



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

TRABAJO FIN DE MÁSTER

TÍTULO: ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE ÓXIDO NITROSO Y PRODUCCIÓN
SIMULTANEA DE BIOPOLÍMEROS

AUTOR: GONZALO BARRIGUÍN GARCÍA

FECHA: SEPTIEMBRE 2017

RAÚL MUÑOZ TORRE, Profesor Contratado Doctor Permanente del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Ambiental de la Universidad de Valladolid, RAQUEL LEBRERO FERNANDEZ, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Ambiental de la Universidad de Valladolid, y OSVALDO DAVID FRUTOS GONZALEZ, investigador doctoral ERASMUS MUNDUS BABEL del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Ambiental de la Universidad de Valladolid

INFORMAN:

Que GONZALO BARRIGUÍN GARCÍA ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster titulado “Eliminación Biológica de Óxido Nitroso y Producción Simultanea de Biopolímeros”

Valladolid, 6 de septiembre del 2017

Fdo. D. Raúl Muñoz Torre

Fdo. D^a Raquel Lebrero Fernández

Fdo. D. Osvaldo D. Frutos

Alumno: Barriguín García, Gonzalo

Titulación: Máster en Ingeniería Ambiental- Escuela de Ingenierías industriales
Universidad de Valladolid

Reunido el Tribunal designado por el Comité Académico del Máster en Ingeniería Ambiental, para la evaluación de Trabajos Fin de Máster, y después de estudiar la memoria y atender a la defensa del trabajo “Eliminación Biológica de Óxido Nitroso y Producción Simultanea de Biopolímeros”, presentado por el alumno GONZALO BARRIGUÍN GARCÍA, decidió otorgarle la calificación de _____.

Valladolid, 6 de septiembre de 2017

El Presidente

El Secretario

Fdo:

Fdo:

Vocal

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE.....	4
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1. Cambio Climático y Efecto Invernadero.....	7
3.2. Eliminación del N ₂ O.....	10
3.3. Producción de biopolímeros	11
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo general.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1. Cultivo de microorganismos.....	14
5.2. Equipo experimental	14
4.3. Condiciones de operación	16
4.4. Procedimiento analítico	17
4.5. Cálculos realizados	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
5.1. Eficacia de la eliminación del N ₂ O con diferentes fuentes de carbono/energía.....	21
5.2. Acumulación de PHBV durante la eliminación de N ₂ O	25
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29
8. ANEXOS	31

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del calentamiento global y sus causas.

Figura 2. Evolución de la concentración del óxido nitroso en la atmósfera.

Figura 3. Emisiones de N₂O naturales frente a emisiones antropogénicas en 2005 y sus fuentes de generación.

Figura 4. Bacteria *Paracoccus denitrificans* vista al microscopio

Figura 5. Sistema experimental

Figura 6. Esquema del proceso

Figura 7. Instrumentación analítica utilizada en el laboratorio para la monitorización del sistema experimental.

Figura 8. Valores de concentración de N₂O gas a la entrada (línea azul) y salida (línea roja) con el porcentaje de eliminación (línea verde) del N₂O en R1 (figura superior) y R2 (figura inferior). La línea negra indica el inicio de la etapa II.

Figura 9. Producción del CO₂ en R1 y R2.

Figura 10. Comparación de la concentración de sólidos medidos como sólidos en suspensión totales.

Figura 11. Concentración de COT en R1 y en R2.

Figura 12. Cantidad de PHB generado, en %w/w, comparado con la cantidad de nitrógeno total presente en el reactor.

Figura 13. Acumulación celular del copolímero PHBV y del homopolímero PHV presentes en las dos etapas de la operación.

2. RESUMEN

La concentración atmosférica de N_2O ha aumentado de forma sustancial a lo largo de las últimas décadas, principalmente como resultado del desarrollo industrial, que ha afectado de forma significativa al ciclo global del nitrógeno en la atmósfera. La implementación de un tratamiento posterior de las emisiones atmosféricas de dichas actividades industriales cargadas de N_2O se convertirá en obligatorio para el futuro, debido a la elevada contribución de este GEI al calentamiento global. A este respecto, las biotecnologías podrían ofrecer una plataforma sencilla y rentable para su tratamiento. El proyecto se centró en el estudio de la eliminación biológica de N_2O de origen industrial junto con la coproducción simultánea de biopolímeros en columnas de burbujeo alimentadas con dos fuentes de donador de electrones. Se evaluó el tratamiento de emisiones atmosféricas cargadas con N_2O en dos columnas de burbujeo (R1 y R2), con 2,3 L de volumen de trabajo útil inoculados por igual con 1 L de inóculo de *Paracoccus denitrificans* y 1,3 L de medio mineral. La mezcla de gases sintética poseía las características típicas de la emisión de una planta de producción de ácido nítrico. La misma fue obtenida mezclando los gases de unas bombonas de N_2O (gas de calibración a 50000 ppm_v de N_2O en N_2 como matriz) y N_2 , además de aire proveniente de un compresor. En la etapa I, R1 y R2 se operaron de forma similar con metanol como donador de electrones, mientras que en la etapa II, metanol se usó en R1 y glicerol en R2). La eficiencia de eliminación del N_2O que presentó R1 fue del $88\pm 3\%$, mientras que en R2 se pudo registrar una eficiencia de eliminación del $88\pm 3\%$. Una vez realizado el cambio de fuente de carbono/energía de metanol a glicerol, la eficiencia de eliminación de R1 se mantuvo en un valor medio de $88\pm 5\%$. Del mismo modo, R2, cuyas condiciones de operación no fueron modificadas con respecto a la etapa I, presentó un leve incremento en la eficiencia de eliminación de N_2O ($91\pm 2\%$). La acumulación celular del copolímero PHBV en la etapa I en R1 y R2 se mantuvo similar en ambos reactores, con un contenido en estado estacionario de $44\pm 3\%$ y $44\pm 6\%$. Una vez realizado el cambio de fuente de carbono en el R1, la acumulación de PHBV se vio disminuida a valores cercanos a $23\pm 6\%$. Del mismo modo, la acumulación registrada en el R2 también disminuyó, aunque de forma menos considerable, llegando a una media de $29\pm 6\%$.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cambio Climático y Efecto Invernadero

