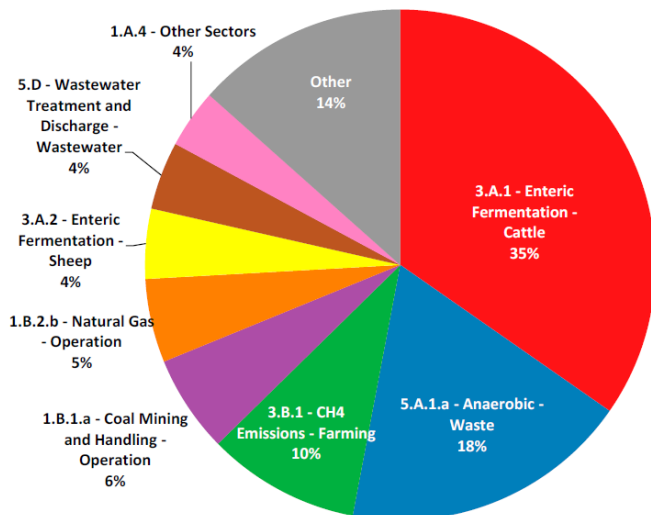


Figura 10. Fuentes de emisiones de CH₄ en la Unión Europea (2015) (EEA, 2017).

La mayor parte de estas emisiones de CH₄ son emisiones puntuales en explotaciones agropecuarias, sistemas de gas natural (emisiones durante el almacenaje y distribución, emisiones fugitivas...), pilas de compost, vertederos, sistemas de extracción de aire en el sector minero, etc. (EEA, 2017; EPA, 2017). De hecho, centrales eléctricas, industrias manufactureras, explotaciones de ganado, vertederos, minas de carbón subterráneas, plantas de tratamiento de aguas residuales y de residuos sólidos urbanos, se construyen en la actualidad con sistemas de ventilación forzada (extracción) para la descarga de estas emisiones. Esto implica que **la eliminación del gas contaminante podría llevarse a cabo in situ mediante las tecnologías adecuadas**. En este contexto, la Organización Meteorológica Mundial (OMM) ("World Meteorological Organization," n.d.), señaló que una reducción drástica de las emisiones de CH₄ podría constituir una alternativa de bajo coste para reducir el cambio climático mientras la mitigación de CO₂ a escala mundial no se alcanza de manera satisfactoria (OMM, 2011).

Por otro lado, a pesar de que parte del CH₄ liberado a la atmósfera por la actividad humana puede ser recuperado en forma de energía limpia (combustible en turbinas de gas, generadores de vapor, calefacción, vehículos de transporte...), la mayor parte de estas emisiones antropogénicas de CH₄ (55 %) presentan concentraciones por debajo del 3 % (v/v), y por tanto, su uso como fuente de energía limpia se ve limitado (Avalos Ramirez et al., 2012; Nikiema et al., 2007). **Es por tanto necesario el desarrollo de tecnologías eficientes, de**

bajo coste, y con baja huella ambiental para la eliminación de estas emisiones de CH₄ diluidas.

Las tecnologías físico-químicas, como la combustión de CH₄ en antorchas (Fig. 11), la oxidación catalítica o las tecnologías de pre-concentración del gas como la adsorción o la absorción, se han venido utilizando de manera tradicional para la eliminación de CH₄, **sin embargo, estas tecnologías no son efectivas o económicamente viables para el tratamiento de las emisiones diluidas de CH₄** típicamente generadas por las actividades de tratamiento de residuos, minería del carbón o cría de ganado (Scheutz et al., 2009). Por ejemplo, en vertederos, como norma general, una vez que el contenido en CH₄ del gas generado disminuye por debajo del 30 % v/v, su uso como fuente de energía en motores de combustión se ve limitado, y por debajo de un 20 % v/v las modificaciones en las antorchas estándar para la combustión de estas emisiones diluidas dejan de ser efectivas.



Figura 11. Antorcha de quemado de biogás en el vertedero.

La Tabla 3 muestra las tecnologías disponibles para el tratamiento de emisiones diluidas de CH₄ procedentes de vertederos (tecnologías de mayor disponibilidad en el mercado) y sus limitaciones en cuanto a contenido mínimo de CH₄ (%) y caudal de gas (m³ h⁻¹). Además de las limitaciones relacionadas con la imposibilidad del tratamiento de corriente diluidas de CH₄, las tecnologías físico-químicas presentan otras limitaciones como la generación de CO₂ y otras sustancias tóxicas resultantes de la combustión de CH₄ en antorchas, o los elevados costes de inversión y mantenimiento de las tecnologías de adsorción/absorción, que requieren de varias etapas de tratamiento y eliminación para conseguir un elevado grado de purificación del gas contaminante.

Tabla 3. Identificación de las tecnologías mayormente disponibles en el mercado para la eliminación de gases de vertedero con bajo poder calorífico (bajas concentraciones de CH₄).

Technology	Methane Content (%)	Gas Flow Rate (m ³ /hr)
Readily Available And Meet EPA Temperature And Retention Requirements.		
Conventional HT Flare	30 - 50+	50 - 2,500+
Modified HT Flares	>20 - 50+	50 - 2,500+
Low-CV Flare	10 - 15 - 25+	40 - 100+
Intermittent Flaring	>20 - 50+	50 - 100+
Readily Available And Do Not Meet EPA Temperature And Retention Requirements.		
Operation Of HT Flares Below 1,000°C	>20 - 50+	50 - 2,500+
Supported Combustion Flares	0 - 15	50 - 2,500
Open Flares	>20	10 - 2,500+
Active and Passive Venting	0 - 100	0 - any
Emerging Technologies		
Non-Catalytic Thermal Oxidation	0.4 - 27	500 - 50,000 (at 0.3 - 0.8%)
In-Situ Oxidation	0 - 50	0 - 140 m ³ /ha/hr
Biofiltration	0 - 20	0 - 500

Como alternativa emergente al tratamiento físico-químico, **el tratamiento biológico o las biotecnologías, si permiten el tratamiento de corrientes diluidas de CH₄ (Tabla 3)**. Las biotecnologías hacen uso de microorganismos (bacterias u hongos) para degradar los gases contaminantes, y existen pruebas empíricas suficientes que las sitúan como una alternativa económica y sostenible frente a los procesos físicoquímicos para la eliminación de GEIs (López et al., 2013). De forma global, las biotecnologías presentan costes de operación (Fig. 12) e impactos medioambientales significativamente menores que los métodos físico-químicos (Alfonsín et al., 2015; Estrada et al., 2012). Estos últimos se caracterizan de forma general por su elevado consumo de energía, y de materiales y reactivos, así como por la generación de residuos peligrosos tras el tratamiento. El uso de las biotecnologías para el tratamiento de emisiones diluidas de CH₄ no sólo permite la eliminación del gas contaminante, sino que además permite su valorización en forma de productos de valor añadido (proteínas, biopolímeros, metanol, ácidos orgánicos, ectoína, etc.), que pueden ser usados en diferentes procesos industriales de producción (Strong et al., 2015).

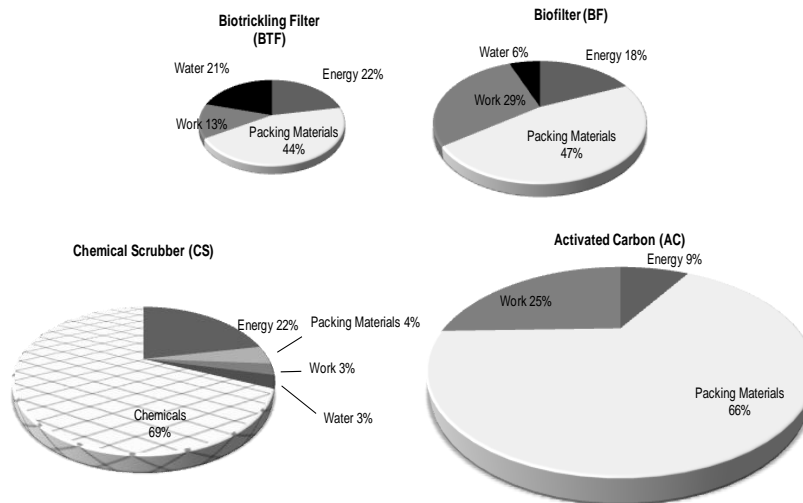


Figura 12. Costes de operación para cuatro tecnologías comúnmente utilizadas para el tratamiento de olores y COVs. El tamaño de las gráficas es proporcional a los costes de operación totales anuales de cada tecnología en un escenario de referencia común (BTF=1.2 € (m³ h)⁻¹, BF=2.0 € (m³ h)⁻¹, CS=3.6 € (m³ h)⁻¹, AC=7.2 € (m³ h)⁻¹). Análisis realizado para una emisión odorífera de 50.000 m³ h⁻¹ (Estrada et al., 2012).

Las **biotecnologías** se presentan por tanto como una **alternativa sostenible, económica y eficiente para el tratamiento y valorización de emisiones diluidas de GEIs**, y contribuyen por tanto a **impulsar el desarrollo de una economía sostenible y circular** que se sitúa entre las **prioridades de la Unión Europea** dentro del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 (“ESHORIZONTE2020,” n.d.). **Es por tanto necesario impulsar el desarrollo de estas biotecnologías, mediante la superación de sus limitaciones para que su instauración en el mercado permita aprovechar las ventajas citadas.**

Entre las limitaciones más relevantes para el desarrollo e implementación de las biotecnologías para el tratamiento de emisiones diluidas de CH₄ se encuentran:

1. La limitada velocidad de transferencia del CH₄ ($F_{G/A}$, mol m⁻³ s⁻¹) al medio de cultivo como resultado de su baja solubilidad en agua (Ley de Henry, $H_{CH_4} = 30$, a 25 °C) (Ecuación 1) ($K_{iA_{G/A}}$ representa el coeficiente volumétrico global de transferencia de CH₄ (s⁻¹), y $[CH_4]_G$ y $[CH_4]_A$ las concentraciones de CH₄ (mol m⁻³) en la fase gas y acuosa, respectivamente). Esta limitación del proceso por transporte del sustrato gaseoso, que implica el uso de biorreactores de gran volumen (Estrada et al., 2014), se vería incrementada en procesos que emplean

aire (la fuente de O₂ más económica) como fuente de aceptor de electrones, debido a la dilución por N₂. Esta dilución conllevaría una reducción en el gradiente de concentraciones interfase-fase global que gobierna el transporte de metano al medio de cultivo (López et al., 2013).

$$F_{G/A} = K_l a_{G/A} \left(\frac{[CH_4]_G}{H_{CH_4}} - [CH_4]_A \right) \quad (1)$$

2. El conocimiento limitado a cerca de la habilidad de estos sistemas para responder frente a fluctuaciones o fallos operacionales que típicamente tienen lugar en las instalaciones a nivel industrial (Kraakman, 2003). La comprensión acerca de cómo estos sistemas pueden responder ante fallos operacionales o fluctuaciones (robustez) no sólo implica la evaluación de dichos sistemas a nivel microbiológico, sino también a nivel microbiológico. Existe un conocimiento limitado sobre los aspectos microbiológicos de estos sistemas dedicados al tratamiento de corrientes de CH₄ diluidas (López et al., 2013) que limita su implementación a escala industrial.
3. La acumulación de biomasa en biorreactores empacados (Devinny and Ramesh, 2005) que afecta en último término a las eficiencias de eliminación de CH₄.

Varios tipos de biorreactores como los biofiltros, biofiltros percoladores, biorreactores de tipo air-lift, tanques agitados y biolavadores han sido utilizados para el tratamiento del CH₄ presente en emisiones de aire (Fig. 13) (López et al., 2013). Entre estas tecnologías, la más cercana al mercado es la biofiltración. Un biofiltro consiste en una columna con un soporte orgánico, donde se hace circular el gas contaminante y un medio de cultivo líquido a contracorriente, lo que permite el crecimiento de los microorganismos (que depuran el gas contaminante) sobre el soporte en forma de biopelícula. La biofiltración y el resto de biotecnologías mencionadas constituyen tecnologías emergentes que pueden convertirse en una opción de futuro y, por tanto, su desarrollo es de especial relevancia.

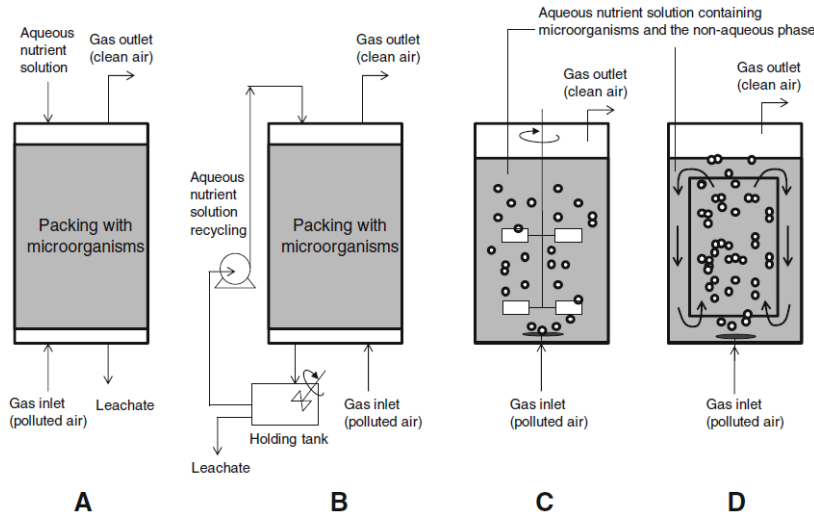


Figura 1.3. Tipos de biorreactores para la eliminación de CH_4 que se han reportado en la literatura. a) biofiltro, b) filtro percolador, c) tanque agitado, d) biorreactor de tipo air-lift (López et al., 2013).

En cuanto a las limitaciones de transferencia de CH_4 típicamente encontradas en estos sistemas (biofiltros, biofiltros percoladores, biolavadores...), en los últimos años se ha llevado a cabo de una actividad de investigación intensa que ha permitido generar avances a este respecto. Así, por ejemplo, se ha investigado el potencial de mejora de transferencia de CH_4 en biorreactores de dos fases basados en la adición de una fase no acuosa (polímeros sólidos o solvente líquido) con una elevada afinidad por el CH_4 , observándose un incremento en la absorción de este gas (Rocha-Rios et al., 2011). Otros autores han observado que la utilización de piedras como material soporte, junto con un surfactante no iónico en un biofiltro percolador, permitió alcanzar un máximo en la eliminación de CH_4 (CE_{CH_4}) de $21 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, con tiempos de retención del gas muy reducidos (0.07 horas) (Avalos Ramirez et al., 2012; López et al., 2013).

Las labores de investigación encaminadas a disminuir los problemas de acumulación de biomasa, falta de robustez y falta de conocimiento microbiológico del proceso no han sido tan intensas, a pesar de constituir factores clave para el desarrollo e implantación de estas biotecnologías en el mercado.

Se ha observado que la acumulación excesiva de biomasa en biorreactores para el tratamiento de COVs puede afectar a los rendimientos de eliminación de estas tecnologías (Devinny y Ramesh, 2005). Cox & Deshusses, 1999

demonstraron que la acumulación de biomasa en biofiltros puede generar problemas de operación como mayor resistencia del flujo de aire, caída de presión y formación de canales preferenciales que pueden contribuir a disminuir la capacidad de eliminación del contaminante en cuestión e incluso a generar la obstrucción (“clogging”) del sistema. Entre las opciones disponibles para la prevención de este problema, se encuentran el lavado químico, el lavado inverso o la eliminación mecánica de la biomasa mediante agitación (Serial et al., 1995; Smith et al., 1996; Weber y Hartmans, 1996; Wübker et al., 1997) Sin embargo, estas soluciones implican el diseño de biorreactores complejos, elevados costes asociados a la necesidad de equipos adicionales y el incremento en la inversión de tiempo por parte de los operarios después del tratamiento.

Una alternativa a estas soluciones consiste en utilizar estrategias de operación “alimentación-hambruna” con el fin de limitar el crecimiento de la biomasa en estos sistemas. Esta estrategia de operación consiste en la aplicación de dos períodos alternos diferenciados por la presencia de una fuente de carbono en el medio líquido disponible para los microorganismos (alimentación) o la ausencia de la misma (hambruna). Durante el período de alimentación, la fuente de carbono proporcionada es oxidada por los microorganismos presentes en el sistema y acumulada en las células en forma de compuestos intracelulares de reserva. Durante el periodo de hambruna, las células consumen las sustancias de reserva acumuladas para poder satisfacer así sus demandas energéticas (Suarez-Mendez et al., 2014). Debe destacar que los periodos de inanición en la fase líquida del biorreactor pueden conducir tanto al mantenimiento del cultivo como a cambios significativos en el número de células, composición de la comunidad y estado fisiológico (Konopka et al., 2002). En este sentido, estudios previos en biofiltros de tratamiento de tolueno, informaron de grandes pérdidas de biomasa durante periodos de hambruna que duraron entre 2 y 9 días, mientras que la tasa de respiración endógena disminuyó rápidamente (Cox y Deshusses, 2002; Métris et al., 2001). Específicamente, Cox & Deshusses, (2002), encontraron hasta un aumento de dos veces en las capacidades de eliminación de tolueno en comparación con los valores anteriores a la inanición, a pesar de la pérdida de 10 a 50% de la biomasa después de 7 días de hambruna. Además, Métris et al., (2001), demostró que las inaniciones de 3 días conducen a una disminución de la producción de CO₂ en un 12 % en comparación con los valores previos obtenidos en condiciones de estado estacionario, lo que indica que la tasa de respiración había disminuido durante los períodos de hambruna.

Otra de las limitaciones anteriormente mencionada y que dificulta la penetración en el mercado de las biotecnologías para el tratamiento de CH₄ es

el mito de su escasa robustez ante fluctuaciones o fallos operacionales (comunes a escala industrial). La robustez se puede definir como la habilidad de una tecnología para manejar las fluctuaciones del proceso y la capacidad de recuperarse después de alteraciones operacionales (Kraakman, 2003). A pesar de que varios estudios han demostrado la estabilidad dinámica y la capacidad de recuperación de los sistemas biológicos para el tratamiento de gases frente a fluctuaciones de proceso y fallos operacionales desde el punto de vista macroscópico (Estrada et al., 2012; Lebrero et al., 2010), los detractores de las biotecnologías continúan señalando su limitada robustez como una de las principales desventajas frente a los procesos físico-químicos. Se hace por tanto necesario, continuar investigando la robustez de las biotecnologías no sólo a escala de laboratorio sino también a escala industrial y a largo plazo (Muñoz et al., 2015) para facilitar su implementación en el mercado.

Entre los factores que influyen sobre la robustez de un sistema biológico, es decir, sobre su capacidad de respuesta ante los cambios, se incluyen la selección del material de empacado, el tipo de microorganismos (inoculo) a utilizar, el modo de inoculación, las características de solubilidad en agua de los contaminantes y el adecuado diseño y operación de los biorreactores (Muñoz et al., 2015). Sin embargo, en último término, la robustez de un sistema biológico esta intrínsecamente relacionada con la capacidad de los microorganismos que lo habitan para responder ante los cambios en su ambiente. Por tanto, el estudio de la microbiología del proceso es fundamental para garantizar la eliminación robusta y eficiente del gas contaminante.

En biorreactores para el tratamiento de corrientes diluidas de CH_4 , las bacterias metanótrofas son las responsables de la oxidación de CH_4 (Fig. 14) y de su transformación en compuestos de alto valor añadido. Las bacterias metanótrofas obtienen energía y sintetizan todos los compuestos orgánicos celulares a partir de CH_4 y de algunos otros precursores reducidos de un solo átomo de carbono (precursores C_1) (Dedysh y Dunfield, 2011). Estas bacterias se encuadran dentro del grupo de los metilótrofos, microorganismos que pueden crecer utilizando compuestos de carbono (uno o varios carbonos) que carecen de enlaces C-C. Sin embargo, no todos los microorganismos metilótrofos son metanótrofos, es decir, no todos son capaces de oxidar CH_4 . Las bacterias metanotróficas suelen requerir de manera estricta la disponibilidad de CH_4 para su crecimiento (metanótrofos obligados), aunque algunas son bacterias metanotróficas facultativas capaces de crecer con otros compuestos adicionales como el metanol, formato, formaldehído o metilaminas, acetato, piruvato, succinato, malato, etanol...) (Dedysh y Dunfield, 2011).

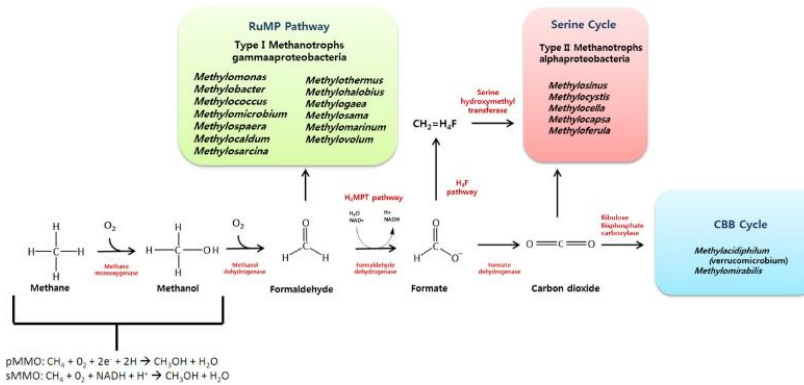


Figura 14. Esquema general de la oxidación de CH_4 por las bacterias metanotróficas (Hwang et al., 2014).