La contaminación atmosférica forma parte de la vida moderna, como consecuencia del ritmo de vida actual que se ha instaurado en la sociedad: la construcción de ciudades, su distribución, el mercado de materiales, utilización de energía, etc. El aumento de la población junto con una industrialización conllevó a un aumento progresivo de esa contaminación en la atmósfera, lo que supone un mayor daño y riesgo para la seguridad y la salud de las personas y los ecosistemas naturales (Warner, 2004).

Uno de los principales problemas causados por el aumento de contaminantes atmosféricos es el llamado cambio climático. El Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC) define el cambio climático como una variación en el estado del clima identificable (por ejemplo, mediante análisis estadísticos) a raíz de un cambio en el valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades, y que persiste durante un período prolongado, generalmente cifrado en decenios o en períodos más largos. Denota todo cambio del clima a lo largo del tiempo, tanto si es debido a la variabilidad natural como si es consecuencia de la actividad humana. En la actualidad, el cambio del clima se encuentra originado por un calentamiento global (causado por factores antropogénicos), que hace referencia al aumento de la temperatura sobre la base de la temperatura media en toda la superficie de la Tierra (Figura 1).

La temperatura de la Tierra es resultado de un equilibrio entre la energía que recibe del Sol (radiación solar) y la energía que libera al espacio exterior. Alrededor de la mitad de la radiación solar que recibe la Tierra y su atmósfera se absorbe en la superficie. La otra mitad es absorbida por la atmósfera o vuelve a emitirse al espacio por las nubes, pequeñas partículas en la atmósfera, la nieve, el hielo y los desiertos en la superficie terrestre. Parte de la energía absorbida en la superficie terrestre vuelve a irradiarse a la atmósfera y al espacio en forma de energía calorífica o térmica. En la atmósfera, no toda la radiación térmica emitida por la Tierra alcanza el espacio exterior. Parte de esta es absorbida y reflejada de nuevo hacia la superficie de la Tierra por las moléculas de los gases de efecto invernadero (GEI) presentes en la atmósfera, lo que da lugar a una temperatura media global en torno a 14°C, muy superior a la temperatura de -19°C que sentiríamos sin el efecto invernadero natural. La acción del hombre influye de forma significativa sobre las concentraciones de algunos GEI, como el dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), aunque no así en otros, como el vapor de agua (WMO, 2015).

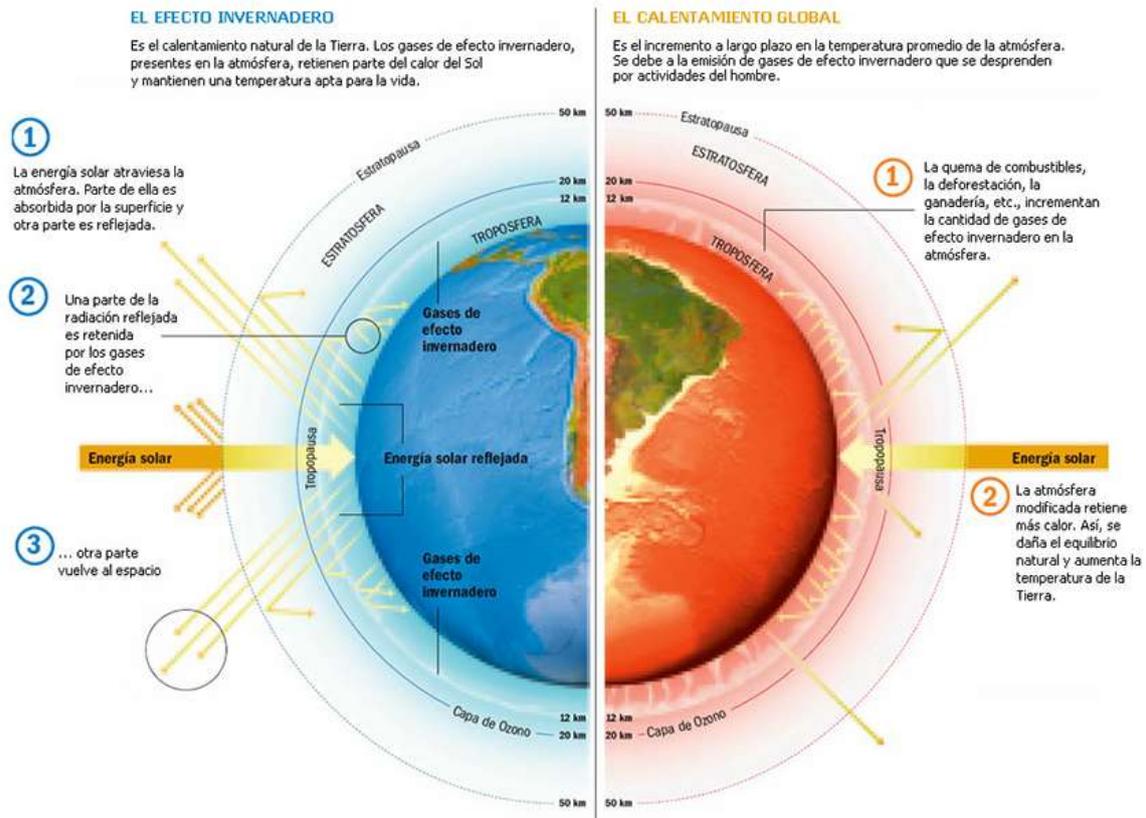


Figura 1. Esquema del calentamiento global y sus causas. (Fuente: IPCC, 2007)

En un acuerdo institucional conocido como el Protocolo de Kioto, que tuvo su origen en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático en 1992, se establecieron los objetivos de comunidad internacional en materia de reducción de emisiones de GEIs. En el caso de la Unión Europea, los objetivos para el año 2020 son:

- Reducción del 20% de las emisiones de gases de efecto invernadero con respecto a 1990
- 20% del consumo total de energía procedente de energías renovables
- Incremento del 20% de la eficiencia energética

Los dos gases más abundantes en la atmósfera, el nitrógeno (que representa el 78% de la atmósfera seca) y el oxígeno (que representa el 21%), apenas provocan efecto invernadero. En cambio, el efecto invernadero proviene de moléculas más complejas y mucho menos comunes. El vapor de agua es el gas de efecto invernadero más importante y el CO₂ es el segundo en importancia. El CH₄, el N₂O, el O₃ y otros gases presentes en la atmósfera en pequeñas cantidades contribuyen también al efecto invernadero (IPCC, 2007).

Dentro de estos, el N₂O será el GEI a estudiar en este trabajo por ser el tercer GEIs más relevante y aquel sobre el que existe un menor desarrollo de tecnologías de tratamiento. Este

compuesto es un gas inerte y tiene un potencial de calentamiento global 300 veces superior al del CO_2 . Su concentración atmosférica ha ido aumentando desde los 270 ppb_v previo al desarrollo industrial, hasta los 324 ppb_v que se reporta en la actualidad (con un incremento medio de 0,75 ppb_v por año). Entre 1960 y 1999, las concentraciones de N_2O crecieron a una velocidad dos veces mayor que cualquier período anterior (Figura 2). En la actualidad, las emisiones de N_2O representan un 6,2% del total de emisiones de GEIs (IPCC, 2013).

Las fuentes antropogénicas de N_2O a la atmósfera son aproximadamente un 40% del total de emisiones, mientras que las fuentes naturales de N_2O son aproximadamente un 60%. Entre las fuentes naturales del N_2O están los océanos, la oxidación química del amoníaco en la atmósfera y los suelos. Entre las actividades humanas que emiten N_2O se incluyen la transformación de fertilizantes de nitrógeno a N_2O y las emisiones posteriores de los suelos agrícolas, la quema de biomasa, la cría de animales y ciertas actividades industriales como la fabricación de ácido nítrico y adípico (Figura 3). La industria de producción de ácido nítrico (materia prima principal en la producción de nylon) es la fuente de N_2O de origen industrial más importante, con emisiones anuales promedio de 400 Kton de N_2O (Pérez- Ramírez *et al.*, 2002) y una composición típica de 100-3500 ppm_v de NO_x , 300-3500 ppm_v de N_2O , 1-4 % de O_2 y 0.3-2 % de H_2O (en una matriz de N_2) (Hussain *et al.*, 2014). Una vez emitido, el N_2O permanece en la atmósfera durante unos 114 años antes de su destrucción en la estratosfera (IPCC, 2008).