Las bacterias metanotróficas se encuentran muy extendidas en la naturaleza tanto en ambientes terrestres como acuáticos. Se trata de un grupo que exhibe diversas morfologías y que está relacionado tanto filogenéticamente como por su capacidad para oxidar CH_4 . Desde el punto de vista filogenético o evolutivo, estas bacterias se incluyen en su mayoría dentro de filo Proteobacteria. También existen bacterias metanótrofas dentro del filo Verrucomicrobia (Fig. 15) (Dedysh y Dunfield, 2011).

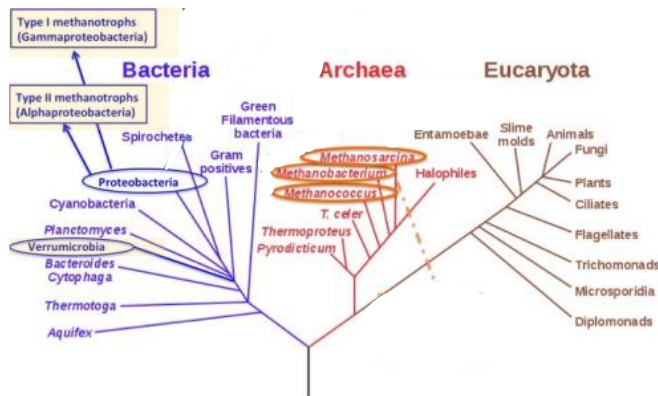


Figura 15. Árbol de la vida en el que se destacan los principales grupos de bacterias metanotróficas (letra azul con fondo amarillo).

Estas bacterias se dividieron inicialmente en tres grupos atendiendo a criterios morfológicos, fisiológicos (ruta para la asimilación del carbón), estructurales (disposición de la membrana celular) y quimiotaxonómicos (Knief, 2015). Así,

los **metanótrofos de Tipo I**, incluidos en la clase Gammaproteobacteria (Fig. 15), asimilan compuestos de un solo carbono a través del ciclo de la Ribulosa Monofosfato (Fig. 14). Poseen membranas citoplasmáticas internas en forma de discos abultados perpendiculares a la pared celular formadas por ácidos grasos de entre 14 y 16 carbonos (Fig. 16). Los géneros *Methylomonas*, *Methylochromium*, *Methylobacter* y *Methylococcus*, entre otros, pertenecen a este grupo (Fig. 14) (Bratina et al., 1992; Michael et al., 2012; Stein et al., 2012). Las **bacterias metanotróficas de Tipo II** pertenecen a la clase Alphaproteobacteria (Fig. 15), asimilan compuestos C_1 a través de la ruta de la serina (Fig. 14) y contienen ácidos grasos de 18 carbonos en su membrana citoplasmática (Hanson and Hanson, 1996; Scheutz et al., 2009), las cual se organiza formando “pilas” a lo largo de la periferia celular y de forma paralela a la pared celular (Fig. 16). Además son capaces de fijar N_2 (Hanson and Hanson, 1996). Los géneros más representativos de este grupo son *Methylosinus*, *Methylocystis* y *Methylocella* (Fig. 14). El tercer grupo de **bacterias metanotróficas, el Tipo X**, presenta características de ambos tipos (Tipo I y Tipo II). Utilizan la ruta de la Ribulosa Monofosfato y poseen ácidos grasos de membrana de 16 carbonos al igual que las bacterias metanotróficas de Tipo I, pero también son capaces de fijar el N_2 como las bacterias de Tipo II. Generalmente crecen en ambientes con temperaturas más elevadas que los metanótrofos de Tipo I y Tipo II. En este grupo se encuentran los géneros *Methylococcus* y *Methylocaldum*.

Los análisis filogenéticos basados en el uso del RNA ribosomal 16S como marcador evolutivo confirmaron la existencia de los grupos Tipo I y Tipo II, sin embargo, el grupo de metanótrofos de Tipo X se reclasificó como un subgrupo dentro de las bacterias metanotróficas de Tipo I (Gamaproteobacteria) en base a este criterio (Knief, 2015). En los últimos años, la aparición de nuevos metanótrofos con características que hacen difícil su inclusión en uno u otro grupo ha puesto en duda la validez de esta clasificación, por lo que se recomienda el uso de los términos Tipo I y Tipo II como sinónimos de los grupos filogenéticos Alfa- y Gammaproteobacteria (Fig. 15). Los metanótrofos incluidos en el filo Verrucomicrobia se conocen como metanótrofos Tipo III (Knief, 2015).

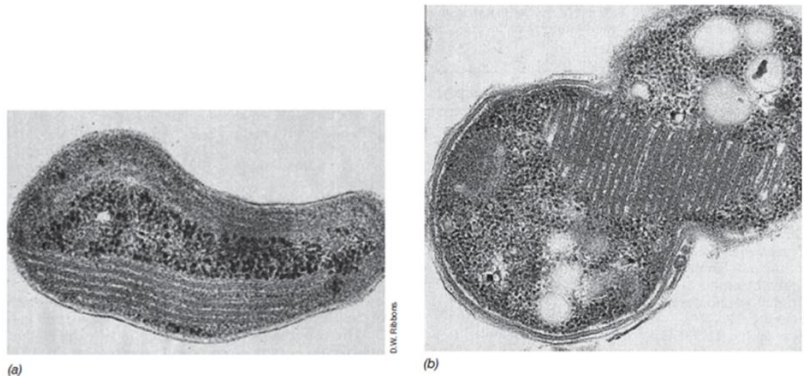


Figura 16. Bacterias metanotróficas. a) Micrografía electrónica de una célula de *Methylosinus*, que ilustra un sistema de membranas de tipo II. b) Micrografía electrónica de una célula de *Methylococcus capsulatus*, que ilustra un sistema de membranas de tipo I.

Conocer qué tipo de bacterias metanotróficas predominan en un ecosistema, así como las comunidades de microorganismos que conviven con ellas dentro del mismo (biodiversidad) es importante para entender el funcionamiento del mismo. Varios autores han demostrado la relación que existe entre la biodiversidad y/o sus componentes del ecosistema con el funcionamiento y estabilidad del mismo (Ho et al., 2011). Por tanto, es relevante conocer los cambios en la biodiversidad ante cambios en el ambiente de las comunidades microbianas.

La identificación de las bacterias metanotróficas, y de los microorganismos que cohabitan con ellas, se ha llevado a cabo en multitud de ambientes naturales (suelos, agua, sedimentos...) (Kizilova et al., 2013; Tavormina et al., 2010), sin embargo su estudio en biorreactores es escaso. En la mayoría de los casos, esta identificación se ha llevado a cabo mediante técnicas moleculares que usan el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S como marcador para determinar las relaciones evolutivas. Este gen está presente en todas las células (en los ribosomas) y presenta regiones conservadas y regiones variables que permiten conocer las relaciones evolutivas entre los microorganismos mediante comparación de la secuencia de este gen y, por tanto, permite identificar los microorganismos en un ecosistema. Las técnicas tradicionalmente empleadas para la identificación de microorganismos son el clonaje y la electroforesis de gradiente desnaturalizante, aunque hoy en día la secuenciación masiva está sustituyendo a estas técnicas debido a su bajo coste y mayor profundidad de análisis.

También se ha utilizado para la identificación de las bacterias metanotróficas en ambientes naturales y artificiales el gen que codifica para la enzima metano-monooxigenasa (MMO), que es la enzima que cataliza la conversión de CH₄ en metanol (primer paso en la ruta metabólica de oxidación del CH₄) (Fig. 17). Este gen se utiliza también para medir la actividad metanotrófica ante diferentes condiciones ambientales mediante la cuantificación de la expresión del mismo. Existen dos formas de esta enzima, una de ellas, presente en la mayoría de los metanótrofos, se localiza en la membrana plasmática de las células y se la conoce como metano-monooxigenasa particulada (pMMO). La otra MMO se localiza en el citoplasma celular y se encuentra presente sólo en algunas bacterias metanótrofas (metano-monooxigenasa soluble (sMMO)).

La pMMO está formada por 3 subunidades polipeptídicas: subunidad α (*pmoB*), subunidad β (*pmoA*) y subunidad γ (*pmoC*) (Semrau et al., 2010). Entre estas subunidades, **el gen que codifica para la subunidad β (gen *pmoA*) es el que más se ha utilizado como marcador molecular para el estudio de la actividad de las bacterias metanotróficas**, puesto que se encuentra en prácticamente todos los miembros de este grupo (Knief, 2015).

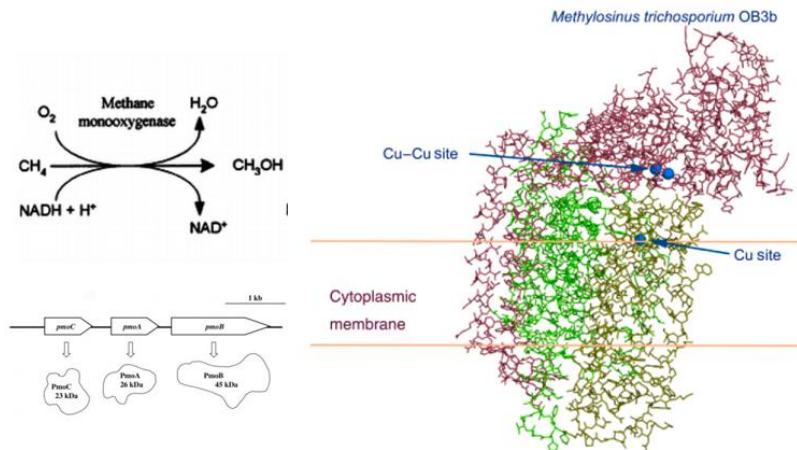


Figura 17. Estructura del operón que contiene los genes que codifican para las 3 subunidades de la pMMO y reacción catalizada por esta enzima (izquierda) (Hütsch, 2001; Murreil et al., 2000). Estructura y orientación de la pMMO de *Methylosinus trichosporium OB3b* (derecha); subunidad α: color granate, subunidad β: color verde, subunidad γ: color verde oliva (Semrau et al., 2010).

Cabe destacar que esta enzima posee una relación evolutiva estrecha con la enzima “amonio-monooxigenasa” (AMO) presente en las bacterias oxidadoras del amonio (“*ammonia-oxidizing bacteria*” (AOB)) y que cataliza el primer paso en la oxidación de NH₄⁺ a NO₃ (nitrificación) (Fig. 18). Las bacterias nitrificantes (organismos quimiolitotróficos) catalizan la oxidación aerobia del NH₄⁺ a

NO_3^- de manera secuencial: las AOB oxidan el NH_4^+ a NO_2^- y las NOB (bacterias oxidadoras del NO_2^- (“*nitrite oxidizing bacteria*”) oxidan el NO_2^- a NO_3^-). Debido a la similitud evolutiva y estructural de estas enzimas, los metanótrofos pueden oxidar el amonio (NH_4^+), y las AOB también pueden oxidar el CH_4 ; sin embargo, ninguno de los dos grupos puede crecer utilizando el sustrato del otro grupo como donador de electrones (Michael et al., 2012). Puesto que las bacterias metanotróficas pueden usar el NH_4^+ como nutriente, esto implica que **la fuente de nitrógeno y su concentración sean factores determinantes que influyen en la actividad metanotrófica, y que puede existir además una competición entre estas bacterias y las AOB por el NH_4^+ disponible** (Dam et al., 2014).

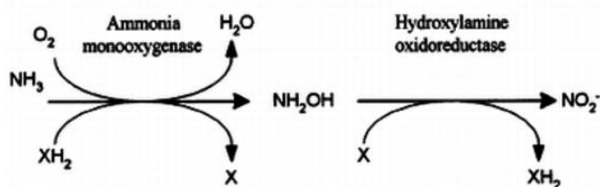


Figura 18. Oxidación del amonio por las bacterias oxidadoras del amonio (AOB) (Hütsch, 2001).

Como se ha comentado anteriormente, el gen *pmoA* es el más utilizado como indicador de la actividad de las bacterias metanotróficas. Los niveles de expresión de este gen ante diferentes condiciones (presencia de diferentes fuentes y concentración de nitrógeno, disponibilidad de cobre, condiciones de hambruna (ausencia de CH_4), etc.) (Dam et al., 2014; Kenney et al., 2016; Tavormina et al., 2017) se han estudiado mediante diferentes técnicas moleculares. La respuesta de este gen frente a la escasez o ausencia de CH_4 ha sido estudiada en algunos microorganismos concretos (Khadem et al., 2012; Tavormina et al., 2017), sin embargo, **existe una escasez de estudios que evalúen la expresión de este gen en sistemas biológicos complejos como lo son los biorreactores para el tratamiento de CH_4 , lo cual limita el avance en el desarrollo de esta biotecnología para su uso a escala industrial.**

El estudio de la expresión de este gen (número de copias) se ha llevado a cabo principalmente mediante la técnica de PCR Cuantitativa en Tiempo real (QPCR: “Quantitative Polymerase Chain Reaction”), que permite conocer de forma cuantitativa los niveles de expresión de un gen (número de copias de un gen). Esta técnica, copia y amplifica el “gen objetivo” de manera exponencial, duplicando el número de moléculas del gen en cada ciclo de amplificación hasta obtener billones de copias (Fig. 19).

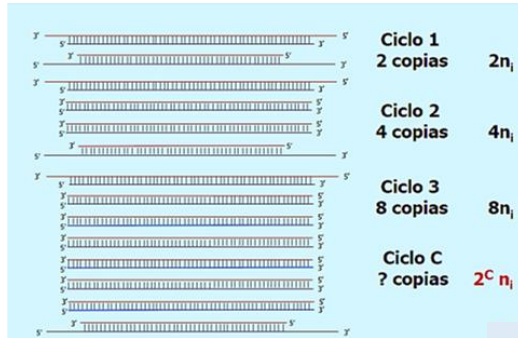


Figura 19. Aumento exponencial en el número de copias de un gen mediante la técnica de PCR.

Cada ciclo de amplificación consta de 3 fases diferentes (Fig. 20):

- Desnaturalización: la reacción se lleva a una temperatura de 94-96 °C durante unos segundos a minutos para que las dos cadenas de ADN se separen.
- Unión de los cebadores (“annealing”): los cebadores, encargados de iniciar el proceso de copia o ampliación, se unen a sus sitios específicos llevando la reacción a una temperatura de 40-70 °C.
- Extensión: La enzima Taq ADN polimerasa se encarga de copiar el gen de interés a partir de los cebadores usando el ADN original como molde.

Antes de que comiencen los ciclos de amplificación, se lleva la reacción a una temperatura de 90-94 °C unos segundos para que se desnaturalicen las dos hebras de ADN (fase de desnaturalización inicial). Al final de los ciclos de amplificación, la reacción se mantiene unos minutos a 72 °C para que terminen de extenderse/copiarse aquellos fragmentos que pudiesen haber quedado incompletos (fase de extensión final) (Fig. 20).

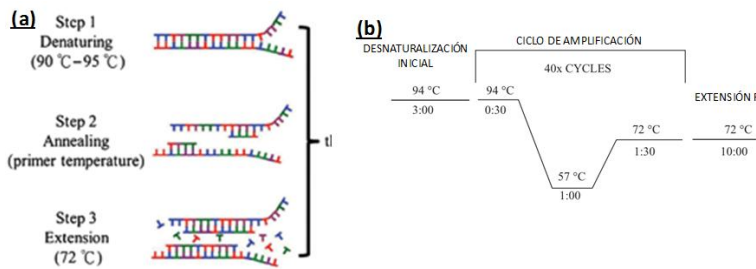


Figura 20. a) Fases de las que consta cada ciclo de amplificación en una reacción de PCR. EL número de ciclos comúnmente empleado varía entre 25 y 40. b) Programa completo a insertar en el equipo termociclador para llevar a cabo una reacción de PCR.

El ciclo de amplificación se repite varias veces, de manera que el aumento en el número de copias del gen se duplica en cada ciclo siguiendo una curva exponencial (Fig. 21). Gracias a la presencia de un fluoróforo que se añade a la reacción (el SYBR Green es el más comúnmente empleado) y que se une a las moléculas que se van generando, se puede monitorear la reacción a tiempo real mediante la medición de la fluorescencia en cada ciclo justo después de la fase exponencial, puesto que la fluorescencia crecerá en proporción directa al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generadas. El cambio en la fluorescencia a lo largo de la reacción se mide mediante un instrumento que combina los ciclos térmicos con capacidad de escaneo del colorante fluorescente (termociclador).

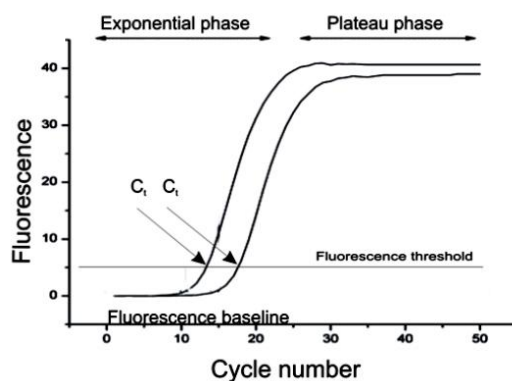


Figura 21. Curva exponencial en cada ciclo de amplificación en una QPCR.

Para el cálculo del número de copias del gen objetivo en la muestra inicial se utiliza el Ct (del inglés "threshold cycle"). El Ct es el ciclo de amplificación en el que la señal fluorescente atraviesa el umbral de fluorescencia, siendo este último la línea que representa en la gráfica el nivel por encima de la fluorescencia de fondo (Fig. 21). El valor del Ct está inversamente relacionado con la cantidad inicial de copias del gen presente en la muestra inicial, de manera que a mayor número de copias en la muestra el Ct será menor y a menor número de copias este será mayor. Usando el Ct, y haciendo uso de una recta de calibrado con cantidades (número de copias) conocidas del gen objetivo, se puede determinar experimentalmente el número de copias (o transcritos) del gen en la muestra (Fig. 22). A la hora de construir una curva standard para la cuantificación del número de copias de un gen han de tenerse en cuenta principalmente 3 parámetros esenciales (Fig. 22):

1. Eficiencia de la amplificación (E): indica el aumento en el número de copias en cada ciclo, el cual debería ser exponencial. La eficiencia de la reacción de PCR ha de presentar valores entre el 90 % y 110 %.
2. Pendiente de la curva: de manera ideal, la pendiente de la curva debería ser -3.32, que corresponde a un 100 % de eficiencia o lo que es lo mismo, a un aumento de dos veces el número de copias en cada ciclo.
3. Coefficiente de correlación lineal (R²): refleja la linealidad de la curva standard y debe presentar valores cercanos a 1 (0.97 a 1.0).

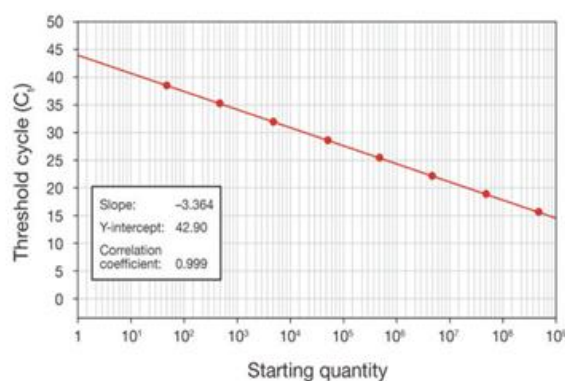


Figura 22. Recta de calibración con número de copias del gen de interés conocido.

Además de tener en cuenta todos estos parámetros, a la hora de realizar un experimento de QPCR, ha de optimizarse también el programa de PCR para que el ensayo sea específico, es decir, para que los cebadores que se incluyen en la reacción amplifiquen únicamente el gen diana y no otros genes que puedan existir en la muestra. Para conocer la especificidad del ensayo de PCR, después de los ciclos de amplificación, se programa en el termociclador un análisis de melting o de disociación del DNA con respecto al tiempo. Para ello, se aplica un gradiente de temperatura a la muestra ya amplificada, de manera que se comienza con una temperatura de aproximadamente 50 °C (donde los productos de PCR estarán en forma de doble hebra), y se irá aumentando dicha temperatura en cada ciclo, en intervalos de entre 1 a 10 °C (generalmente en intervalos de 5 °C), hasta alcanzar los 95 - 100 °C. A medida que la temperatura va aumentando, y los productos de PCR se van desnaturalizando, la fluorescencia que mide el equipo va cayendo, puesto que el fluoróforo se une exclusivamente a las moléculas de ADN de doble cadena. El punto en el que el 50 % de los productos de PCR están desnaturalizados se le conoce como punto de melting. Este punto de melting es específico y único de cada fragmento de ADN amplificado, puesto que las características de disociación/asociación del mismo dependen de la secuencia de bases del fragmento. Por tanto, la

aparición de varios picos en el análisis de melting (Fig. 23) puede ser indicativa de que la reacción no es específica (no amplifica única y exclusivamente el gen diana), en cuyo caso hay que optimizar el programa de PCR hasta conseguir un solo pico en este análisis.