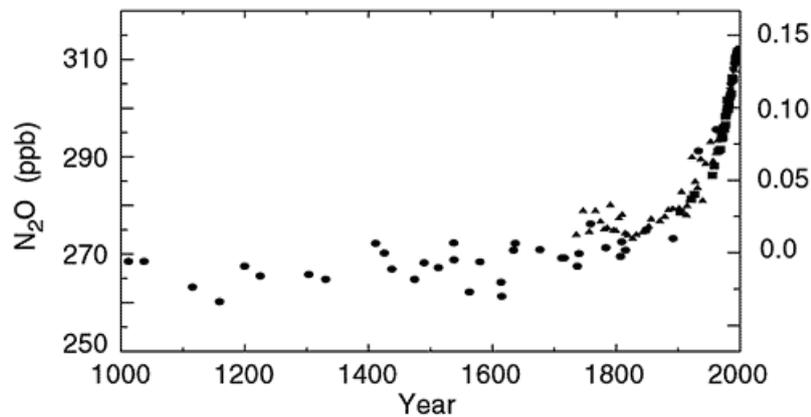


Figura2. Evolución de la concentración del óxido nitroso en la atmósfera. (Fuente: IPCC, 2013)

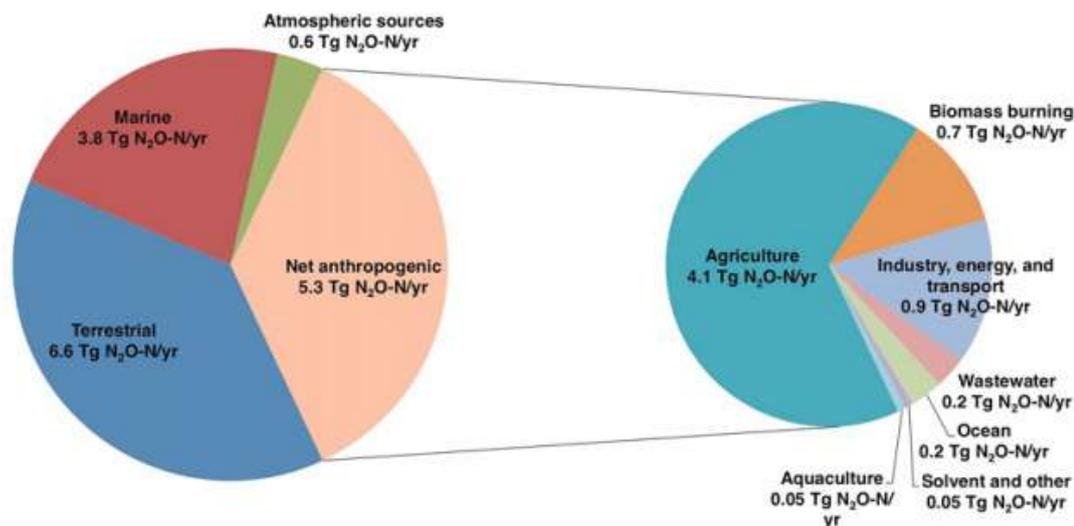


Figura 3. Emisiones de N₂O naturales frente a emisiones antropogénicas en el año 2005 y las fuentes de generación. (Fuente: Davidson *et al.*, 2014)

3.2. Eliminación del N₂O

Hasta la fecha, la investigación sobre el control de emisiones de N₂O ha sido principalmente enfocado en la minimización y/o la prevención de la generación de N₂O y su liberación a la atmósfera (López *et al.*, 2013). Sin embargo, es probable que la implementación de estrategias de control de N₂O se convierta en obligatoria en los próximos años debido a la elevada contribución de este GEI al calentamiento global, como ya se ha mencionado. Solamente las tecnologías fisicoquímicas tales como la descomposición térmica, reducción catalítica o la adsorción se han utilizado para la eliminación de N₂O en emisiones industriales. La aplicación de estos métodos de reducción de N₂O por lo general implica el consumo de productos químicos costosos y/o peligrosos, un elevado aporte de energía y la generación de contaminantes secundarios.

Por el contrario, las biotecnologías podrían ofrecer una plataforma más sencilla y rentable para la eliminación de N₂O puesto que sus requerimientos energéticos son menores y no es necesaria la utilización de peligrosos productos químicos o catalizadores. Además, los productos finales derivados de la biodegradación de N₂O (CO₂, N₂ y de biomasa) presentan una naturaleza inocua (Devinny *et al.*, 1999; Boswell, 2001). Aunque el número de estudios sobre la aplicación de reactores biológicos para la eliminación de N₂O es escasa, el potencial para el tratamiento de diferentes gases contaminantes ha sido demostrado en diversos estudios (López *et al.*, 2013; Desloover *et al.*, 2011; Utami *et al.*, 2012; Frutos *et al.*, 2014; Frutos *et al.*, 2016). En este sentido, resulta imperante el estudio de sistemas biológicos

medioambientalmente sostenibles para el tratamiento de N₂O de origen industrial y así hacer frente a las actuales y futuras exigencias de control de emisiones de manera sustentable.

3.3. Producción de biopolímeros

Desde la revolución industrial, la actividad humana se ha centrado en el crecimiento económico y en el aumento del nivel de vida. El bienestar se ha asociado a la idea de alcanzar niveles cada vez más elevados de producción, abastecimiento, comunicaciones, transportes, etc. La problemática deriva en que cuanto más se consume, se requieren más recursos y se generan más residuos. A este respecto, merece la pena mencionar los residuos generados por materiales plásticos, que se han convertido en un material muy popular y con múltiples usos. El plástico es sencillo de fabricar, y dura mucho tiempo, por lo que fácilmente en la vida cotidiana es convertido en residuo. Los plásticos producidos en base a derivados del petróleo, un recurso no renovable, son materiales poco biodegradables en el ambiente, por lo que su disposición genera un problema de acumulación en los rellenos sanitarios y en la actualidad hasta en los océanos. En base a esta problemática, muchos avances se han logrado en la producción de biopolímeros biodegradables y de fuentes renovables que poseen características similares a aquellos convencionales derivados del petróleo.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son los biopolímeros usualmente estudiados para la producción de bioplásticos o plásticos biodegradables. Los PHAs son compuestos de reserva producidos por bacterias sometidas a condiciones de estrés (limitación de ciertos elementos como el fósforo, nitrógeno o la falta de oxígeno en exceso de carbono), las cuales los sintetizan en varias formas químicas. Los PHAs mayormente estudiados son el polihidroxibutirato (PHB) y el copolímero Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Estos comparten con los polímeros convencionales (derivados del petróleo) propiedades físico/químicas similares como punto de fusión, peso molecular y resistencia a la tracción, lo que los convierte en una alternativa respetuosa con el medio ambiente por su biodegradabilidad y su origen renovable (Chanprateep, 2010). Estos PHAs biosintéticos han recibido atención como fuentes para el desarrollo de nuevos materiales plásticos biodegradables, que como ya se ha mencionado, evitarían la problemática de la generación de residuos.

Entre las aplicaciones potenciales de los PHA se encuentran las industrias químicas y farmacéuticas, principalmente debido a su biodegradabilidad. Por ejemplo, el polihidroxibutirato, primer miembro conocido de esta familia, tiene propiedades mecánicas semejantes a la del polipropileno, con la ventaja agregada ya mencionada de su biodegradabilidad. Sin embargo, en la actualidad no es un material que pueda desplazar al polipropileno, debido a que la diferencia de precio es muy grande. Su biodegradabilidad los convierte en potenciales materiales de reemplazo de tejidos muertos o no funcionales, soporte para liberación lenta de medicamentos o de crecimiento de células, material de sutura y de recubrimiento de implantes, etc. Muchos son los microorganismos capaces de producir

estos compuestos de interés bajo ciertas condiciones de crecimiento. Algunas de las especies más conocidas son *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Ralstonia eutropha*. Estos microorganismos han demostrado una gran capacidad de acumulación de PHA (del 10 al 70% de peso de la biomasa) bajo diferentes condiciones de crecimiento y sustratos (Yamane, 1996; Saharan *et al.*, 2014).

En este contexto, la aplicación de sistemas biológicos para el tratamiento de emisiones industriales de N₂O como las producidas en las plantas de producción de ácido nítrico capaces de sintetizar un compuesto de valor añadido como los PHAs, puede resultar en una interesante alternativa para rentabilizar los sistemas de eliminación de estos gases contaminantes y mitigar el avance del calentamiento global por factores antropogénicos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudio de la eliminación biológica de N_2O de origen industrial junto con la coproducción simultánea de biopolímeros en columnas de burbujeo alimentadas con dos fuentes de donador de electrones.

4.2. Objetivos específicos

Evaluar la eficacia de dos columnas de burbujeo, inoculadas con un cultivo desnitrificante de *Paracoccus denitrificans*, para la eliminación biológica del N_2O presente en emisiones de plantas de producción de ácido nítrico.

Estudio de la capacidad de acumulación de PHBV del cultivo desnitrificante utilizando metanol y glicerol como fuentes de carbono/energía en el proceso de eliminación del N_2O .

Influencia del tipo de fuente de carbono/energía en los principales parámetros microbiológicos del proceso.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de microorganismos

El inóculo utilizado en esta experimentación proviene de un biorreactor operado por un periodo de 180 días con metanol como fuente de carbono/energía y N_2O como aceptor de electrones. Dicho reactor fue inicialmente inoculado con la cepa *Paracoccus denitrificans* (DSM 413) adquirida de la empresa DSMZ (Braunschweig, Alemania) y al inicio de este experimento la abundancia de la cepa cultivada constituía más del 50 % de la población bacteriana, como se estimó de una análisis del cultivo por FISH (Figura 4).