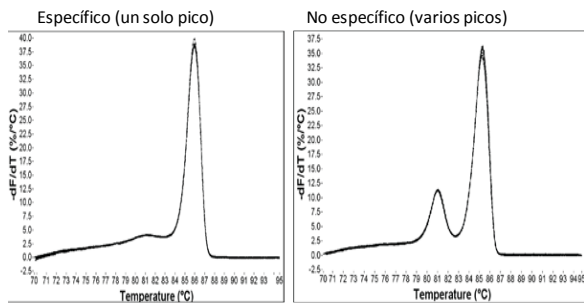


Figura 23. Ejemplo de reacción específica y no específica.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue **evaluar sistemáticamente la robustez de tres biorreactores que trataban CH₄ a bajas concentraciones (4-5% v/v), mediante el análisis de la expresión del gen que codifica para la enzima metano-monooxigenasa (*pmoA*), y la medición de parámetros físico-químicos (capacidades de eliminación (CE) de CH₄, tasas de producción de CO₂, etc.). Se realizó también el análisis de las comunidades microbianas presentes en los sistemas.** Se usaron tres biorreactores de tanque agitado (STRs). Uno de ellos fue operado en régimen continuo (R1), mientras que los otros 2 reactores (R2, R3), se operaron en régimen discontinuo y de forma alterna, aplicando ciclos de alimentación-hambruna de 5 días de duración (5 días con CH₄ y 5 días sin CH₄). R1 fue sometido también a un ciclo de alimentación-hambruna con el fin de comparar su capacidad de adaptación a estas condiciones con la de los reactores operados en discontinuo (R2 y R3).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Gases y reactivos químicos.

El CH₄ fue adquirido a Abelló Linde S.A. (Barcelona, España) con una pureza de al menos el 99.5 %. El resto de reactivos y productos químicos se adquirieron de Panreac® (Barcelona, España) con una pureza de al menos el 99%.

3.2. Inóculo y solución de nutrientes.

El inóculo de cada biorreactor consistió en biomasa metanotrófica/nitrificante procedente de biofiltros que trataban CH₄ a baja concentración (4 - 5 % v/v), operados bajo estrategias de alimentación/hambruna (inóculo de R2 y R3) o alimentación continua (inóculo de R1). Como fuente o solución de nutrientes se les suministró sobrenadante de centrífuga (centrado) procedente de digestión anaerobia de lodos mixtos (tasa de dilución (D) = 225 ml día⁻¹).

R1 fue operado bajo alimentación continua con CH₄, mientras que R2 y R3 fueron operados en régimen de alimentación/hambruna (5 días con CH₄ y 5 días sin CH₄) de forma alterna. Las concentraciones iniciales de sólidos suspendidos totales (SST) en los biorreactores R1, R2 y R3 fueron 8.9, 5.2 y 4.0 g L⁻¹ respectivamente.

El centrado utilizado como solución de nutrientes en los biorreactores se caracterizó por una baja fracción biodegradable o bajo contenido en materia orgánica, y una alta concentración de nutrientes (Posadas et al., 2016). Se obtuvo a partir de las centrifugas de lodos digeridos mixtos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Valladolid (Valladolid, España). El líquido de centrífuga se diluyó con agua destilada (proporción 1:2) para evitar la inhibición de los metanótrofos debido a las elevadas concentraciones de NH₄⁺, y luego se suplementó con SO₄²⁻ (solución madre de 90 g L⁻¹) para obtener una concentración final aproximada de 150 mg SO₄²⁻ L⁻¹. Los parámetros físico-químicos y la composición del centrado se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Parámetros físico-químicos del centrado diluido.

pH	COT (mg L ⁻¹)	CI (mg L ⁻¹)
7.7 ± 0.2	21.5 ± 8.5	154.6 ± 32.6

Tabla 5. Composición de iones del centrado diluido.

N - NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	N - NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	N - NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)
183.8 ± 17.6	14.9 ± 2.2	8.9 ± 10.6	2.9 ± 4.1

3.3. Configuración experimental y operación y seguimiento de los biorreactores en estado estacionario.

Se operaron tres biorreactores a escala de laboratorio, contruidos con columnas cilíndricas de metacrilato de 0.4 m de altura y 0.08 m de diámetro interno. Estos biorreactores fueron operados durante 189 días en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid (Valladolid, España). En este trabajo, se seleccionó el período desde el día 49 hasta el día 112 para evaluar el rendimiento de los sistemas en estado estacionario.

Los biorreactores fueron inoculados con las concentraciones de biomasa mencionadas anteriormente y sellados con una tapa de butilo en la parte superior de cada reactor. Los biorreactores se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 1 °C y con agitación magnética mediante una barra de agitación colocada en la parte inferior de cada columna (800 rpm) (Figs. 24 y A2.1).

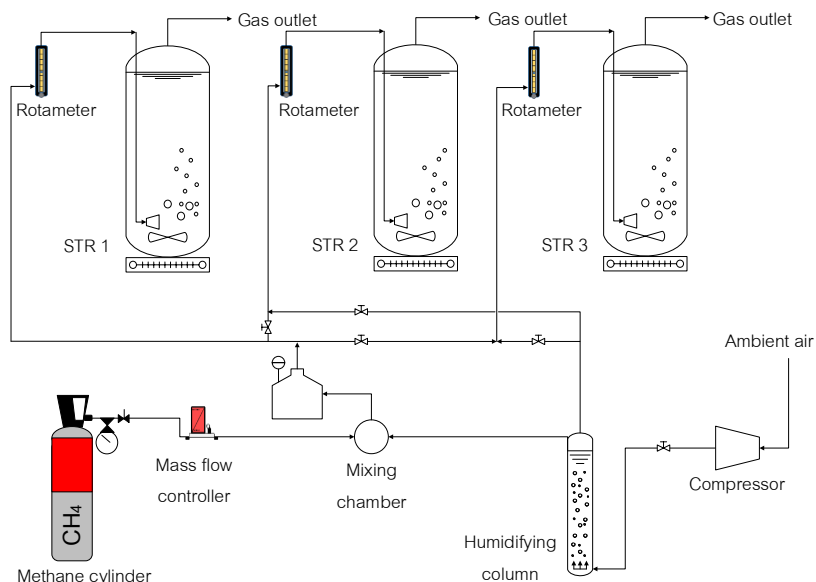


Figura 24. Configuración experimental de los reactores en este trabajo.

Para la alimentación de los reactores se utilizó una corriente de gas CH₄ mezclada con aire prehumidificado en una cámara de mezcla, y regulada mediante un controlador de flujo másico (Aalborg™, EE.UU.). El reactor R1, y los reactores R2 y R3 durante los ciclos de alimentación, se alimentaron con dicha corriente a un flujo de 0.008 m³ h⁻¹. Los reactores R2 y R3 durante los ciclos de hambruna fueron alimentados con una corriente de aire sin CH₄ a un flujo de 0.003 m³ h⁻¹ con el fin de mantener condiciones aerobias en el cultivo (Fig 24).

Durante el período estacionario evaluado, la carga de entrada de CH_4 introducida en todas las unidades en régimen de alimentación fue de $129.7 \pm 6.2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Dicha carga se controló mediante el uso de rotámetros (AalborgTM, EE.UU.). Como consecuencia, se obtuvieron unas concentraciones de metano a la entrada de los biorreactores de $48.0 \pm 2.3 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($\approx 4\text{-}5\% \text{ v / v}$), una humedad media de $93.7 \pm 11.9\%$ en la corriente de gas y un tiempo de residencia (a lecho vacío) de $17.2 \pm 0.0 \text{ min}$.

Cada ciclo de alimentación/hambruna en las unidades R2 y R3 duró 10 días, de tal forma que al final de los 5 días en los que estas unidades se operaban en ausencia de CH_4 (régimen de hambruna), se cambió a condiciones suplementadas con CH_4 durante otros 5 días (régimen de alimentación) y viceversa.

De manera regular, se midió la caída de presión, el caudal de entrada, la temperatura y la humedad de los tres biorreactores. En los reactores en régimen de alimentación con CH_4 , se tomaron medidas de las concentraciones de CH_4 y CO_2 a la entrada y salida de los sistemas los días 0, 1, 3 y 5 de cada ciclo, mediante cromatografía de gases con detector de conductividad térmica (GC-TCD) con un equipo Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, EE.UU.). Con la misma periodicidad en cada ciclo, y tras el análisis de gases, se llevó a cabo el intercambio de medio en los reactores y la medición de pH. Así, se extrajeron 200 ml de medio de cada reactor, se midió el pH, se centrifugó el medio eliminando posteriormente el sobrenadante, y la biomasa resultante previamente resuspendida con centrado diluido, se volvió a introducir en los sistemas. La devolución de la biomasa a los sistemas pretendía simular la edad de la biomasa en un biofiltro, para poder evaluar de la forma más realista posible la robustez de la biomasa.

Además, semanalmente, se utilizaron 100 ml de caldo de cultivo de cada uno de los sistemas así como centrado diluido para determinar la concentración de carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), amonio (NH_4^+) y aniones (NO_3^- , NO_2^-).

3.4. Análisis fisicoquímicos

Las concentraciones de CH_4 , CO_2 y O_2 se determinaron en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, EE.UU.) equipado con una columna CP-Molsieve 5A ($15 \text{ m} \times 0.53 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$) y una columna CP-PoraBOND Q ($25 \text{ m} \times 0.53 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$). Las temperaturas del horno, del 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. Las curvas de calibración para la medición de las concentraciones de CH₄ y CO₂ se muestran en el anexo 1 (Figs. A1.1 y A2.2).

Las muestras líquidas recuperadas de los STR se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min. A continuación, para la determinación de las concentraciones de TOC / IC / NT, se filtraron alícuotas de 40 ml a través de filtros de fibra de vidrio de 0.7 μm (Merck Millipore, EE.UU.) que se analizaron posteriormente en un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, Japón) acoplado con un módulo de NT de detección de quimioluminiscencia (TNM-1) (Shimadzu, Japón).

Las concentraciones de NO₃⁻ y NO₂⁻ en la fase líquida se determinaron por HPLC-IC de acuerdo con (Muñoz et al., 2013) . El pH del medio se midió con un medidor de pH Basic 20 (Crison, Barcelona, España). La determinación de la concentración de SST / SSV se realizó de acuerdo a la metodología establecida en el Standard Methods (APHA, 2005).

La temperatura y la humedad de la corriente de gas de entrada se determinaron usando un detector Testo 605-H1 (Testo AG, Alemania) conectado a la cámara de mezcla. La caída de presión fue controlada mediante un medidor de presión electrónico PN7300 (Ifm, Alemania).

3.5. Ecuaciones empleadas para el cálculo de los parámetros de seguimiento del rendimiento macroscópico

El rendimiento de los biorreactores se evaluó en términos de capacidad de eliminación de CH₄ (CE, g m⁻³ h⁻¹), tasa de producción de CO₂ (P_{CO₂}, g m⁻³ h⁻¹), tasa de producción máxima de CO₂ (P_{CO₂max}, g m⁻³ h⁻¹), eliminación de NH₄⁺ (ER_{N-NH₄⁺}, %), rendimiento de mineralización (Y_{CO₂}, %), y las concentraciones de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ (CN_{N-NO₂⁻}, CN_{N-NO₃⁻}, mg L⁻¹) y nitrógeno total eliminado (RE_{TN}, %) de acuerdo con las ecuaciones 2 a 9:

$$CE = \frac{(C_{CH_4}^{in} - C_{CH_4}^{out}) \cdot Q}{V_R} \quad (2)$$

$$P_{CO_2} = \frac{(C_{CO_2}^{out} - C_{CO_2}^{in}) \cdot Q}{V_R} \quad (3)$$

$$P_{CO_{2max}} = EC \cdot \alpha \quad (4)$$

$$ER_{N-NH_4^+} = \frac{(C_{N-NH_4^+}^{centrado} - C_{N-NH_4^+}^{reactor})}{C_{N-NH_4^+}^{centrado}} \cdot 100 \quad (5)$$

$$C_{N-NO_2^-} = C_{N-NO_2^-}^{\text{reactor}} - C_{N-NO_2^-}^{\text{centrado}} \quad (6)$$

$$C_{N-NO_3^-} = C_{N-NO_3^-}^{\text{reactor}} - C_{N-NO_3^-}^{\text{centrado}} \quad (7)$$

$$Y_{CO_2} = \frac{P_{CO_2max}}{EC} \cdot 100 \quad (8)$$

$$ER_{TN} = \frac{NT_{\text{centrado}} - NT_{\text{reactor}}}{NT_{\text{centrado}}} \cdot 100 \quad (9)$$

Dónde:

- $C_{CH_4}^{in}$ y $C_{CH_4}^{out}$ son las concentraciones de entrada y salida de CH_4 , respectivamente.
- NT_{reactor} y NT_{centrado} son las concentraciones de nitrógeno totales del reactor y centrado diluido, respectivamente.
- $C_{CO_2}^{out}$ y $C_{CO_2}^{in}$ son las concentraciones de entrada y salida de CO_2 .
- $C_{N-NH_4^+}^{\text{reactor}}$ y $C_{N-NH_4^+}^{\text{centrado}}$ son las concentraciones de $N-NH_4^+$ del reactor y del centrado diluido, respectivamente.
- $C_{N-NO_2^-}^{\text{reactor}}$ y $C_{N-NO_2^-}^{\text{centrado}}$ son las concentraciones de $N-NO_2^-$ del reactor y del centrado diluido, respectivamente.
- $C_{N-NO_3^-}^{\text{reactor}}$ y $C_{N-NO_3^-}^{\text{centrado}}$ y la concentración de $N-NO_3^-$ del reactor y del centrado diluido, respectivamente.
- α es la relación de peso molecular M_{CO_2} / M_{CH_4} (2,75) y representa la cantidad máxima de CO_2 que se puede producir oxidando todo el CH_4 a CO_2 si no se produce biomasa.
- V_R es el volumen de trabajo (m^3).
- Q es el flujo de gas ($m^3 h^{-1}$).

3.6. Evaluación sistemática de la robustez de los biorreactores frente a los ciclos de alimentación/hambruna

Con el fin de evaluar la capacidad de respuesta o robustez de los sistemas adaptados a los cambios de alimentación/hambruna (R2 y R3) establecidos como estrategia de control de la producción de sólidos, se analizó en detalle un ciclo de alimentación/hambruna (10 días) en cada sistema. Además, con el fin de comparar la capacidad de respuesta a estas condiciones entre los sistemas previamente adaptados a este régimen (R2 y R3) con la unidad R1 (operada en continuo ininterrumpidamente), se aplicó a esta última unidad un ciclo de alimentación/hambruna que se analizó de la misma manera que para los sistemas R2 y R3.

El análisis exhaustivo del ciclo de alimentación/hambruna en cada uno de los sistemas se realizó mediante el muestreo de biomasa para el análisis de la expresión del gen que codifica para la enzima metano-monooxigenasa (*pmoA*) mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Dichas muestras se tomaron a las 0.03, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 6.0, 12.0, 24.0, 72.0 y 120.0 horas (h) durante los períodos de alimentación y hambruna. Además, con la misma periodicidad (excepto para el tiempo 0.25 horas) se tomaron muestras de gas a la entrada y a la salida de los sistemas para determinar la concentración de CH₄ y CO₂ por GC-TCD, usando el procedimiento descrito en los apartados 3.3. y 3.4. (Fig. 25).

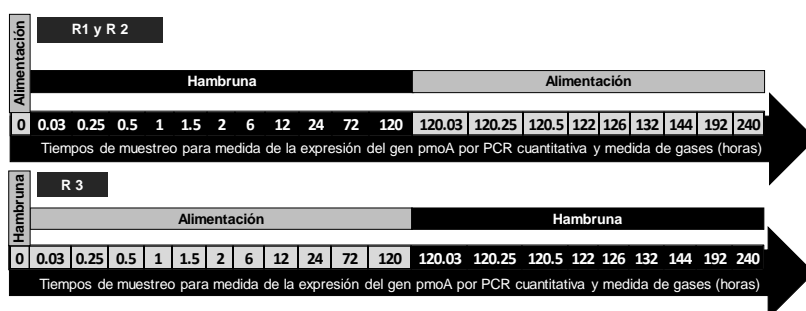


Figura 25. Detalle del experimento para la evaluación de la robustez de los biorreactores.

3.6.1. Toma de muestras para el análisis del gen de la *pmoA* por QPCR

Las muestras para el análisis de la expresión del gen *pmoA* (ADN y ARN) se alicuotaron en tubos libres de ADNasas y ARNasas y se congelaron inmediatamente a -80 °C con el fin de evitar la degradación de los ácidos nucleicos de las células.

3.6.2. Extracción de ADN de las muestras

Para la cuantificación del gen *pmoA* en las células es necesario extraer su ADN. Para ello, se utilizó el kit comercial Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante, aunque modificando algunos parámetros como el tiempo de rotura de las células durante la lisis y el tiempo de unión del ADN a la matriz de sílice para poder recuperar la mayor cantidad del ADN extraído tras la lisis celular. Básicamente la extracción de ADN consistió en un primer paso de lisis celular para liberar el ADN de las células seguido del tratamiento del lisado con detergentes y proteasas para eliminar restos de lípidos de las membranas celulares y proteínas. Posteriormente, el lisado se mezcló con una matriz de sílice a la que se une el ADN, que se recuperó mediante centrifugación y se lavó con solución de lavado para eliminar el resto de contaminantes y obtener un ADN purificado eluído en agua.

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.2 % m/v) (Fig. A3.4). La calidad y concentración del ADN purificado se evaluó mediante absorbancia en un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) (Fig. A3.3) El equipo NanoDrop mide la absorbancia de las moléculas de ADN (absorben a 260 nm) presentes en la muestra determinando así la concentración de ADN. Además, NanoDrop mide la absorbancia de la muestra a 280 nm, longitud de onda a la que absorben proteínas, compuestos fenólicos y otros compuestos, y a 230 nm, longitud de onda a la que absorben otro tipo de contaminantes (generalmente procedentes de los kits de extracción) que pudiesen estar presentes en la muestra. Con estas mediciones, se establecen dos indicadores de la calidad, el ratio 260/280, y el ratio 260/230 que se utilizan como indicadores de la pureza del ADN obtenido. Así el ratio 260/280 debe presentar valores entre 1.8 y 2.0 para el ADN puro. Si el ratio es menor, puede indicar contaminación por proteínas o compuestos fenólicos. El ratio 260/230 debe presentar valores en torno a 1.8. Si el ratio es menor puede indicar la presencia de otros contaminantes en la muestra.

3.6.3. Optimización de la extracción de ARN para el análisis de la expresión del gen *pmoA* por QPCR

Para evaluar la expresión del gen *pmoA* a lo largo de las condiciones alimentación/hambre en los biorreactores, el primer paso consistió en extraer el ARN total de las muestras tomadas. El ARN mensajero (ARNm) es la molécula que lleva la información sobre la secuencia de aminoácidos necesaria para formar la proteína (en este trabajo la metano-monooxigenasa) desde el ADN (lugar en el que está inscrita la secuencia) hasta los ribosomas (lugar donde se traduce la secuencia de nucleótidos que lleva el ARNm en aminoácidos formándose la proteína) (Fig 26).

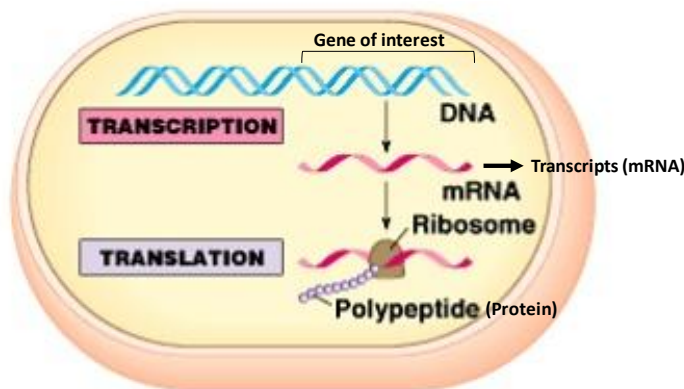


Figura 266. Proceso de síntesis de proteínas en una célula procariota.

El ARN de las muestras se extrajo usando el kit comercial RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), de acuerdo con el protocolo de extracción del fabricante, optimizando previamente el tiempo de rotura de las células durante el proceso de lisis mecánica en el equipo homogenizador mini-Bead-Beater (Biospec) (Fig. A3.1.).