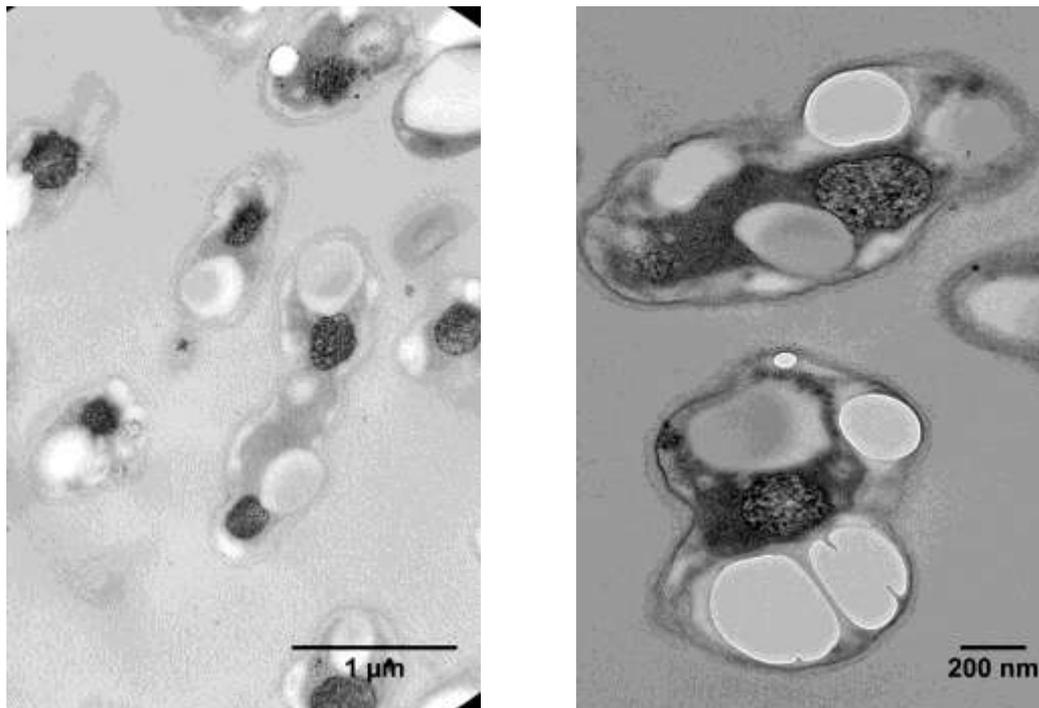


Figura 4. Bacteria *Paracoccus denitrificans*, vistas al microscopio. (Fuente: propia)

5.2. Equipo experimental

El sistema propuesto para el tratamiento de N_2O de origen industrial estuvo compuesto de dos columnas de burbujeo (R1 y R2, ambas de cristal), con 2,3 L de volumen de trabajo útil inoculados por igual con 1 L de inóculo y 1,3 L de medio mineral (ver anexo).



Figura 5. Sistema experimental empleado para la degradación de N₂O mediante desnitrificación heterotrófica. (Fuente: Propia)

La mezcla de gases sintética poseía las características típicas de la emisión de una planta de producción de ácido nítrico. La misma fue obtenida mezclando los gases de unas bombonas de N₂O (gas de calibración a 50000 ppm_v de N₂O en N₂ como matriz) y N₂, además de aire proveniente de un compresor. Los diferentes flujos de gases fueron regulados mediante controladores de flujo másico (Aalborg, Dinamarca) y rotámetros (Figura 5 y 6). De este modo se consiguió una composición media de 3540±387 ppm_v de N₂O con 1,07±0,07% de O₂ en N₂ a la entrada del R1 y 3517±409 ppm_v de N₂O con 1,08±0,07% de O₂ en N₂ a la entrada del R2. Los reactores R1 y R2 fueron operados a unos flujos de gases de entrada de 141±5,95 y 138,4±6,54 mL min⁻¹ respectivamente, resultando en un tiempo de residencia del gas (TRG) cercano a los 17 min.

Metanol (CH₃OH) puro fue añadido al sistema por medio de una bomba de jeringa conectada a la línea de gases antes de la entrada a ambos reactores. Mediante este sistema experimental, el metanol se volatilizaba para ser posteriormente transferido desde la emisión contaminante al caldo de cultivo, para su uso como fuente de carbono y donador de electrones por *P. denitrificans*. Los sistemas fueron operados en una habitación de temperatura controlada a 25°C. Por su parte, el glicerol fue inyectado también mediante una bomba de jeringa, pero en

este caso directamente al biorreactor en forma de dilución acuosa a una concentración de 441 g glicerol L⁻¹.