Brevemente, la extracción del ARN consistió, primeramente, en la lisis mecánica de las células en un buffer desnaturante que inactiva inmediatamente las ARNasas para asegurar la obtención de un ARN intacto sin degradar. El lisado obtenido en este primer paso se pasó a través de una columna en la que quedó retenido el ADN presente en el mismo, de manera que se obtuvo un ARN purificado libre de ADN. Posteriormente, se añadió etanol en el lisado libre de ADN para generar las condiciones apropiadas para que el ARN se uniese a una columna de membrana por la que se hizo pasar el lisado. En esta columna, el ARN quedó retenido y, tras unos lavados con etanol para eliminar las sales procedentes de otros buffer utilizados durante la extracción, se eluyó el ARN mediante la adición de agua libre de ARNasas (Fig. 27).

Una vez obtenido el ARN, se llevó a cabo un tratamiento del mismo con ADNasa (Thermo Fisher Scientific) con el fin de evitar la presencia de ADN genómico en las muestras.

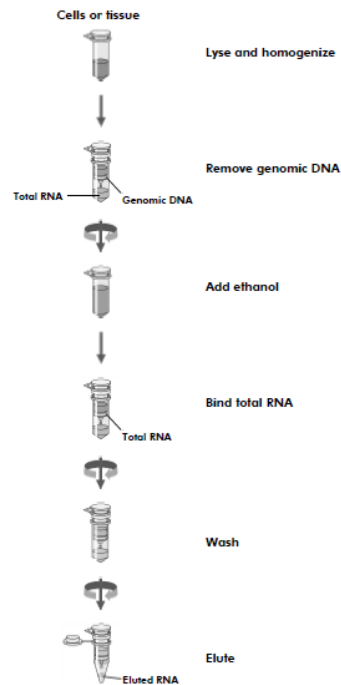


Figura 277. Procedimiento de extracción del ARN de las muestras de los biorreactores mediante el kit RNeasy Plus (Qiagen).

Posteriormente, se comprobó la calidad e integridad del ARN obtenido antes de continuar con los siguientes pasos del protocolo. La calidad del ARN, así como su concentración, se evaluó mediante espectrofotometría con un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Al igual que para el ADN, los ratios 260/280 y 260/230 indican la pureza del ARN obtenido. El ratio 260/280 debe presentar valores próximos a 2 para el ARN puro. Si el ratio es menor, puede indicar la contaminación por proteínas o compuestos fenólicos. El ratio 260/230 debe presentar valores en torno a 2. Si el ratio es menor puede indicar la presencia de otros contaminantes en la muestra.

Para la evaluación de la integridad del ARN se usó una estación de electroforesis capilar automatizada Experion (Bio-Rad) (Fig. A3.3). El bioanalizador Experion se basa en la movilidad electroforética del RNA a través de unos microcapilares rellenos de un gel separador. La muestra colocada en cada uno de estos microcapilares se impregna con un marcador fluorescente de manera que el ARN puede ser detectado y cuantificado a su paso por un detector. El sistema separa el ARN por peso molecular en función del tiempo

de arrastre. Los diferentes tamaños de las moléculas de ARN presentes en la muestra se observan en forma de picos que aparecen a diferentes tiempos gracias al fluorocromo incorporado. El electroferograma típico de un ARN íntegro, sin signos de degradación, implica la aparición de dos picos mayores, uno correspondiente al ARN ribosomal bacteriano 23S y otro correspondiente al ARN ribosomal bacteriano 16S cuyo ratio (16S/23S) ha de mostrar un valor cercano a 1.5 (Fig. 28). La integridad del ARN mensajero (transcritos) se evalúa en base a la calidad del ARN ribosomal.

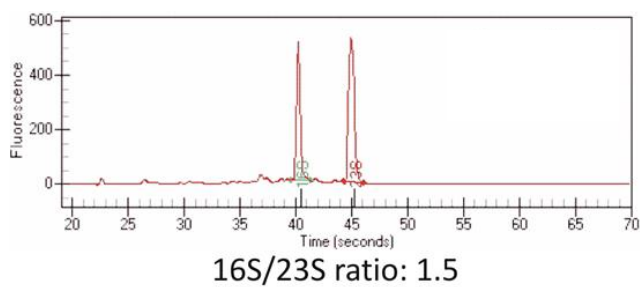


Figura 288. Electroferograma típico de un ARN íntegro (sin degradar) observado en un bioanalizador Experion. Se observan dos picos mayores correspondientes a los ARN ribosomales bacterianos 16S y 23S.

3.6.4. Reacción de transcripción reversa o retrotranscripción

Puesto que el ARN es una molécula inestable que se degrada fácilmente durante el manejo y con los cambios en las condiciones de temperatura, la técnica de QPCR no puede realizarse utilizando esta molécula. Es necesario, por tanto, transformar la secuencia de nucleótidos del ARNm en una secuencia complementaria de nucleótidos de ADN, lo que se conoce como ADN complementario (ADNc). A este proceso se le conoce como transcripción reversa o retrotranscripción (Fig 29).

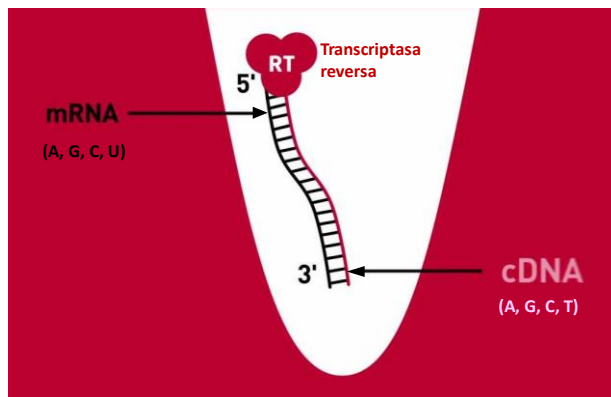


Figura 29. Reacción de transcripción reversa por la que la información contenida en el mRNA se transforma a DNAc.

Para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción se usó el kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). El kit contiene todos los componentes necesarios para transformar el RNAm en ADNc, entre ellos la enzima “transcriptasa reversa” (responsable de la retrotranscripción), inhibidores de RNAsas, los nucleótidos necesarios para formar el ADNc (A, C, G, T), magnesio y otras sustancias estabilizantes de la reacción.

Tabla 6. Reacción de retrotranscripción para la obtención de ADNc a partir de RNAm.

Componentes de la reacción	Volumen
iScript RT Supermix	4 μ l
RNA Total	(a) μ l
Agua libre de DNAsas y RNAsas	(b) μ l
Volumen total de la Reacción	20 μl

(a) Volumen necesario para una concentración final de 10 ng/ μ l

(b) Volumen necesario hasta completar el volúmen final (20 μ l)

Los microtubos en los que se preparó la reacción se introdujeron en el termociclador a las condiciones que se muestran en la Tabla 7 para que tuviese lugar la reacción.

Tabla 7. Condiciones de la reacción de transcripción reversa para la obtención de ADNc.

Componentes de la reacción	Tiempo	Temperatura
Preparación de la reacción	5 min	25 °C
Transcripción reversa	20 min	46 °C
Inactivación de la Transcriptasa Reversa	1 min	95 °C

3.6.5. Diseño y optimización del ensayo de QPCR para el análisis del gen *pmoA*
La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) permite evaluar la expresión de un gen de interés con un alto grado de resolución, sin embargo, cada ensayo de PCR cuantitativa debe ser optimizado para el gen diana con el fin de obtener resultados fiables. Parámetros como la temperatura de annealing (temperatura de unión de los cebadores), concentración de los cebadores o primers, el número de ciclos de amplificación necesarios, etc., deben ser determinados empíricamente. La optimización del ensayo de PCR cuantitativa consistió en los siguientes pasos:

1. Optimización de la especificidad del ensayo de QPCR.

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *pmoA* deben unirse única y exclusivamente a su secuencia complementaria y no a ninguna otra molécula de ADN o formar dímeros de primers (unión de los cebadores entre sí) (Fig. 30). Puesto que el fluorocromo (SYBR GREEN) que se añade a la reacción de PCR para detectar el incremento en el número de copias se une a cualquier ADN de doble cadena presente en la muestra, la formación de dímeros o la amplificación de secuencias inespecíficas implicaría falsos positivos o la sobreestimación de los resultados de expresión del gen.

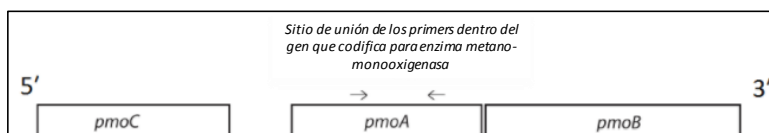


Figura 29. Localización del sitio de unión de los cebadores dentro del gen que codifica para la enzima metano-monooxigenasa.

Los cebadores A189F y mb661 (Auman et al., 2000; Holmes et al., 1995) fueron utilizados en este trabajo para amplificar el gen *pmoA* (Tabla 8).

Tabla 8. Primers o cebadores utilizados en este estudio para la amplificación del gen *pmoA* que codifica para la subunidad α de la enzima metano-monooxigenasa.

Gen	Par de cebadores	Secuencia de los cebadores	Tamaño del amplicón (pares de bases)
pmoA	A189F	5' GGNGACTGGGACTTCTGG 3'	501
	mb661	5' CCGMGCAACGTCYTTACC3'	

El primer paso para la optimización de la especificidad del ensayo consistió en realizar un **primer ensayo de QPCR** con muestras procedentes de los reactores, **aplicando un gradiente de temperatura en la fase de annealing de la PCR para determinar la temperatura óptima de unión de los cebadores a sus regiones complementarias** (Fig. 30). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con un volumen total de reacción de 20 μL por pocillo/reacción (Fig. 31). Las condiciones de la reacción se muestran en la Tabla 9.

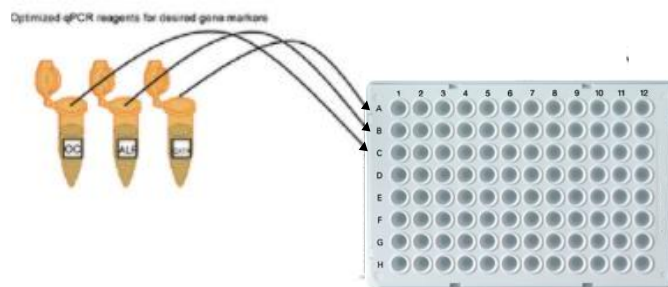


Figura 30. Las reacciones de PCR se prepararon en placas de 96 pocillos con un volumen final de 20 μL .

Tabla 9. Condiciones de la reacción de PCR cuantitativa para la determinación inicial de la especificidad del ensayo.

	Componentes de la reacción	Volumen	Concentración final de la mezcla
Mix^(a)	SYBR GREEN	10 μl	
Cebadores	A189 F	0.4 μl	0.2 μM
	mb661	0.4 μl	0.2 μM
	Agua de PCR	8.2 μl	
	ADN molde (ADNc)	1 μl	
Volumen total de reacción		20 μl	

^(a) El mix contiene el fluorocromo (SYBR GREEN) que se añade a la reacción para su monitorización en tiempo real así como la enzima responsable de la amplificación del ADN (Taq polimerasa), los nucleótidos (A, G, C, T) y otros compuestos estabilizadores de la reacción

Se utilizó inicialmente un programa de PCR modificado de Holmes et al. (1995), aplicando un gradiente de temperatura en la fase de annealing de 49 $^{\circ}\text{C}$ a 60 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 32).

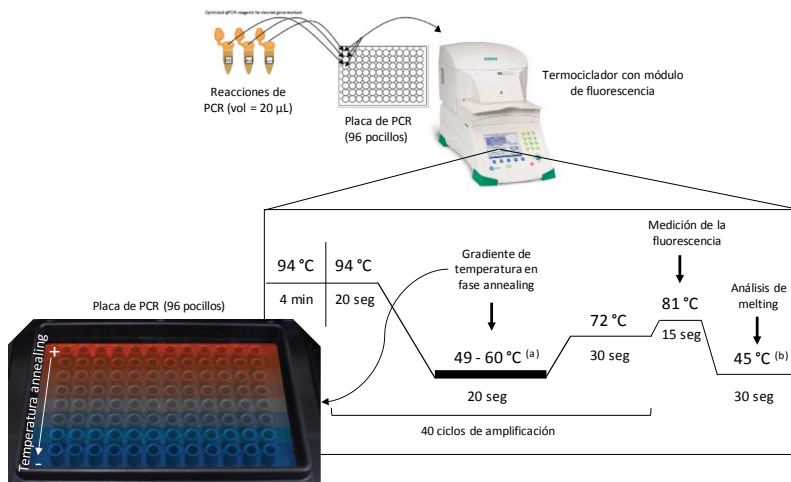


Figura 31. Programa de PCR utilizado inicialmente para la amplificación del gen *pmoA*. (a) Se realizó un gradiente de temperaturas de annealing con el fin de determinar la temperatura óptima de annealing para los primers utilizados. (b) El análisis de melting consistió en la aplicación de una rampa de temperatura de 45 a 95 °C con incrementos de 0.5 °C en cada ciclo.

La medición de la fluorescencia se programó para que fuese realizada después de cada ciclo de amplificación a una temperatura de 81 °C durante 15 segundos (Fig. 32). La aplicación del gradiente de temperatura permitió determinar la temperatura óptima de annealing que ofrecía el menor Ct (threshold cycle) (máxima amplificación) (Fig. 33) sin generar fragmentos inespecíficos (Fig. 34).

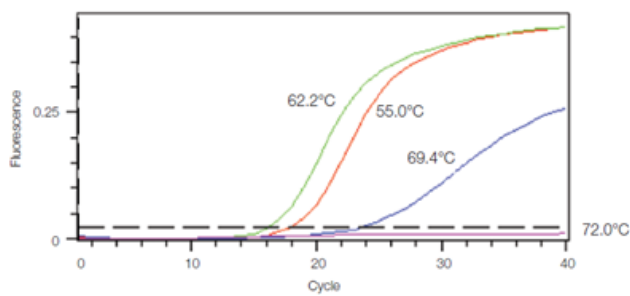


Figura 32. Ejemplo de optimización de la temperatura de annealing en un ensayo de PCR cuantitativa. Se aplicó en el ejemplo un gradiente de 55 a 72 °C. La reacción a 62.2 °C proporcionó el menor Ct y se eligió como temperatura óptima de annealing para este ensayo.

Para la evaluación de la especificidad del ensayo, tras el programa de PCR, se incluyó un programa de análisis de melting que consistió en la aplicación de una rampa de temperatura (de 45 a 95 °C) con incrementos de 0.5 °C (30 segundos de duración cada ciclo) y medición de la fluorescencia en cada ciclo (Fig. 32). Esto permitió establecer el punto en el que el 50% de las moléculas de ADN en la muestra se encontraban desnaturalizadas (punto de melting). En base a esto, la gráfica que genera el software y que representa las unidades relativas de fluorescencia (URF) tomadas durante el análisis de melting frente a la temperatura, debe mostrar un único pico de melting o de disociación del ADN. La presencia de varios picos implicaría indicios de amplificación inespecífica (Fig. 34).

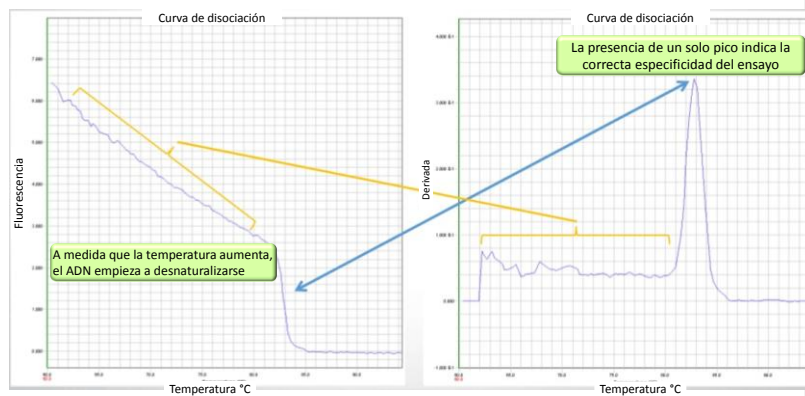


Figura 33. Ejemplo de un análisis de melting que confirma la especificidad del ensayo por la presencia de un solo pico de fluorescencia correspondiente al gen de interés.

Además del análisis de melting, la especificidad se comprobó también mediante electroforesis en gel de agarosa. En este caso, 4 μ L del producto de PCR obtenido se cargaron en un gel de agarosa (al 1.6 %) que se introdujo en una cubeta de electroforesis horizontal (Fig. A3.4). Se le aplicó una corriente de 85 voltios durante 50 minutos para provocar la migración de las moléculas de cADN en función de su tamaño a lo largo del gel. La introducción de un marcador de pesos moleculares (1Kb plus DNA ladder) (Thermo Fisher) permitió determinar el tamaño de los productos de PCR obtenidos. La presencia de más de una banda en el gel de agarosa es indicativa de la inespecificidad del ensayo (Fig. 35).

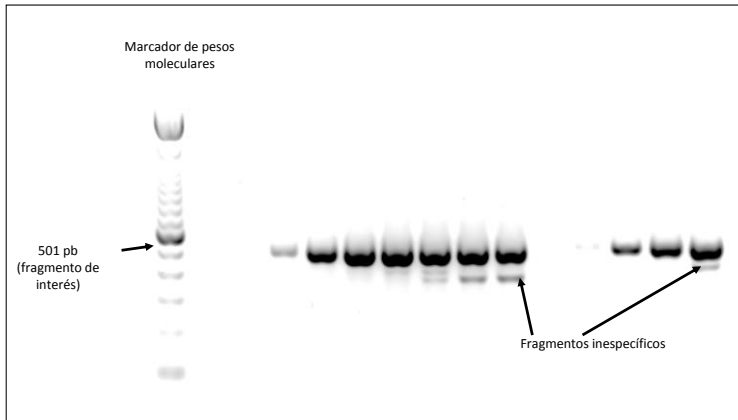


Figura 34. Evaluación de la especificidad de un ensayo de PCR cuantitativa mediante electroforesis en gel de agarosa.

Puesto que los resultados en cuanto a especificidad no fueron satisfactorios en este primer ensayo (incluso a las temperaturas de annealing elevadas que favorecen la unión de los cebadores a sus secuencias complementarias se observaba la presencia de un doble pico en el análisis de melting), se ejecutaron posteriormente 5 ensayos más en los que se modificaron varios parámetros de la PCR con el fin de mejorar la especificidad de los cebadores:

- Se disminuyó el tiempo de annealing de 20 a 15 segundos y se utilizaron temperaturas de annealing elevadas (59.4 – 63.5 °C). Ambos parámetros favorecen la unión de los cebadores a sus sitios específicos.
- Se disminuyó la concentración de cebadores (de 0.2 a 0.18 μM) en la reacción de PCR para disminuir la probabilidad de que se uniesen a regiones inespecíficas.
- Se probaron concentraciones de cebadores aún menores (0.15 y 0.1 μM) para disminuir la probabilidad de que se uniesen a regiones inespecíficas.
- Se probaron concentraciones no equimolares de los cebadores “forward” y “reverse” (0.15/0.18 μM ; 0.15/0.2 μM ; 0.15/0.25 μM ; 0.18/0.15 μM ; 0.18/0.2 μM ; 0.18/0.25 μM ; 0.2/0.15 μM ; 0.2/0.18 μM ; 0.2/0.25 μM ; 0.25/0.15 μM ; 0.25/0.18 μM ; 0.25/0.2 μM).

- Se disminuyó el número de ciclos de amplificación de 40 a 28 con el fin de disminuir la probabilidad de unión de los primers a sitios inespecíficos.

Debido a que se continuaba observando la presencia de un doble pico para las muestras de los reactores R2 y R3, **se decidió aplicar un programa de PCR “touchdown”**. La PCR “touchdown” es una variante de la PCR que consiste en realizar inicialmente varios ciclos de amplificación (entre 15 y 20) comenzando en el primero de ellos con una temperatura de annealing elevada (que favorece la especificidad de los primers) y disminuyendo en cada ciclo (por ejemplo, en intervalos de 0.5 °C) hasta alcanzar la temperatura de annealing óptima de los cebadores. Este método restringe la unión de los cebadores a sitios no específicos en los primeros ciclos de la PCR, que son los más críticos a la hora de producir el producto de PCR deseado (Korbie and Mattick, 2008). Tras estos primeros ciclos de amplificación más restrictivos, se aplican ya varios ciclos de amplificación (20 - 25 ciclos) a la temperatura de annealing óptima de los primers para terminar de amplificar el fragmento deseado.

Antes de conseguir optimizar la especificidad del ensayo, se llevaron a cabo 3 ensayos de PCR cuantitativa “touchdown” (Fig. A4.1), y al cuarto ensayo se consiguió que los cebadores amplificasen el gen *pmoA* de forma específica. Las Tablas 10 y 11 muestran las condiciones de la reacción de QPCR y el programa de PCR “touchdown” que fue utilizado para el análisis de la expresión del gen *pmoA* en las muestras tomadas durante el experimento.

Tabla 10. Condiciones de la QPCR finalmente utilizadas para el análisis de la expresión del gen *pmoA*.

	Componentes de la reacción	Volumen	Concentración final de la mezcla
Mix^(a)	SYBR GREEN	10 µl	
Cebadores	A189 F	0.5 µl	0.25 µM
	mb661	0.5 µl	0.25 µM
	Agua de PCR	8 µl	
	ADN molde (ADNc)	1 µl	
Volumen total de reacción		20 µl	

^(a) El mix contiene el fluorocromo (SYBR GREEN) que se añade a la reacción para su monitorización en tiempo real así como la enzima responsable de la amplificación del ADN (Taq polimerasa), los nucleótidos (A, G, C, T) y otros compuestos estabilizadores de la reacción

Tabla 11. Programa de PCR "touchdown" utilizado para el análisis de la expresión del gen *pmoA*.

Fase 1			
Repeticiones	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min.
	Desnaturalización	94 °C	20 seg.
10	Annealing ^(a)	69 °C	15 seg.
	Extensión	72 °C	30 seg.
<i>(a) La temperatura annealing fue disminuyendo 0.5 °C cada dos ciclos de modo que en los últimos ciclos de temperatura fue de 67 °C</i>			
Fase 2			
5	Desnaturalización	94 °C	20 seg.
	Annealing ^(b)	64 °C	15 seg.
	Extensión	72 °C	30 seg.
<i>(b) La temperatura annealing fue disminuyendo 3 °C cada dos ciclos de modo que en los últimos ciclos de temperatura fue de 52 °C</i>			
Fase 3			
25	Desnaturalización	94 °C	20 seg.
	Annealing ^(c)	54.5 °C	15 seg.
	Extensión	72 °C	30 seg.
<i>(c) Se mantuvo la temperatura de annealing a 54.5 °C a lo largo de esta fase para terminar de amplificar el producto de PCR.</i>			

2. Determinación de la eficiencia (E) y linealidad (R²) del ensayo mediante la construcción de una curva estándar.

Puesto que la cuantificación en un ensayo de PCR cuantitativa se basa en la relación entre el número de copias iniciales del gen y el Ct obtenido durante la amplificación, es necesario **optimizar el ensayo** para que la **cuantificación** sea **precisa y reproducible**. Para ello, se construyó una curva estándar utilizando diluciones seriadas del gen de la *pmoA* de concentración conocida (Fig. 36).

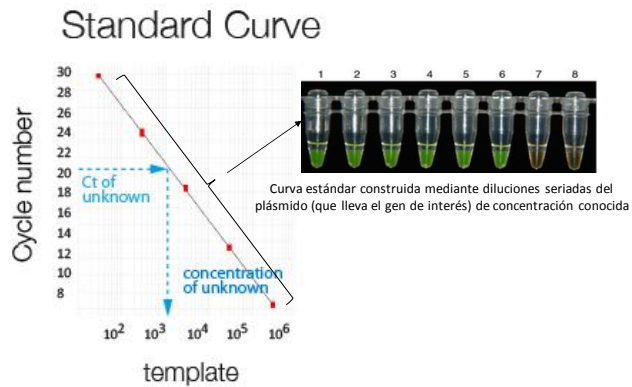


Figura 35. El número de copias en una muestra problema se determina extrapolando su Ct a una curva estándar previamente construida.

De forma general, las características de la curva estándar que indican que un ensayo de PCR cuantitativa está optimizado son:

- **Linealidad y consistencia entre réplicas:** el valor de R^2 de la curva de regresión lineal debe ser > 0.980 . Representa como se ajustan los valores experimentales a la curva de regresión. La linealidad de la curva ofrece también una medida de la variabilidad del ensayo entre réplicas (generalmente se usan entre 2 y 3 réplicas). Si existen diferencias significativas en los valores de Ct de las réplicas, el valor de R^2 disminuirá (Fig. 37).
- **Eficiencia de amplificación (E).** La eficiencia de amplificación se calcula a partir de la pendiente de la curva usando la fórmula:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Idealmente, la cantidad de producto de PCR debe ser el doble en cada ciclo de amplificación, lo que se traduce en una eficiencia de 2. Sustituyendo E en la ecuación mencionada, implica que la pendiente óptima de la curva debería ser -3.32, que coincide con el número de ciclos que deben ser observados entre los Ct de cada curva de amplificación (curvas de amplificación espaciadas de modo uniforme). La E de la reacción se representa generalmente como porcentaje y para ello se utiliza la fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia} = (E - 1) * 100 \%$$

El valor ideal de E en porcentaje es 100% y no debe ser menor del 90% (Fig. 37).

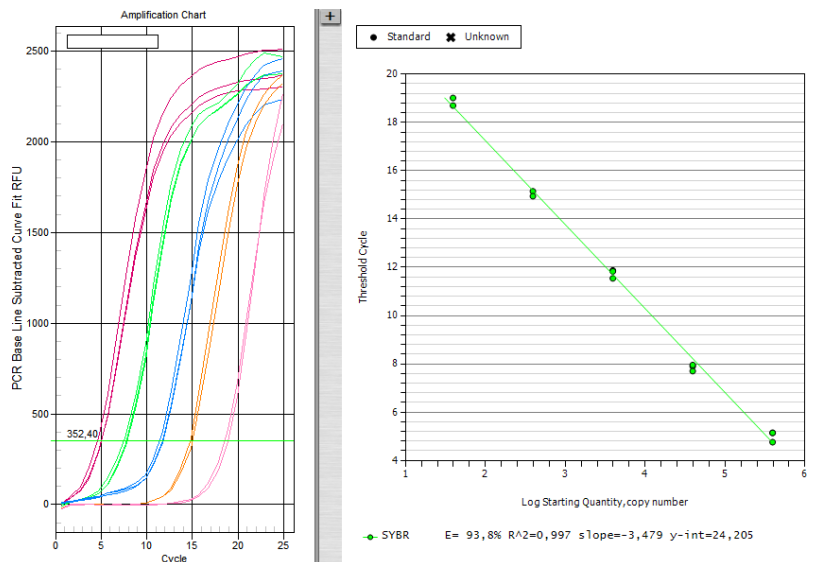


Figura 36. Curva estándar construida cuyos valores de eficiencia y linealidad deben estar dentro de unos rangos establecidos.

Para construir la curva estándar se utilizó la técnica de clonación. La Fig. 38 muestra un esquema global del proceso de construcción y evaluación de la curva estándar. Primero, a partir de una muestra con bacterias metanótrofas, se amplificó el gen *pmoA* mediante PCR convencional y se comprobó la presencia del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa. El fragmento amplificado se unió a un plásmido (molécula de ADN circular capaz de replicarse y transmitirse entre bacterias de forma independiente al ADN cromosómico de la célula), y después, se introdujo dentro de células competentes TOP10 de *Escherichia coli*, de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher). Las células resultantes después de la introducción del plásmido con el gen de la *pmoA* se crecieron en placas con medio LB con el antibiótico kanamicina con el fin de determinar aquellas células que verdaderamente habían adquirido el plásmido con el gen. Sólo las bacterias de *E. coli* que llevan el plásmido son resistentes al antibiótico, ya que el plásmido lleva un gen de resistencia, y por tanto éstas bacterias si crecen en la placa. Además, el plásmido lleva el gen *lacZ*, que cuando se expresa, hidroliza el X-gal (un

compuesto orgánico indicador añadido en el medio de cultivo) generando colonias de color azul. Sin embargo, cuando el plásmido lleva unido el gen de interés (inserto), éste interrumpe la expresión del gen *lacZ* y por tanto las colonias aparecen en la placa de color blanco. Esto permite distinguir en la placa las colonias/clones positivos que llevan el plásmido con el fragmento de interés de aquellas que sólo han incorporado el plásmido sin el fragmento.

Se seleccionaron 7 clones positivos y la presencia del inserto (*pmoA*) en los clones se comprobó además mediante PCR usando primers que amplificaban la región M13 del plásmido dentro de la cual se sitúa el inserto (según protocolo del Kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher)). Además, para comprobar que la secuencia del gen *pmoA* insertada en cada clon era correcta, se realizó una extracción del plásmido mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) y se mandó al servicio de secuenciación (SECUGEN S.L.).

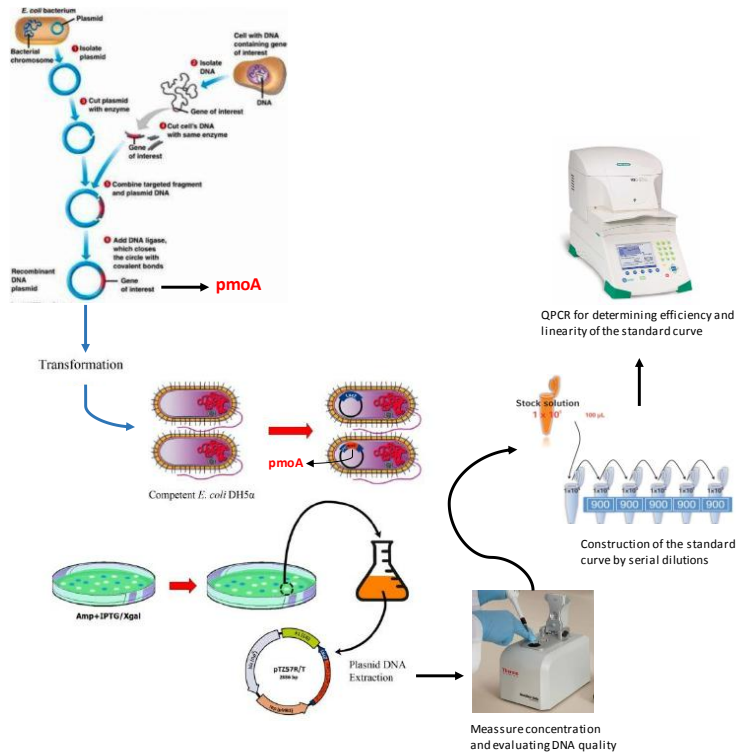


Figura 37. Esquema del proceso de construcción de la curva estándar para la cuantificación de la expresión del gen *pmoA*.

Para construir la curva estándar se seleccionó uno de los clones y se llevó a cabo la extracción del plásmido con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). La concentración del ADN plasmídico extraído se midió en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). A partir de la concentración, se hizo el cálculo del número de copias ($\text{copias } \mu\text{L}^{-1}$) del gen *pmoA* según la fórmula:

$$pmoA \left(\frac{\text{copias}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{pmoA \text{ concentración } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) \cdot 6 \cdot 10^{23} \left(\frac{\text{copias}}{\text{mol}} \right)}{\text{tamaño del plásmido} + \text{inserto (pb)} \cdot 660 \left(\frac{\text{g ADN}}{\text{mol}} \right)} \quad (10)$$

Donde:

- *pmoA* concentración (g mL^{-1}) es la concentración del DNA plasmídico medida en el equipo NanoDrop.

- $6 \cdot 10^{23}$ (copias μL^{-1}) es el número de Avogadro (número de moléculas en un mol de sustancia).
- Tamaño del plásmido + inserto es 3956 pb + 501 pb.
- 660 g ADN mol^{-1} es masa molecular media de un par de bases de ADN de doble hebra.

Tras el cálculo del número de copias, se construyó la curva estándar haciendo diluciones seriadas 1:10 del plásmido abarcando el rango de 10^1 copias μL^{-1} a 10^5 copias μL^{-1} del gen *pmoA*. La curva estándar (cada dilución por triplicado) se corrió en un ensayo de PCR con el programa de PCR “touchdown” optimizado. El software genera una gráfica que representa el ajuste de los datos a la recta de regresión y calcula los parámetros de eficiencia E, R^2 y pendiente de la recta. El ensayo se dio por optimizado cuando los valores se encontraron dentro de los rangos mencionados en este apartado.

3.6.6. Cuantificación del gen *pmoA* en las muestras problema por PCR Cuantitativa en Tiempo Real

Una vez optimizado el ensayo en cuanto a especificidad, linealidad y eficiencia de amplificación, las muestras problema se corrieron por triplicado en el termociclador con el programa optimizado de PCR “touchdown”. La cantidad de transcritos de *pmoA* en cada muestra se obtuvo mediante la extrapolación del Ct (valor medio) en la curva estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Rendimiento de los reactores en estado estacionario

4.1.1. Rendimiento de la eliminación de CH₄ y NH₄⁺ en los biorreactores

Los tres biorreactores se operaron un total de 188 días. Se seleccionó un periodo de 63 días (del día 49 al día 112 de operación) para describir el funcionamiento de los sistemas en estado estacionario. Las Tablas 12 y 13 muestran los valores medios de los principales parámetros operacionales (carga de entrada de CH₄, NT, N-NH₄⁺, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ de la solución de nutrientes, etc.) aplicados a los sistemas durante este período.

Tabla 12. Condiciones operacionales aplicadas a los biorreactores en este estudio.

REACTORES	Corriente de entrada	
	Carga de entrada CH ₄ (g m ⁻³ h ⁻¹)	Concentración CH ₄ (g m ⁻³)
R1	125.9 ± 6.3	48.4 ± 2.5
R2	133.8 ± 6.5	48.9 ± 2.3
R3	129 ± 5.6	47.2 ± 1.9

Tabla 13. Parámetros operacionales de los tres sistemas.

REACTORES	Parámetros del sistema				
	EBRT (min)	pH	Temperatura (°C)	Humedad (%)	O ₂ (*) (mg L ⁻¹)
R1	17.7 ± 0.0	4.8 ± 0.4	24.6 ± 0.7	92.9 ± 12.6	6.7 ± 2.0
R2	17 ± 0.0	4.6 ± 0.1	24.8 ± 0.9	92.6 ± 12.7	6.2 ± 2.2
R3	17 ± 0.0	4.4 ± 0.9	24.9 ± 0.7	95.5 ± 10.4	6 ± 0.8

(*) Mediciones puntuales de O₂

Tabla 14. Concentración media del centrado diluido usado como fuentes de nutrientes.

Solución de nutrientes			
NT (mg L ⁻¹)	N - NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	N - NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	N - NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)
181.6 ± 15.0	183.8 ± 17.6	8.9 ± 10.6	2.8 ± 4.1
COT (mg L ⁻¹)	Cl (mg L ⁻¹)	pH	
21.5 ± 8.5	154.6 ± 32.5	7.7 ± 0.2	

Durante esta etapa, los valores de eliminación de CH₄ fueron de 11.3 ± 3.7 g m⁻³h⁻¹; 11.7 ± 4.7 g m⁻³h⁻¹ y 13.7 ± 4.0 g m⁻³h⁻¹ para las unidades R1, R2 y R3, respectivamente, por lo que **no hubo grandes diferencias en cuanto a eliminación de CH₄ entre los sistemas operados en feast-famine y el operado en continuo**. La evolución temporal de la CE de CH₄ y de la carga de entrada en cada uno de los reactores durante la etapa estacionaria se muestra en la Fig. 39.

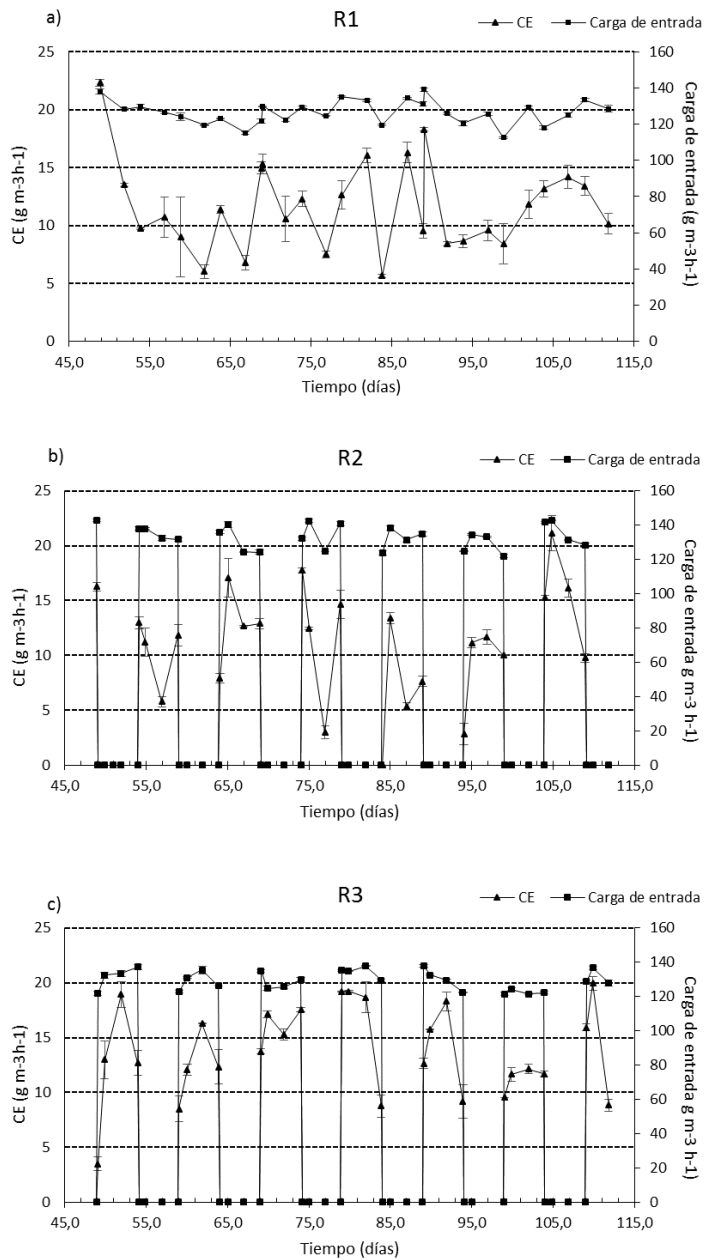


Figura 38. Evolución de CE_{CH_4} y de la carga de entrada con el tiempo en a) R1, b) R2 y c) R3.

Los valores de CE observados son inferiores a los reportados por Nikiema et al. (2009) en un biofiltro con relleno inorgánico (tiempo de residencia = 4.3 min.) utilizando una carga de entrada de CH_4 de $95 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una concentración de nitrógeno (en forma de NaNO_3) de 0.75 g L^{-1} ($\text{CE} = 36 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, a concentraciones de nitrógeno similares a las de este trabajo ($\approx 0.15 \text{ g L}^{-1}$) y carga de entrada de $95 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, las CE observadas por estos autores fueron ligeramente inferiores a las de este trabajo fin de grado ($8 - 9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) (Fig. 40). Estos autores observaron que, para cargas elevadas ($95 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), al aumentar la concentración de nitrógeno en la solución nutritiva, aumentaba la CE, hasta alcanzar una concentración de nitrógeno “óptima”. A concentraciones de nitrógeno superiores al “óptimo”, observaron inhibición causada por el exceso de nitrógeno, y por tanto una disminución en las CE del biofiltro. A cargas más bajas, el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la CE se ve más atenuado (Fig. 40). En otro trabajo reciente, se observó una CE de CH_4 máxima de $45 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ para una carga de entrada de $87 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en un biofiltro utilizando una solución de nutrientes con una concentración de nitrógeno de 3 g L^{-1} (en forma de NaNO_3) (Ferdowsi et al., 2016). López et al., 2016, y Veillette et al., 2012, evaluaron el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en forma de NH_4^+ y NO_3^- , respectivamente, sobre la CE. Los primeros autores observaron que para concentraciones de nitrógeno entre 0.05 y $0.5 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ y cargas de entrada de $10 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, la eficiencia de eliminación de CH_4 (%) disminuyó a medida que aumentaba la concentración de nitrógeno en la solución de nutrientes de 68% ($0.005 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) a 11.8% ($0.5 \text{ g N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) en un biofiltro con relleno de material inorgánico. Los segundos autores evaluaron el efecto de las concentraciones de nitrógeno de $5\text{-}70 \text{ g N m}^{-3}$ sobre la CE de CH_4 en sistemas de tanque agitado, y observaron las mayores CE a las menores concentraciones de nitrógeno proporcionadas (5 g N m^{-3}).

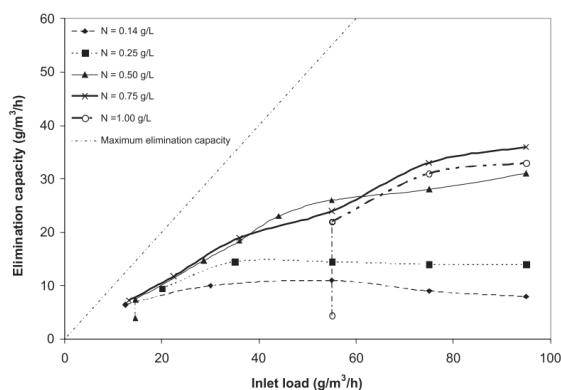


Figura 39. Influencia de la concentración de nitrógeno y la carga de entrada de CH_4 sobre la CE en un biofiltro con relleno inorgánico (Nikiema, 2009).

Como puede observarse en estos y otros trabajos (Nikiema, 2009), el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la actividad de las bacterias metanotróficas y por tanto sobre la CE en sistemas de tratamiento de CH_4 es de especial relevancia para su óptimo rendimiento. Este efecto ha sido estudiado también en ecosistemas naturales, principalmente suelos sometidos al uso de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, los resultados obtenidos tanto en sistemas artificiales como naturales resultan en muchos casos complicados de entender y contradictorios.