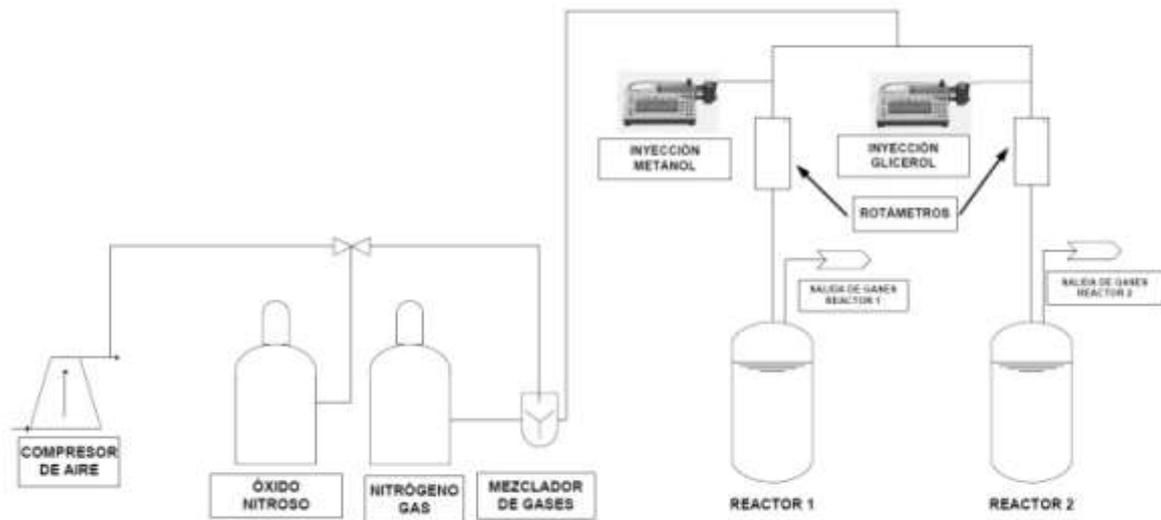


Figura 6. Esquema del proceso de biodegradación biológica de N₂O empleado metanol y glicerol (Fuente: Propia)

4.3. Condiciones de operación

Se diferenciaron dos etapas durante el transcurso del experimento con el fin de evaluar la eficiencia de la eliminación de N₂O y la acumulación celular del biopolímero PHBV. En la primera etapa (Etapa I), ambos reactores fueron operados con CH₃OH como la única fuente de carbono/energía para los procesos metabólicos con una carga de carbono de 139 g C m⁻³ d⁻¹. Esta etapa I tuvo una duración de 64 días. En la Etapa II (días 65 al 100), la fuente de carbono de R1 fue remplazada por glicerol manteniendo la misma carga de carbono que en la etapa anterior, mientras que R2 fue operado bajo las mismas condiciones de la etapa inicial, a modo de reactor control.

Se tomaron muestras diarias del gas entrante y saliente para el análisis de N₂O, O₂ y CO₂, así como la presión de la corriente gaseosa de entrada en ambos sistemas. Cada cuatro días se tomaron muestras de 300 mL de caldo de cultivo de ambos reactores, sustituyéndose ese mismo volumen por medio mineral (ver anexo). El bajo contenido de nitrógeno (NH₄Cl) en el medio mineral resultó en una carga diaria de 2,2 g N m⁻³ d⁻¹, la cual permitía la operación bajo el régimen de abundancia/limitación del nutriente y por consiguiente se favoreció la producción del biopolímero de interés. De los 300 mL extraídos de cada reactor, se determinaron las concentraciones de carbono orgánico total (COT), carbono inorgánico (CI), nitrógeno total (NT), CH₃OH disuelto, glicerol (solo en la etapa II), PHBV y sólidos suspendidos totales (SST).

Alumno: Barriguín García, Gonzalo

Titulación: Máster en Ingeniería Ambiental- Escuela de Ingenierías industriales
Universidad de Valladolid

4.4. Procedimiento analítico

Las concentraciones de CO₂, N₂ y O₂ se analizaron mediante un cromatógrafo de gases con un detector de conductividad térmica (Bruker 430-GC-TCD, Palo Alto, EE.UU.) equipado con columnas CP-Molsieve5A (15 m x 0.53 μm x 15 μm) y CP-PoraBOND Q (25 m x 0.53 μm x 10 μm) con temperaturas de detector, inyector y horno de 200, 150 y 40°C respetivamente. La concentración de N₂O se determinó mediante un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (BrukerScion 436-GC-ECD, Palo Alto, EE.UU.) equipado con una columna empacada HS-Q (1m x 2 mm x 3.18 mm) con temperaturas de detector, inyector y horno de 300, 100 y 40°C, respectivamente. Las concentraciones de COT, CI y NT fueron determinadas mediante el uso de un analizador Shimadzu TOC-VCSH (Japón), equipado con un módulo de quimioluminiscencia TNM-1. La concentración de CH₃OH se determinó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (Bruker 3900 GC-FID, Palo Alto, EE.UU.) equipado con una columna capilar Supelcowax (15 m x 0,25 mm x 0,25 m). Las temperaturas del inyector y del detector del cromatógrafo se mantuvieron a 200 y 250 °C, respectivamente.

El pH fue determinado mediante un medidor de pH Crison basic 20. Los sólidos suspendidos totales se realizaron siguiendo el protocolo de métodos estandarizados (APHA 2005).

Para la determinación de glicerol, se utilizó el método desarrollado por Sluiter *et al.*, (2008), para la determinación de los azúcares o sus derivados, y productos de degradación en muestras de proceso fracción líquida, mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con una columna HPX-87H de Bio-Rad a 50°C con 5mM de H₂SO₄ como fase móvil a 0,6 ml/min⁻¹. El detector utilizado fue el de índice de refracción (Waters, 2414). Se prepararon patrones de 0,05 a 0,8 g L⁻¹ para la recta de calibrado en el análisis.