Por un lado, el hecho de que las enzimas metano-monooxigenasa y amonio-monooxigenasa sean evolutivamente similares hace que el amonio pueda actuar como inhibidor competitivo de la metano-monooxigenasa y a la inversa (Zheng et al., 2014). Esto implica que **durante la biofiltración de CH_4 en presencia de NH_4^+ , parte de la actividad metanotrófica puede desviarse hacia la oxidación de NH_4^+ , provocando una disminución en las CE de CH_4** . Novikov & Stepanov, 2002 observaron que entre el 12-28 % de la población metanotrófica en diferentes tipos de suelos estaba implicada en el proceso de nitrificación en lugar de en la oxidación de CH_4 . Sin embargo, el amonio actúa también como nutriente esencial durante el crecimiento de las bacterias metanotróficas, y por tanto, su actividad podría verse limitada por las bajas concentraciones de este compuesto.

Los datos obtenidos a partir de las mediciones de nitrógeno en este trabajo se muestran en Tabla 15:

Tabla 15. Valores medios de eliminación de nitrógeno total (%) y de amonio (%) para los tres reactores durante la etapa estacionaria.

REACTORES	ER NT (%)	ER N - NH_4^+ (%)	N - NO_3^- (mg L^{-1})		N - NO_2^- (mg L^{-1})	
			entrada	salida	entrada	salida
R1	37.7 ± 8.2	77.6 ± 4.7	8.9 ± 10.7	72.0 ± 12.5	2.9 ± 4.1	0.0 ± 0.0
R2	14.3 ± 5.3	66.7 ± 1.8	8.9 ± 10.7	101.4 ± 10.1	2.9 ± 4.1	0.0 ± 0.0
R3	6.9 ± 21.1	65.3 ± 21.1	8.9 ± 10.7	98.5 ± 6.1	2.9 ± 4.1	0.0 ± 0.0

El reactor R1 (en continuo) presentó mayores eficiencias de eliminación en cuanto a nitrógeno total (NT) y NH_4^+ que los reactores R2 y R3 bajo condiciones cíclicas de alimentación-hambruna (Tabla 15). Por otro lado, **se observó que el NO_3^- era el producto principal del proceso de la nitrificación del NH_4^+ , mientras que no se observó la acumulación de NO_2^- durante el funcionamiento de los biorreactores** (Tabla 15; Fig. 41; Fig 42; Fig 43). La elevada concentración de oxígeno disuelto, junto con las altas concentraciones de amonio y temperaturas por debajo de los 28 °C explican la mayor actividad de las comunidades NOB.

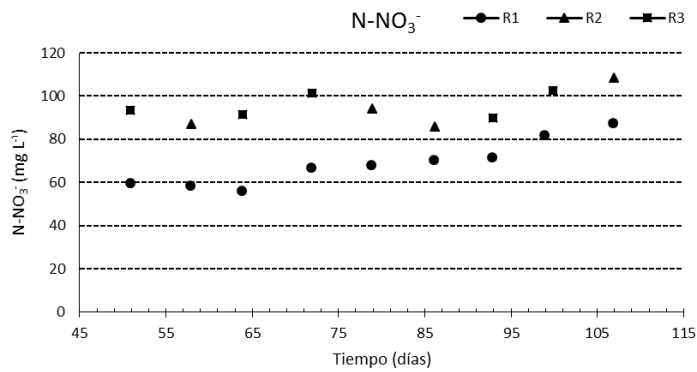


Figura 40. Evolución de la acumulación de N-NO₃⁻ en los tres biorreactores.

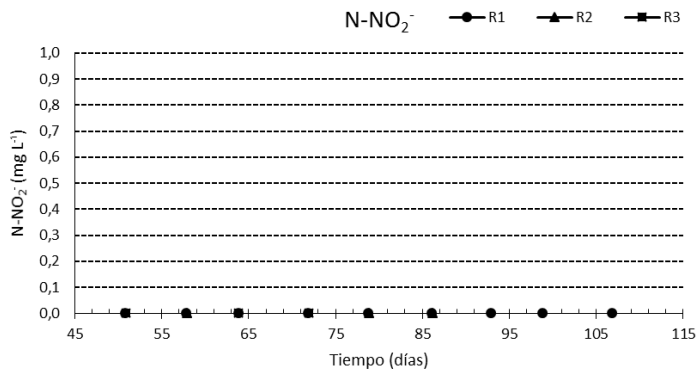


Figura 41. Evolución de la acumulación de N-NO₂⁻ en los tres biorreactores.

Las diferencias en cuanto a eliminación de NH₄⁺ o NKT entre la unidad R1 y las unidades R2 y R3 pueden estar relacionadas con la proporción del metabolismo que está siendo desviado hacia la nitrificación en las bacterias metanotróficas. Así, en la unidad R1 esta proporción podría ser mayor que las unidades que operaban en discontinuo debido al hecho de que éstas últimas están sometidas a períodos de hambruna en los que la asimilación de NH₄⁺ como nutriente podría verse limitada. El análisis de diversidad de los microorganismos presentes en los bioreactores en estado estacionario mostró también ligeras diferencias en cuanto a la cantidad de bacterias metanotróficas observadas en los sistemas, presentando el reactor R1 un 16 % de bacterias metanotróficas (con respecto al total de bacterias) en

Commented [rMT1]: Sin decimales en los números de los ejes

comparación con un 12 % y 7 % en las unidades R2 y R3, respectivamente (principalmente metanótrofos tipo II del género *Methylocystis* en las tres unidades) (Figs. A5.1., A5.2. y A5.3.). La cantidad superior de estos microorganismos observada en la unidad R1 también podría explicar las mejores eficiencias de eliminación de NH_4^+ / NKT en esta unidad. No puede atribuirse sin embargo, a una mayor cantidad de bacterias oxidadoras del amonio, puesto que éstas se encontraron en porcentajes de abundancia similares en las tres unidades (0.07 % en R1, 0.5 % en R2, 0.1 % en R3) (Figs. A5.4., A5.5. y A5.6.).

Por otro lado, la unidad R1 presentó una acumulación de NO_3^- ligeramente inferior a la observada en las unidades R2 y R3 y a su vez, una mayor pérdida de nitrógeno que las unidades operadas en discontinuo (Tabla 15). En las tres unidades se observaron microorganismos con capacidad desnitrificante (*Thauera*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Thermomonas*,...). Aunque las elevadas concentraciones de oxígeno y la escasa presencia de materia orgánica en los sistemas sugieren la ausencia de desnitrificación convencional en los mismos, en los últimos años se han detectado varios grupos de bacterias desnitrificantes aerobias (Ji et al., 2015). Además, se observaron también en los tres sistemas bacterias oxidadoras del nitrito (*Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrolancea*), responsables por tanto de la ausencia de NO_2^- en los sistemas estudiados.

Junto con el consumo de amonio, también se observó una reducción en la concentración de carbono inorgánico (CI) durante el proceso de nitrificación. La concentración inicial medida en el centrado diluido fue de $154.6 \pm 32.6 \text{ mg L}^{-1}$ mientras que las concentraciones de CI medido en los reactores fueron de $0.8 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ para R1, $0.5 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ para R2 y $0.6 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ para R3. Según Yang et al., (2010), la concentración de CI está relacionada con el rendimiento de eliminación de nitrógeno ya que el carbono inorgánico puede desempeñar un papel catalítico en la producción de hidroxilamina durante el proceso de nitrificación autotrófica. En nuestro estudio particular, los bajos pH del medio cultivo en los tres reactores junto con la intensa aeración fueron responsables de una parte importante de la eliminación de CI por stripping.

Tabla 16. Valores medios de Carbono Orgánico Total (COT) y de Carbono Inorgánico (CI) de los tres reactores durante la etapa estacionaria.

REACTORES	COT (mg L^{-1})		CI (mg L^{-1})	
	entrada	salida	entrada	salida
R1	21.5 ± 8.5	42.7 ± 2.1	154.6 ± 32.6	0.8 ± 0.5
R2	21.5 ± 8.5	21.2 ± 2.2	154.6 ± 32.6	0.5 ± 0.1
R3	21.5 ± 8.5	24.1 ± 4.8	154.6 ± 32.6	0.6 ± 0.3

4.1.2. Producción de CO₂

La Tabla 16 muestra la producción de CO₂ (P_{CO2}) durante la etapa estacionaria evaluada, la cantidad de CO₂ producido teóricamente basada en la cantidad de metano que se ha eliminado, y el ratio $P_{CO2 \text{ experimental}} / P_{CO2 \text{ teórico}}$ que indica la contribución de la eliminación de CH₄ en la producción de CO₂ (Y_{CO2}).

Tabla 17. Producción de CO₂ (P_{CO2}), producción de CO₂ teórica (basada en la cantidad de CH₄ eliminado) y rendimiento de mineralización (Y_{CO2}).

REACTORES	P _{CO2} (g m ⁻³ h ⁻¹)	P _{CO2} teórico (g m ⁻³ h ⁻¹)	Y _{CO2} (%)
R1	21.5 ± 4.2	31.0 ± 10.2	69.5
R2	22.0 ± 2.2	32.2 ± 12.7	68.3
R3	27.7 ± 3.2	37.9 ± 11.5	73.1

Las P_{CO2} en los tres sistemas estudiados fueron similares (Tabla 17; Fig. 43), lo que indica contribuciones similares de las bacterias metanótrofas en la producción de CO₂ para las tres unidades. Los valores correspondientes al ratio $P_{CO2 \text{ experimental}} / P_{CO2 \text{ teórico}}$ muestran también valores similares para los tres sistemas (Tabla 16). Hilger y Humer, 2003 mostraron que el valor teórico del ratio $P_{CO2 \text{ experimental}} / P_{CO2 \text{ teórico}}$ para los metanótrofos de tipo II (predominantes en las unidades STR de este trabajo) es del 59 %. En este trabajo, los valores observados han sido ligeramente superiores (69.5 % para R1, 68.3 % para R2 y 73.1 % para R3) a los mencionados por estos autores, sin embargo, ha de tenerse en cuenta que otros microorganismos a parte de las bacterias metanotróficas - por ejemplo bacterias metilotróficas que podrían estar usando el metanol generado por los metanótrofos - podrían estar contribuyendo al proceso de mineralización de carbono en estos sistemas (Nikiema, 2009). El stripping de CO₂ desde el centrado diluido junto con la significativa respiración endógena derivada de a operación a un tiempo de residencia de la biomasa infinito (debido al retorno de la biomasa centrifugada).

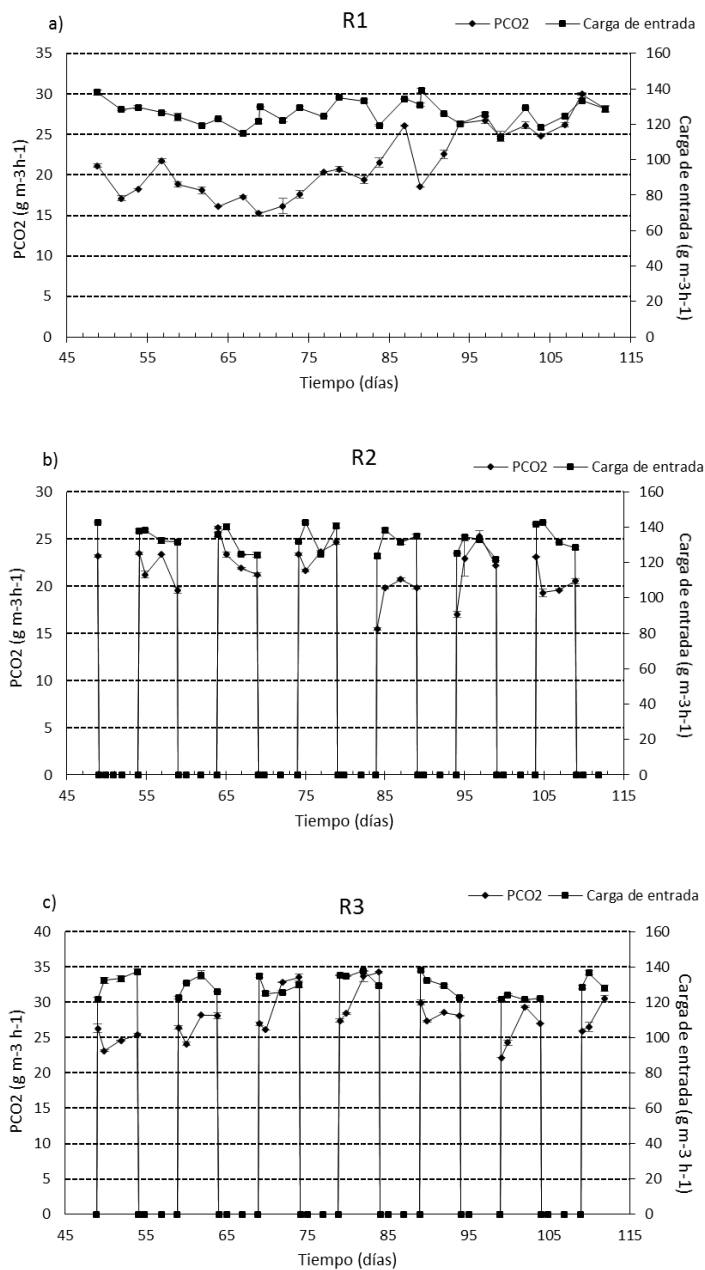


Figura 43. Evolución temporal de la producción de CO₂ y la carga de CH₄ en las unidades R1, R2 y R3.

4.1.3. pH, caída de presión y producción de biomasa

Los valores de pH observados fueron similares para los tres bioreactores, siendo el valor de pH para la unidad R1 ligeramente superior que para las unidades operadas en discontinuo (Fig. 45). El proceso nitrificación, constatado en los sistemas por la presencia de bacterias oxidadoras del NH_4^+ (principalmente *Nitrosomonas* y *Nitrospira*) y de altas concentraciones de nitrato, implica la liberación de H^+ durante la conversión de NH_4^+ a NO_3^- y una disminución en la alcalinidad del medio debido al consumo de la misma por estas bacterias como fuente de carbono. Esto provoca por tanto, la reducción del pH en los sistemas. La mayor parte de las bacterias metanotróficas son incapaces de crecer a pH por debajo de 5, sin embargo la existencia de metanótrofos acidofílicos ha sido previamente observada y todos pertenecen a las Alphaproteobacterias, incluyendo especies de *Methylocella*, *Methylocapsa* y *Methylocystis* (Kip et al., 2011). En este trabajo, *Methylocystis* fue el género predominante (Figs. A5.1., A5.2. y A5.3), lo que confirma el carácter acidofílico o ácido-tolerante de algunos de los microorganismos de este grupo. Por otro lado, la unidad R1, presentó una mayor abundancia de metanótrofos (16 %) en comparación con R2 (11 %) y R3 (7 %) (Figs. A5.4., A5.5. y A5.6.), lo cual podría explicar los niveles de pH ligeramente superiores en esta unidad.

Cabe destacar, la fluctuación periódica observada en los valores de pH de las unidades operadas en discontinuo impuesta por el reemplazo del líquido de centrífuga (Fig. 45). Durante los periodos de hambruna, el pH disminuyó hasta valores de 3.5, mientras que durante el período con alimentación el pH aumentó hasta valores de 6.5. Durante el período de hambruna, tan sólo el CH_4 fue eliminado de los sistemas, lo que supuso una disminución en la actividad metanotrófica y por tanto en la producción de alcalinidad. Sin embargo, las bacterias oxidadoras del NH_4^+ no se vieron afectadas debido a la disponibilidad de NH_4^+ en el medio. Esto explicaría la reducción el pH observada durante los periodos de hambruna, y el aumento del mismo durante los periodos de alimentación de CH_4 .

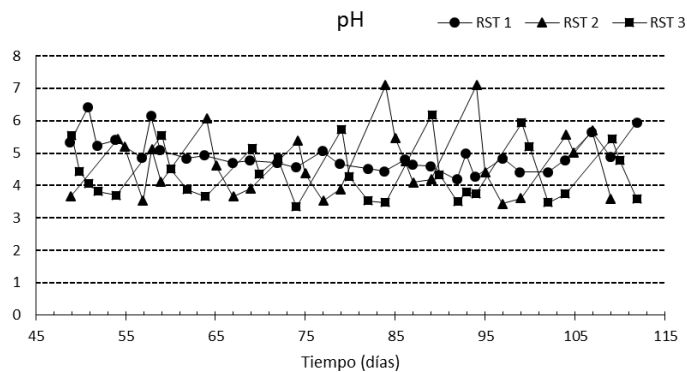


Figura 42. Evolución temporal del pH de los tres reactores durante el proceso estacionario.

En la figura 46 se puede observar la evolución temporal de la caída de presión y en la figura 47 la acumulación de biomasa durante el período estacionario. La caída de presión en el reactor con alimentación continua (R1) llegó a valores superiores a los observados en las dos unidades alternas (R2 y R3). Este hecho se debe a la mayor concentración de biomasa en R1 y crecimiento de la biomasa sobre los difusores, debido a su operación en régimen de alimentación continua. Cuando la caída de presión se aproximó a los 350 mbares se sustituyeron los difusores, bajando drásticamente la caída de presión en los reactores.

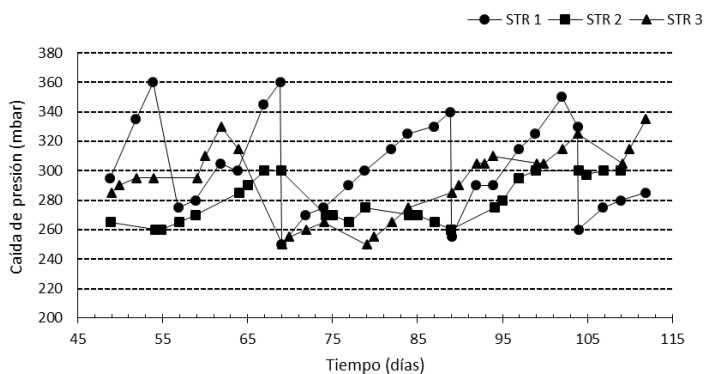


Figura 43. Evolución temporal de la caída de presión (mbar) de los tres reactores durante la etapa estacionaria.

Los datos medios de concentración de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles en los sistemas se pueden observar en la tabla 18 y en

las figuras 47 y 48. Las tecnologías para el tratamiento de CH₄ comúnmente empleadas a escala industrial (biofiltros) generalmente sufren de problemas de acumulación de biomasa que limitan su eficiencia y dificultan su operación. En este trabajo, la concentración de sólidos en R2 y R3 fue aproximadamente la mitad de la observada en R1 (Tabla 18; Fig. 47; Fig. 48) y a pesar de todo, estos reactores no mostraron CE inferiores a las de R1 (no se vio afectada su actividad), indicando la viabilidad del uso de las estrategias de alimentación-hambriena para el control de sólidos en sistemas biológicos para el tratamiento de corrientes diluidas de CH₄. Estas similares CE a diferentes concentraciones de biomasa también indicaron que los reactores estuvieron limitados por transporte desde la fase gas a la fase líquida.

Tabla 18. Valores medios de Sólidos Suspendidos Totales (SST) (g L⁻¹), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) (g L⁻¹) y caída de presión de los tres biorreactores durante la etapa estacionaria.

REACTORES	ΔP (mbar)	SST (g L ⁻¹)	SSV (g L ⁻¹)
R1	309.23 ± 28.27	3.74 ± 0.52	3.64 ± 0.52
R2	279.89 ± 15.61	1.90 ± 0.25	1.86 ± 0.25
R3	289.40 ± 24.08	2.76 ± 0.24	2.70 ± 0.23

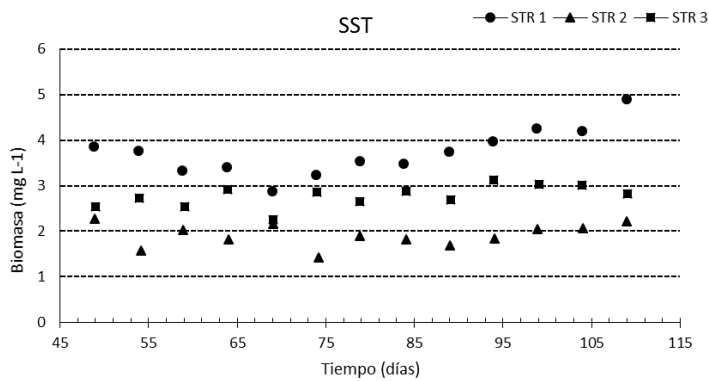


Figura 44. Evolución temporal de la concentración de Sólidos Suspendidos Totales de los tres reactores durante la etapa estacionaria.

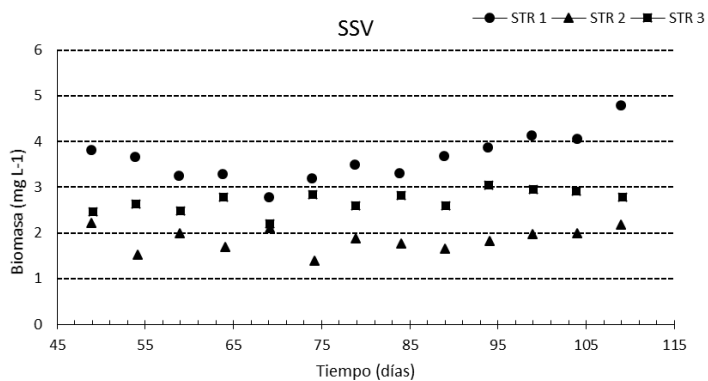


Figura 45. Evolución temporal de la concentración de Sólidos Suspendedos Volátiles de los tres reactores durante la etapa estacionaria.

4.2. Evaluación de la robustez de los biorreactores

Con el fin de determinar la capacidad de respuesta de los sistemas y por tanto del consorcio metanotrófico frente a las ciclos de alimentación/hambruna, se analizó uno de estos ciclos en detalle tomando muestras periódicas para la cuantificación de la expresión del gen *pmoA* por QPCR (ADN y ARN) y la medición de gases (CH_4 y CO_2) tal y como se describió en el apartado de materiales y métodos. Además, para evaluar la influencia del historial previo de operación de los reactores en dicha capacidad de recuperación, se sometió al sistema R1 (en continuo) a uno de estos ciclos y se comparó con los sistemas en discontinuo (R2, R3) previamente adaptados a la interrupción en el suministro en la fuente de carbono y energía.

La eficiencia de amplificación de la QPCR para la cuantificación del gen (ADN) y los transcritos (ARNm) del gen *pmoA* fue calculada a partir de la pendiente de las curvas estándar construidas. Se incluyó una curva estándar en cada ensayo de QPCR. Los valores de eficiencia de amplificación (E) se mostraron en el rango de 93.9 a 97.8 % para las curvas incluidas en los ensayos de cuantificación de transcritos *pmoA* y en el rango de 89.2 a 98.9 % para las curvas incluidas en los ensayos de cuantificación del gen *pmoA*. Las diluciones de las curvas estándar abarcaron 5 órdenes de magnitud (10^1 a 10^5) y la amplificación de las mismas fue lineal (coeficiente de regresión de 0.983 - 0.997 para ensayos de cuantificación de transcritos y de 0.9917 - 0.9977 para ensayos de cuantificación del gen). El análisis de melting en cada ensayo de QPCR mostró la especificidad de los primers utilizados para el gen estudiado.

Las figuras 50, 51 y 52 muestran la evolución de la cantidad de transcritos de la *pmoA* por mg de SV, la cantidad de genes de *pmoA* por mg de SSV, así como el ratio “genes *pmoA* / transcritos *pmoA*” para cada uno de los biorreactores (R1, R2, R3), respectivamente. El número de transcritos refleja la cantidad de ARNm que codifica para la enzima *pmoA* en las células en un momento determinado. La cantidad de genes de *pmoA* refleja la cantidad de bacterias metanótrofas presentes en las muestras analizadas. El ratio “genes *pmoA* / transcritos *pmoA*” o “ADN *pmoA* / ARN *pmoA*” refleja la abundancia de transcritos por cantidad de biomasa. A ratios menores la actividad de fisiológica de las células sería mayor y a la inversa. La utilización de este ratio se ha sugerido como una medida más directa de la actividad fisiológica de las células en lugar de utilizar la abundancia absoluta del número de transcritos (Freitag et al., 2010).

La CE de CH₄ de los reactores durante el experimento se muestra en la figura 49. En los tres sistemas se observó un incremento en la CE inmediatamente después de la reintroducción de CH₄ (t=120.03 h para R1 y R2, t=120.5 h para R3). Así, las CE retornaron a valores similares a los observados durante la fase estacionaria en un período de 30 minutos (t=120.5 h) para los sistemas R1 y R2, y de 1.5 horas (t=121.5 h) para R3. El aumento en la CE justo tras su reintroducción en los sistemas sugiere que, durante ese período, la eliminación de CH₄ se debió a su solubilización en el medio y, por tanto, el aumento observado en las CE no es representativo. Desestimando estas mediciones, se observa que los reactores alcanzaron CE similares a las de la etapa estacionaria (Tabla 18) en un período de 30 minutos para R1 y R2 y de 1.5 horas para R3 (Fig. 49).

El ratio “ADN *pmoA* / ARN *pmoA*” confirmó la rápida recuperación de los sistemas. Entre los 30 minutos y 1 hora se observó una disminución en el ratio para los tres sistemas que se mantuvo en valores mínimos hasta aproximadamente las 12 horas posteriores (t=132 h) a la reintroducción de CH₄ (Figs. 50, 51 y 52). Esta disminución en el ratio implica el incremento en la cantidad de transcritos de *pmoA* por unidad de biomasa en las bacterias metanotróficas durante este período y, por tanto, su rápida adaptación fisiológica a la nueva situación.

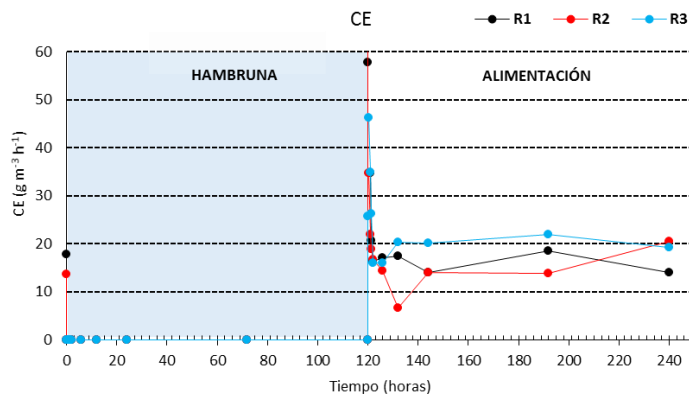


Figura 46. Evolución temporal de CE_{CH_4} en los tres reactores durante un ciclo de alimentación/hambruna.

Tabla 18. Valores medios de CE de CH_4 obtenidos durante el ciclo de alimentación-hambruna comparado con los valores de CE en estado estacionario para los tres bioreactores.

REACTORES	EXPERIMENTO	ETAPA ESTACIONARIA
	$CE(g\ m^{-3}\ h^{-1})$	$CE(g\ m^{-3}\ h^{-1})$
R1	16.24 ± 2.03	16 ± 2.7
R2	14.4 ± 4.55	11 ± 2.6
R3	18.96 ± 2.46	14.2 ± 4.3

Los resultados obtenidos muestran por tanto que los tres sistemas recuperaron sus CE_{CH_4} en aproximadamente el mismo tiempo (30 minutos - 1.5 horas), independientemente de su historial previo de operación (continuo vs. alimentación/hambruna). Esto refleja la gran capacidad de adaptación de las bacterias metanotróficas a cambios en su ambiente o períodos de estrés cíclicos, y confirma la robustez de estos sistemas frente a fallos operacionales que comúnmente se dan en sistemas a escala real.

Ferdowsi et al., 2016 observaron para un biofiltro sometido a condiciones de hambruna durante un período de 30 días (sin CH_4 y sin solución de nutrientes) que el tiempo de recuperación de las CE fue de 5 días (a una carga de entrada: $13\ g\ m^{-3}h^{-1}$), sin embargo, la CE se estabilizó en valores ligeramente inferiores ($\approx 8\ g\ m^{-3}\ h^{-1}$) a los observados antes de la aplicación de estas condiciones ($10 - 11\ g\ m^{-3}\ h^{-1}$). Para tiempos más cortos de las condiciones de hambruna (3 días), otros autores han mostrado una rápida recuperación de los sistemas (30 minutos) en cuanto a eliminación de COVs y H_2S en biofiltros y sistemas de fangos activados (Lebrero et al., 2010).

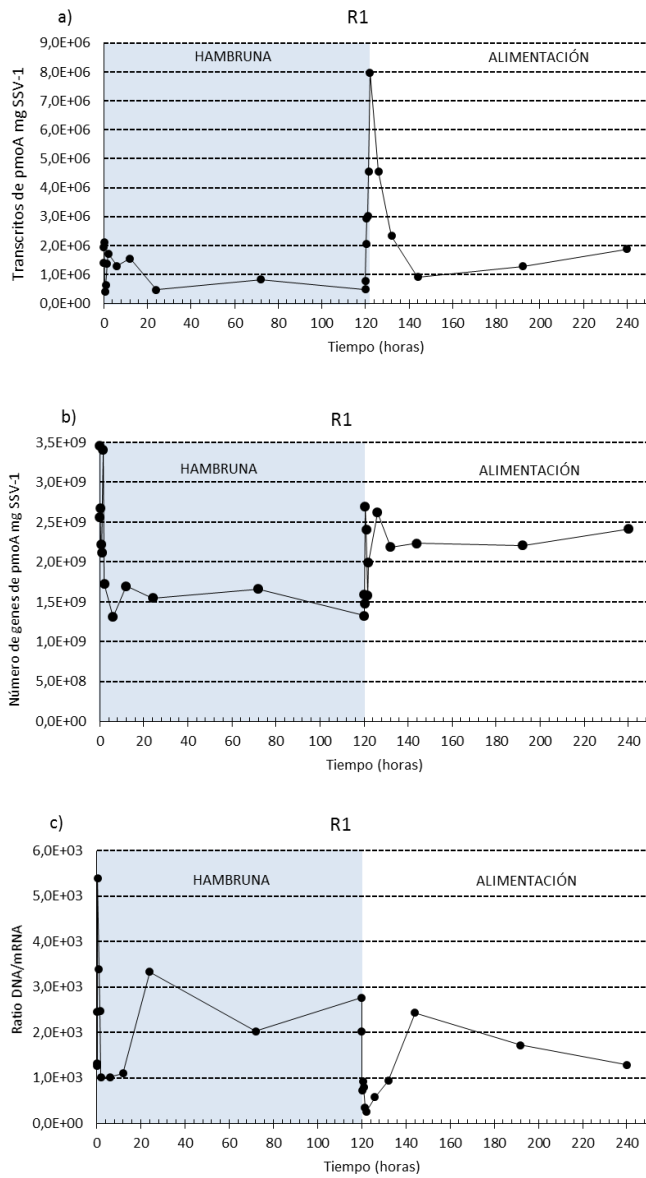


Figura 47. Evolución temporal del (a) número de transcritos de pmoA por mg de SSV; (b) número de genes de pmoA por mg de SSV (c) ratio transcritos pmoA por mg SSV⁻¹/genes pmoA por mg SSV⁻¹ en R1.

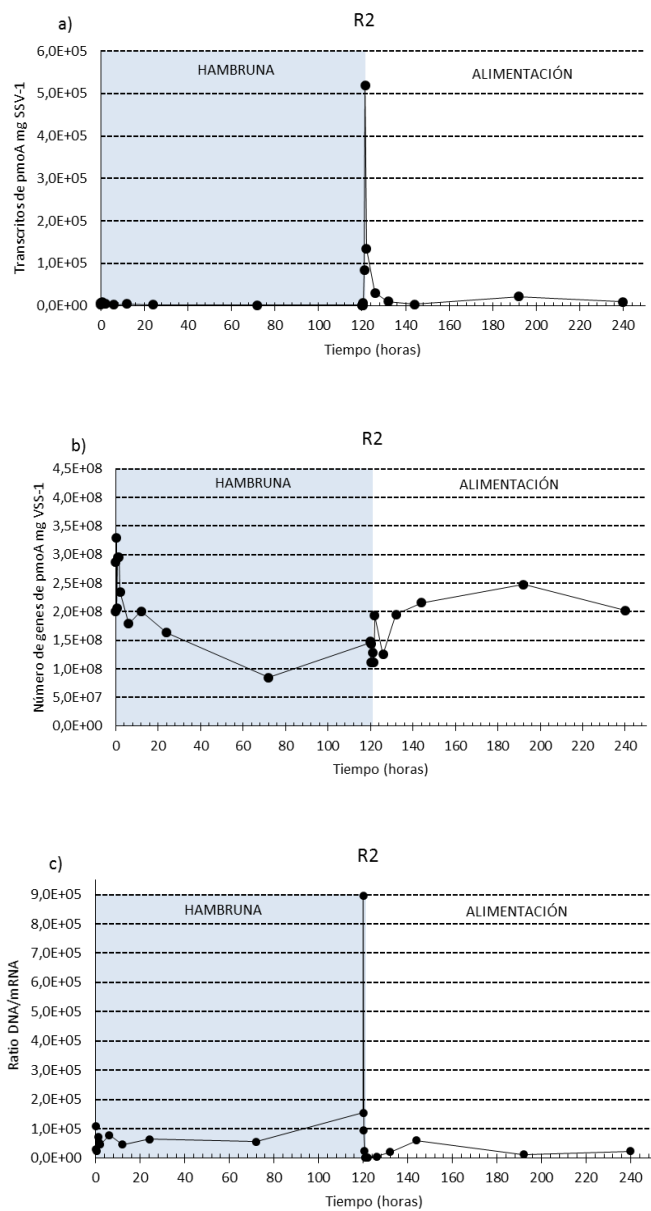


Figura 48. Evolución temporal del (a) número de transcritos de pmoA por mg de SSV; (b) número de genes de pmoA por mg de SSV; (c) ratio transcritos pmoA mg SSV⁻¹ / genes pmoA mg SSV⁻¹ en R2.

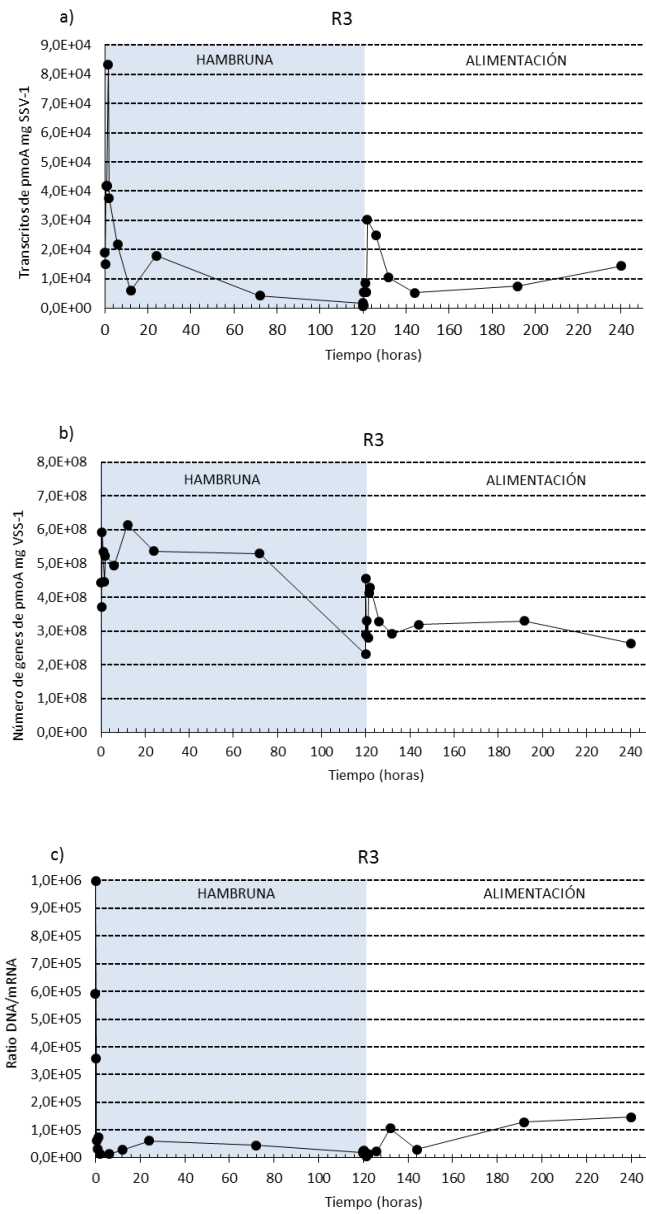


Figura 49. Evolución temporal del (a) número de transcritos de pmoA por mg de SSV; (b) número de genes de pmoA por mg de SSV; (c) ratio transcritos pmoA mg SSV-1 / genes pmoA mg SSV-1 en R3.

Cabe destacar que el ratio “ADN *pmoA* / ARN *pmoA*” muestra para los sistemas R2 y R3 un aumento al pasar de la muestra de 120 horas (final del período de hambruna) a la muestra de 120.03 horas (minutos después de la reintroducción de CH₄). Sin embargo, como se comentó anteriormente, a los 15 minutos (t=120.25 h) posteriores a la introducción de CH₄ se observa de nuevo una disminución del ratio, que alcanza valores mínimos entre los 30 minutos (t=120.5 h) y las 12 horas (t=132 h) indicando un máximo en la actividad fisiológica de las bacterias metanotróficas en ese período. Este aumento en el ratio al pasar de las condiciones de hambruna (t=120 h) a las condiciones de alimentación (t=120.03 h), no se observa en el sistema R1, en el que el ratio disminuye de la muestra t=120 h a la muestra t=120.03 h indicando un aumento en la actividad metanotrófica (mediante una mayor producción de transcritos de *pmoA*) de las células para adaptarse de nuevo a la presencia de CH₄. Esta diferencia en el patrón de expresión entre R2 y R3, que disminuyen su actividad fisiológica inmediatamente después de la introducción de CH₄ (cuando éste aún no se ha solubilizado en el medio) pero la recuperan a los 30 minutos (cuando el CH₄ está probablemente solubilizado) podría ser una adaptación particular de las bacterias metanotróficas previamente operadas en régimen de alimentación/hambruna, en la que la degradación de transcritos supera a la síntesis de los mismos en el momento previo a la reintroducción de CH₄ como si de un “efecto memoria” se tratase. Este “efecto memoria” no se observó en R1, cuyas células no disminuyeron su actividad en el momento previo a la disponibilidad de CH₄. Este “efecto memoria” se ha observado en varios organismos, por ejemplo, bacterias “que recuerdan” estados nutricionales previos (Guan et al., 2012). En un estudio sobre la adaptación de *E.coli* a diferentes medios, se observó que los cultivos celulares mostraron las mismas tasas de crecimiento y fenotipos metabólicos tras varias generaciones, sin embargo, los estados de expresión de diferentes genes fueron diferentes (López-Maury et al., 2008).

4.2.1. Producción de CO₂

En cuanto a los valores de producción de CO₂, se observa principalmente para el sistema R2, y en menor medida para R3, un aumento en la P_{CO2} en el momento inmediatamente posterior a la introducción de CH₄ (t=120.0 h). Sin embargo, la P_{CO2} cae a los 30 minutos (t=120.5 h) a valores cercanos a los observados durante la etapa estacionaria que se mantienen hasta el final del ciclo de alimentación (Fig. 53 y Tabla 19). Este aumento coincide con el aumento del ratio “DNA *pmoA* / RNA *pmoA*” en R2 y R3, que indica una disminución en la actividad de las bacterias metanotróficas en el momento previo a la obtención de CH₄. Tavormina et al., 2017, observó en *Methyloprofundus sedimenti* una acumulación de metanol extracelular durante el período inicial de la recuperación tras condiciones de hambruna, indicando

de este modo una ruta por la que el carbono derivado del CH₄ puede ser utilizado por otros miembros de la comunidad (bacterias metilotróficas). La disminución de actividad metanotrófica justo al inicio de la recuperación, que coincide con el aumento en la P_{CO₂} de estos dos sistemas podría implicar por tanto la acumulación de metanol que estaría disponible para las bacterias metilotróficas, por lo que el aumento en la P_{CO₂} se debería a otros miembros de la comunidad y no a las bacterias metanótrofas.

Algo similar se observa al inicio del período de hambruna; aumenta la P_{CO₂} en t=0.03 h con respecto al punto previo (t=0 h), y va cayendo gradualmente hasta alcanzar valores mínimos aproximadamente a las 24 horas que se mantienen hasta el final de la etapa sin alimentación.

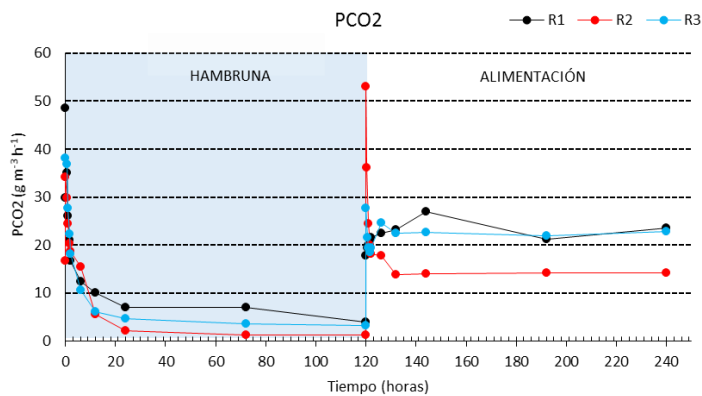


Figura 50. Evolución temporal de la producción de CO₂ durante un ciclo de alimentación/hambruna en los tres reactores.

Tabla 19. Valores de producción de CO₂ durante la etapa de alimentación del experimento de los tres reactores.

REACTORES	P _{CO₂} (g m ⁻³ h ⁻¹)	
	EXPERIMENTO	PREVIO EXPERIMENTO
R1	22.5 ± 2.1	30.1 ± 9.0
R2	17.0 ± 3.8	19.6 ± 3.4
R3	21.4 ± 2.1	26.8 ± 6.0

La cantidad de CO₂ que se podría obtener durante la etapa de alimentación, a través del metano medido (producción de CO₂ teórica) durante el experimento (Tabla 20), es más elevada que en la etapa estacionaria (tabla 16). Esto sucede por el pico obtenido en la capacidad de eliminación (Fig. 53), al no estar todo el metano solubilizado; por lo tanto, este no es un dato realista, y hace que el

porcentaje de producción de metano sea menor que el obtenido en la etapa estacionaria (Tabla 16).

Tabla 20. Datos medios de producción de CO₂ en el experimento, durante la etapa de alimentación de los tres reactores.

REACTORES	P _{CO₂} (g m ⁻³ h ⁻¹)	P _{CO₂ teórico} (g m ⁻³ h ⁻¹)	Y _{CO₂} (%)
R1	22.5 ± 2.2	47.3 ± 6.5	48.3 ± 7.5
R2	17.0 ± 3.8	43.8 ± 13.3	41.9 ± 14.2
R3	21.4 ± 2.1	60.1 ± 17.1	38.2 ± 11.2

Finalmente, durante el periodo de hambruna en R1 se observó una disminución del ratio "DNA *pmoA* / RNA *pmoA*" indicando un menor número de transcritos por cantidad de biomasa hasta los 30 minutos debido probablemente a la ausencia de CH₄ en el medio. Sin embargo, el ratio fue disminuyendo posteriormente hasta alcanzar valores mínimos entre las 2 y las 12 horas, indicando un aumento de actividad de las bacterias metanótrofas. A partir de las 12 horas el ratio aumentó de nuevo y se mantuvo hasta el final del periodo de hambruna (Fig. 50). El aumento en la actividad fisiológica de las bacterias metanótrofas entre las 2 y 12 horas del periodo sin alimentación podría estar relacionado con la utilización de sustancias de reserva para la asimilación de nitrógeno a través de la *pmoA*. Se ha mostrado que el polihidroxibutirato (PHB) acumulado por las bacterias metanótrofas como sustancia de reserva es utilizado como una fuente de poder reductor para la asimilación de nitrógeno en ausencia de CH₄, aunque no para la síntesis de material celular (Pieja et al., 2011). El microorganismo metanótrofo predominante en R1 (*Methylocystis rosea*) acumula PHB como sustancia de reserva (Wartiainen et al., 2006), que podría estar siendo utilizado como fuente de poder reductor para la oxidación cometabólica de NH₄⁺ al inicio del período de hambruna.

Se observa también, principalmente para R1, que los niveles basales de actividad metanotrófica (entre las 12 horas y el final de los períodos de alimentación/hambruna) en base al ratio "ADN *pmoA* / ARN *pmoA*" muestran valores similares o incluso ligeramente superiores a los obtenidos durante la fase sin alimentación de los reactores (Fig. 50). Tavormina et al., 2017, también observó que los niveles de transcritos de *pmoA* durante la fase de hambre fueron superiores a los de la fase con CH₄ en *Methyloprofundus sedimenti*. Del mismo modo, Bollmann et al., 2005, observó que en bacterias oxidadoras del NH₄⁺, los transcritos que codifican para la amonio-monooxigenasa (*amoA*), se degradan lentamente durante 12 días de hambruna sin NH₄⁺, comparado con la mayor parte de los ARNm celulares. Estos autores sugieren que estas bacterias poseen mecanismos únicos para responder a condiciones de hambruna. Son capaces de mantener niveles de

expresión del gen responsable de la degradación del compuesto durante el período de escasez que las permitan oxidar de nuevo el compuesto casi inmediatamente cuando está disponible (niveles de expresión que facilitan el regreso al crecimiento después de la reposición de metano) (Bollmann et al., 2005; Tavormina et al., 2017).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las estrategias de operación alimentación/hambruna se muestran como una alternativa eficiente para el control de la acumulación de sólidos en sistemas biológicos para el tratamiento de CH_4 a bajas concentraciones. Las unidades operadas bajo este régimen operaron a menor concentración de sólidos sin verse afectada la capacidad de eliminación de CH_4 de las mismas.

El análisis combinado a nivel molecular y macroscópico de un ciclo de alimentación/hambruna mostró la gran capacidad de recuperación (0.5 – 1.5 horas) de los sistemas utilizados después de 5 días de hambruna independientemente de su historial previo de operación (continuo vs. discontinuo). Esto confirma la robustez de estas biotecnologías para el tratamiento de CH_4 en corrientes diluidas.

Este estudio confirma, al igual que estudios previos, la importancia del nitrógeno como factor regulador de la actividad metanotrófica, y establece por tanto la necesidad de considerar dicho factor para la optimización de sistemas biológicos para el tratamiento de CH_4 . Se confirmó a través de la presencia de bacterias nitrificantes en los sistemas la posible competición por el nitrógeno entre estos microorganismos y las bacterias nitrificantes. Las CE observadas en este trabajo fueron similares a las observadas en otros estudios en los que se usaron concentraciones similares de nitrógeno como nutriente.

Se observaron patrones de expresión del gen *pmoA* diferenciales entre el sistema previamente operado en continuo (R1) y los sistemas ya operados en régimen de alimentación-hambruna (R2, R3), lo que sugiere la adaptación de las bacterias metanotróficas a situaciones de stress que se repiten de un modo cíclico.

El presente estudio sugiere también, al igual que estudios previos, que bajo condiciones de ausencia de metano, el PHB acumulado por las células podría estar siendo utilizado como fuente de poder reductor para la asimilación de nitrógeno y no para la síntesis de carbono celular como ocurre en otros grupos bacterianos.



BIBLIOGRAFÍA

- Alfonsín, C., Lebrero, R., Estrada, J.M., Muñoz, R., Kraakman, N.J.R., Feijoo, G., Moreira, M.A.T., 2015. Selection of odour removal technologies in wastewater treatment plants: A guideline based on Life Cycle Assessment. *J. Environ. Manage.* 149, 77–84. doi:10.1016/j.jenvman.2014.10.011
- Anenberg, S.C., Horowitz, L.W., Tong, D.Q., West, J.J., 2010. An estimate of the global burden of anthropogenic ozone and fine particulate matter on premature human mortality using atmospheric modeling. *Environ. Health Perspect.* 118, 1189–1195. doi:10.1289/ehp.0901220
- Auman, A.J., Stolyar, S., Costello, A.M., Lidstrom, E., 2000. Molecular Characterization of Methanotrophic Isolates from Freshwater Lake Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5259–5266. doi:10.1128/AEM.66.12.5259-5266.2000.Updated
- Avalos Ramirez, A., Jones, J.P., Heitz, M., 2012. Methane treatment in biotrickling filters packed with inert materials in presence of a non-ionic surfactant. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, 848–853. doi:10.1002/jctb.3811
- Avnery, S., Mauzerall, D.L., Fiore, A.M., 2013. Increasing global agricultural production by reducing ozone damages via methane emission controls and ozone-resistant cultivar selection. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1285–1299. doi:10.1111/gcb.12118
- Bollmann, A., Schmidt, I., Saunders, A.M., Nicolaisen, M.H., 2005. Influence of starvation on potential ammonia-oxidizing activity and amoA mRNA levels in *Nitrospira briensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1276–1282. doi:10.1128/AEM.71.3.1276-1282.2005
- Bratina, B.J., Brusseau, G. a, Hanson, R.S., 1992. Use of 16S rRNA analysis to investigate phylogeny of methylophilic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 645–648. doi:10.1099/00207713-42-4-645
- Climate Action [WWW Document], n.d. URL https://ec.europa.eu/clima/policies/strategies/2030_en#tab-0-1 (accessed 7.17.17).
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A., 2002. Effect of starvation on the performance and re-acclimation of biotrickling filters for air pollution control. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3069–3073. doi:10.1021/es015693d
- Cox, H.H.J., Deshusses, M.A., 1999. Biomass control in waste air biotrickling filters by protozoan predation. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 216–224. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19990120)62:2<216::AID-BIT12>3.0.CO;2-4
- Dam, B., Dam, S., Kim, Y., Liesack, W., 2014. Ammonium induces differential expression of methane and nitrogen metabolism-related genes in

- Methylocystis sp. strain SC2. *Environ. Microbiol.* 16, 3115–3127.
doi:10.1111/1462-2920.12367
- Daniel, J.S., Solomon, S., Sanford, T.J., McFarland, M., Fuglestedt, J.S., Friedlingstein, P., 2012. Limitations of single-basket trading: Lessons from the Montreal Protocol for climate policy. *Clim. Change* 111, 241–248.
doi:10.1007/s10584-011-0136-3
- Dedysh, S.N., Dunfield, P.F., 2011. *Facultative and obligate methanotrophs: How to identify and differentiate Them*, 1st ed, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-386905-0.00003-6
- Devigny, J.S., Ramesh, J., 2005. A phenomenological review of biofilter models. *Chem. Eng. J.* 113, 187–196. doi:10.1016/j.cej.2005.03.005
- EEA, 2017. Annual European Union greenhouse gas inventory 1990–2014 and inventory report 2016.
- Environmental Defense Fund [WWW Document], n.d. URL <https://www.edf.org/> (accessed 7.17.17).
- EPA, 2017. Inventory of U. S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks.
- EPA, 2016. Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks: 1990-2014. *Fed. Regist.* 80, 9718. doi:EPA 430-R-13-001
- ESHORIZONTE2020 [WWW Document], n.d. URL https://www.wmo.int/pages/index_en.html (accessed 7.17.17).
- Estrada, J.M., Kraakman, N.J.R. (Bart), Lebrero, R., Muñoz, R., 2012. A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnol. Adv.* 30, 1354–1363. doi: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. *Chem. Eng. J.* 253, 385–393.
doi:10.1016/j.cej.2014.05.053
- Ferdowsi, M., Veillette, M., Ramirez, A.A., Jones, J.P., Heitz, M., 2016. Performance Evaluation of a Methane Biofilter Under Steady State, Transient State and Starvation Conditions. *Water. Air. Soil Pollut.* 227.
doi:10.1007/s11270-016-2838-7
- Freitag, T.E., Toet, S., Ineson, P., Prosser, J.I., 2010. Links between methane flux and transcriptional activities of methanogens and methane oxidizers in a blanket peat bog. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 157–165. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00871.x

- Guan, Q., Haroon, S., Bravo, D.G., Will, J.L., Gasch, A.P., 2012. Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 495–505. doi:10.1534/genetics.112.143016
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471. doi:10.1128/mr.60.4.439-471.1996
- Hilger, H., Humer, M., 2003. Biotic landfill cover treatments for mitigating methane emissions. *Environ. Monit. Assess.* 84, 71–84. doi:10.1023/A:1022878830252
- Ho, A., Lüke, C., Frenzel, P., 2011. Recovery of methanotrophs from disturbance: population dynamics, evenness and functioning. *ISME J.* 5, 750–758. doi:10.1038/ismej.2010.163
- Holmes, A.J., Costello, A., Lidstrom, M.E., Murrell, J.C., 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 203–208.
- Hütsch, B.W., 2001. Methane oxidation in non-flooded soils as affected by crop production - Invited paper. *Eur. J. Agron.* 14, 237–260. doi:10.1016/S1161-0301(01)00110-1
- Hwang, I.Y., Lee, S.H., Choi, Y.S., Park, S.J., Na, J.G., Chang, I.S., Kim, C., Kim, H.C., Kim, Y.H., Lee, J.W., Lee, E.Y., 2014. Biocatalytic conversion of methane to methanol as a key step for development of methane-based biorefineries. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1597–1605. doi:10.4014/jmb.1407.07070
- IPCC, 2014. *Climate Change 2014, Climate change and water.* doi:10.1073/pnas.1116437108
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., Zhang, H., 2015. Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 20, 643–651. doi:10.1007/s12257-015-0009-0
- Kenney, G.E., Sadek, M., Rosenzweig, A.C., 2016. Copper-responsive gene expression in the methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Metallomics* 8, 931–940. doi:10.1039/C5MT00289C
- Khadem, A.F., Van Teeseling, M.C.F., Van Niftrik, L., Jetten, M.S.M., Op Den Camp, H.J.M., Pol, A., 2012. Genomic and physiological analysis of carbon storage in the verrucomicrobial methanotroph “*Ca. Methylococcus*” *solV*. *Front. Microbiol.* 3, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2012.00345
- Kip, N., Ouyang, W., van Winden, J., Raghoebarsing, A., van Niftrik, L., Pol, A., Pan, Y., Bodrossy, L., van Donselaar, E.G., Reichart, G.J., Jetten, M.S.M., Damsté, J.S.S., den Camp, H.J.M.O., 2011. Detection, isolation, and characterization of acidophilic methanotrophs from sphagnum mosses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5643–5654. doi:10.1128/AEM.05017-11

- Kizilova, A., Yurkov, A., Kravchenko, I., 2013. Aerobic methanotrophs in natural and agricultural soils of european russia. *Diversity* 5, 541–556. doi:10.3390/d5030541
- Knief, C., 2015. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01346
- Konopka, a, Zakharova, T., Nakatsu, C., 2002. Effect of starvation length upon microbial activity in a biomass recycle reactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 286–91. doi:10.1038/sj.jim.7000322
- Korbie, D.J., Mattick, J.S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3, 1452–1456. doi:10.1038/nprot.2008.133
- Kraakman, N.J.R.B., 2003. Robustness of a Full-Scale Biological System Treating Industrial CS₂ Emissions. *Environ. Prog.* 79–85. doi:10.1002/ep.670220209
- Lebrero, R., Rodríguez, E., Martín, M., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2010. H₂S and VOCs abatement robustness in biofilters and air diffusion bioreactors: A comparative study. *Water Res.* 44, 3905–3914. doi:10.1016/j.watres.2010.05.008
- López-Maury, L., Marguerat, S., Bähler, J., 2008. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 583–593. doi:10.1038/nrg2398
- López, J.C., Quijano, G., Muñoz, R., 2016. The role of nitrogen availability on methane abatement biotechnologies.
- López, J.C., Quijano, G., Souza, T.S.O., Estrada, J.M., Lebrero, R., Muñoz, R., 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2277–2303. doi:10.1007/s00253-013-4734-z
- Métris, A., Mark Gerrard, A., Cumming, R.H., Weigner, P., Paca, J., 2001. Modelling shock loadings and starvation in the biofiltration of toluene and xylene. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 565–572. doi:10.1002/jctb.422
- Michael, M.T., John, M.M., David, S.A., David, C.P., Cossio, M.L.T., Giesen, L.F., Araya, G., Pérez-Cotapos, M.L.S., VERGARA, R.L., Manca, M., Tohme, R.A., Holmberg, S.D., Bressmann, T., Lirio, D.R., Román, J.S., Solís, R.G., Thakur, S., Rao, S.N., Modelado, E.L., La, A.D.E., Durante, C., Tradición, U.N.A., En, M., Espejo, E.L., Fuentes, D.E.L.A.S., Yucatán, U.A. De, Lenin, C.M., Cian, L.F., Douglas, M.J., Plata, L., Héritier, F., 2012. Brock Biology of Microorganism, Instrumentos Familiares. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2

- Muñoz, R., Malhautier, L., Fanlo, J.-L., Quijano, G., 2015. Biological technologies for the treatment of atmospheric pollutants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95, 950–967. doi:10.1080/03067319.2015.1055471
- Muñoz, R., Souza, T.S.O., Glittmann, L., Pérez, R., Quijano, G., 2013. Biological anoxic treatment of O₂-free VOC emissions from the petrochemical industry: A proof of concept study. *J. Hazard. Mater.* 260, 442–450. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.05.051
- Murreil, J.C., Gilbert, B., McDonald, I.R., 2000. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* 173, 325–332. doi:10.1007/s002030000158
- Nikiema, J., 2009. Biofiltration of methane using an inorganic filter bed : influence of inlet load and nitrogen concentration 9, 1903–1910. doi:10.1139/L09-144
- Nikiema, J., Brzezinski, R., Heitz, M., 2007. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 6, 261–284. doi:10.1007/s11157-006-9114-z
- Novikov, V. V., Stepanov, A.L., 2002. [Coupling of microbial processes of methane and ammonium oxidation in soils]. *Mikrobiologija* 71, 272–276.
- Ocko, I.B., Hamburg, S.P., Jacob, D.J., Keith, D.W., Keohane, N.O., Oppenheimer, M., Roy-Mayhew, J.D., Schrag, D.P., Pacala, S.W., 2017. Unmask temporal trade-offs in climate policy debates. *Science* (80-.). 356, 492 LP-493. doi:10.1126/science.aaj2350
- OMM, 2015. Estado de los gases de efecto invernadero en la atmósfera según las observaciones mundiales realizadas en 2014. *Organ. Meteorológica Mund.* 4.
- OMM, 2011. The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observation through 2010 2013, 1–8.
- Pieja, A.J., Sundstrom, E.R., Criddle, C.S., 2011. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6012–6019. doi:10.1128/AEM.00509-11
- Posadas, E., Szpak, D., Lombó, F., Domínguez, A., Díaz, I., Blanco, S., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Feasibility study of biogas upgrading coupled with nutrient removal from anaerobic effluents using microalgae-based processes. *J. Appl. Phycol.* 28, 2147–2157. doi:10.1007/s10811-015-0758-3
- Rocha-Rios, J., Quijano, G., Thalasso, F., Revah, S., Muñoz, R., 2011. Methane biodegradation in a two-phase partition internal loop airlift reactor with gas recirculation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 353–360. doi:10.1002/jctb.2523

- Scheutz, C., Kjeldsen, P., Bogner, J.E., De Visscher, A., Gebert, J., Hilger, H.A., Huber-Humer, M., Spokas, K., 2009. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Manag. Res.* 27, 409–455. doi:10.1177/0734242X09339325
- Semrau, J.D., Dispirito, A.A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 496–531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x
- Serial, G.A., Smith, F.L., Suidan, M.T., Biswas, P., Brenner, R.C., Brenner, R. O., 1995. Evaluation of Trickle Bed Biofilter Media for Toluene Removal. *J. Air Waste Manag. Assoc. J. J. Air Waste Manag. Assoc. Air Waste Manag. Assoc.* 45, 1096–2247. doi:10.1080/10473289.1995.10467410
- Smith, F.L., Serial, G.A., Suidan, M.T., Breen, A.W., Biswas, P., Brenner, R.C., 1996. Development of two biomass control strategies for extended, stable operation of highly efficient biofilters with high toluene loadings. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1744–1751. doi:10.1021/es950743y
- 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? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4001–4018. doi:10.1021/es504242n
- Suarez-Mendez, C., Sousa, A., Heijnen, J., Wahl, A., 2014. Fast “Feast/Famine” Cycles for Studying Microbial Physiology Under Dynamic Conditions: A Case Study with *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites* 4, 347–372. doi:10.3390/metabo4020347
- Tavormina, P.L., Kellermann, M.Y., Antony, C.P., Tocheva, E.I., Dalleska, N.F., Jensen, A.J., Valentine, D.L., Hinrichs, K.U., Jensen, G.J., Dubilier, N., Orphan, V.J., 2017. Starvation and recovery in the deep-sea methanotroph *Methyloprofundus sedimenti*. *Mol. Microbiol.* 103, 242–252. doi:10.1111/mmi.13553
- Tavormina, P.L., Ussler, W., Joye, S.B., Harrison, B.K., Orphan, V.J., 2010. Distributions of putative aerobic methanotrophs in diverse pelagic marine environments. *ISME J.* 4, 700–710. doi:10.1038/ismej.2010.32
- Veillette, M., Ramirez, A.A., Heitz, M., 2012. Influence of Ammonium Concentration on the Performance of an Inorganic Biofilter Treating Methane 6, 4–7.
- Wartiainen, I., Hestnes, A.G., McDonald, I.R., Svenning, M.M., 2006. *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78° N). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 541–547. doi:10.1099/ijs.0.63912-0

Weber, F.J., Hartmans, S., 1996. Prevention of clogging in a biological trickle-bed reactor removing toluene from contaminated air. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 91–97. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<91::AID-BIT10>3.0.CO;2-A

World Meteorological Organization [WWW Document], n.d. URL https://www.wmo.int/pages/index_en.html (accessed 7.17.17).

Wübker, S.M., Laurenzis, A., Werner, U., Friedrich, C., 1997. Controlled biomass formation and kinetics of toluene degradation in a bioscrubber and in a reactor with a periodically moved trickle-bed. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 686–692. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970820)55:4<686::AID-BIT10>3.0.CO;2-A

Yang, J., Zhang, L., Fukuzaki, Y., Hira, D., Furukawa, K., 2010. High-rate nitrogen removal by the Anammox process with a sufficient inorganic carbon source. *Bioresour. Technol.* 101, 9471–9478. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.087

Zheng, Y., Huang, R., Wang, B.Z., Bodelier, P.L.E., Jia, Z.J., 2014. Competitive interactions between methane- and ammonia-oxidizing bacteria modulate carbon and nitrogen cycling in paddy soil. *Biogeosciences* 11, 3353–3368. doi:10.5194/bg-11-3353-2014