Para cuantificar la concentración de PHBV, 2 ml del caldo de cultivo se centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min y el pellet de la biomasa obtenida fue procesado de acuerdo con Zuñiga *et al.*, (2011), utilizando cloroformo como disolvente de extracción. El PHBV extraído se midió mediante un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas (Agilent Technologies: GC System 7820A MSD 5977E, Santa Clara, EE.UU.) equipado con una columna DB-WAX (30 m x 250 m x 0,25 m) con las temperaturas del detector y el inyector a 250 °C. La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 40 ° C durante 5 min, se incrementó a una velocidad de 10 °C min⁻¹ hasta 200 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 5 min. Las muestras fueron inyectadas con una relación de split de 1:10.



Figura 7. Instrumentación analítica utilizada en el laboratorio para la monitorización de los reactores. De izquierda a derecha: bomba de jeringa, analizador COT/NT, medidor de pH, cromatógrafos de gases ECD, FIC, TCD y cromatógrafo de masas. (Fuente: propia)

4.5. Cálculos realizados

La concentración de entrada de CO_2 fue calculada en base a la siguiente expresión, en $g\ m^{-3}$:

$$CO_2(entrada) = \frac{\frac{A}{d}}{1 + \frac{P}{1000}}$$

Donde A es el área de entrada de CO_2 al sistema medida con el cromatógrafo, P la presión de entrada al sistema en mbar y d la pendiente de la recta de calibrado.

La concentración de salida de CO_2 , por el contrario, se mide por otra expresión:

$$CO_2(salida) = \frac{A}{d}$$

La producción de $CO_2(g\ m^{-3}\ d^{-1})$ se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$Producción\ CO_2 = \frac{(CO_{2salida} - CO_{2entrada}) * F}{V_r}$$

Donde F es el flujo de la corriente gaseosa de entrada al reactor y V_r es el volumen del reactor.

La concentración de entrada de N₂O fue calculada a partir de la siguiente ecuación, en ppm_v:

$$N_2O \text{ (entrada)} = \frac{\frac{A}{d}}{1 + \frac{P}{1000}}$$

Donde P es a presión de entrada al sistema, A el promedio de áreas obtenidas en el cromatógrafo y d es la pendiente de la recta de calibrado.

La concentración salida de N₂O se calcula a partir de la siguiente expresión, expresada como ppm_v:

$$N_2O \text{ (salida)} = \frac{A}{d}$$

Donde A es el promedio de áreas obtenidas en el cromatógrafo de gases-ECD correspondientes a la salida del sistema y d es la pendiente de la recta de calibrado.

Para la eliminación del óxido nitroso, se emplea la siguiente ecuación, expresada en %:

$$\text{Eliminación} = \frac{[N_2O \text{ entrada}] - [N_2O \text{ salida}]}{[N_2O \text{ entrada}]} * 100$$

La concentración de entrada de metanol en fasegas al sistema se puede calcular mediante la siguiente expresión, en mg L⁻¹:

$$CH_3OH \text{ (entrada)} = \frac{\frac{A}{d}}{1 + \frac{P}{1000}}$$

Donde P es a presión de entrada al sistema medida en mbar, A el promedio de áreas obtenidas en el cromatógrafo de gases-FID y d es la pendiente obtenida en la recta de calibrado.

La salida de CH₃OH se calcula a partir de la siguiente expresión, expresada como mgL⁻¹:

$$CH_3OH \text{ (salida)} = \frac{A}{d}$$

Para calcular la concentración de metanol disuelta en el medio de cultivo, la calculamos de la siguiente forma:

$$CH_3OH \text{ (disuelto)} = \frac{A}{d}$$

Para el cálculo del porcentaje de acumulación celular del copolímero PHBV, se utilizó la siguiente expresión:

$$PHBV (\%) = \left(\frac{PHBV_c * V_d}{SST * V_p} \right) * 100$$

Donde $PHBV_c$ es la concentración de biopolímero obtenida por el análisis cromatógrafo, SST es la concentración de la biomasa en cada reactor medida como sólidos suspendido total, V_d y V_p corresponden al volumen de cloroformo añadido a los pellets de biomasa centrifugada para su digestión, y al volumen de la muestra del cultivo centrifugada para su digestión. Se utilizó un patrón de PHBV de pureza superior a 99% con una razón molar del homopolímero PHV de 12% equivalente a relación masa/masa de 14% del copolímero PHBV (Sigma-Aldrich, Madrid).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Eficacia de la eliminación del N₂O con diferentes fuentes de carbono/energía

A lo largo de las dos etapas de operación, el pH se mantuvo constante en los dos reactores, independientemente de las condiciones de operación y de la fuente de carbono y donador de electrones empleadas. De esta forma, el pH del R1 se mantuvo en $6,87 \pm 0,1$, mientras que en el R2 permaneció con un pH de $6,82 \pm 0,03$ a lo largo de todo el experimento.

Del mismo modo, la eficiencia de eliminación del N₂O observada en ambos reactores se mantuvo similar en la etapa I. De media, R1 presentó una eficiencia de eliminación del $88,5 \pm 3\%$, mientras que en R2 se pudo registrar una eficiencia de eliminación del $87,8 \pm 3\%$ (Figura 8).

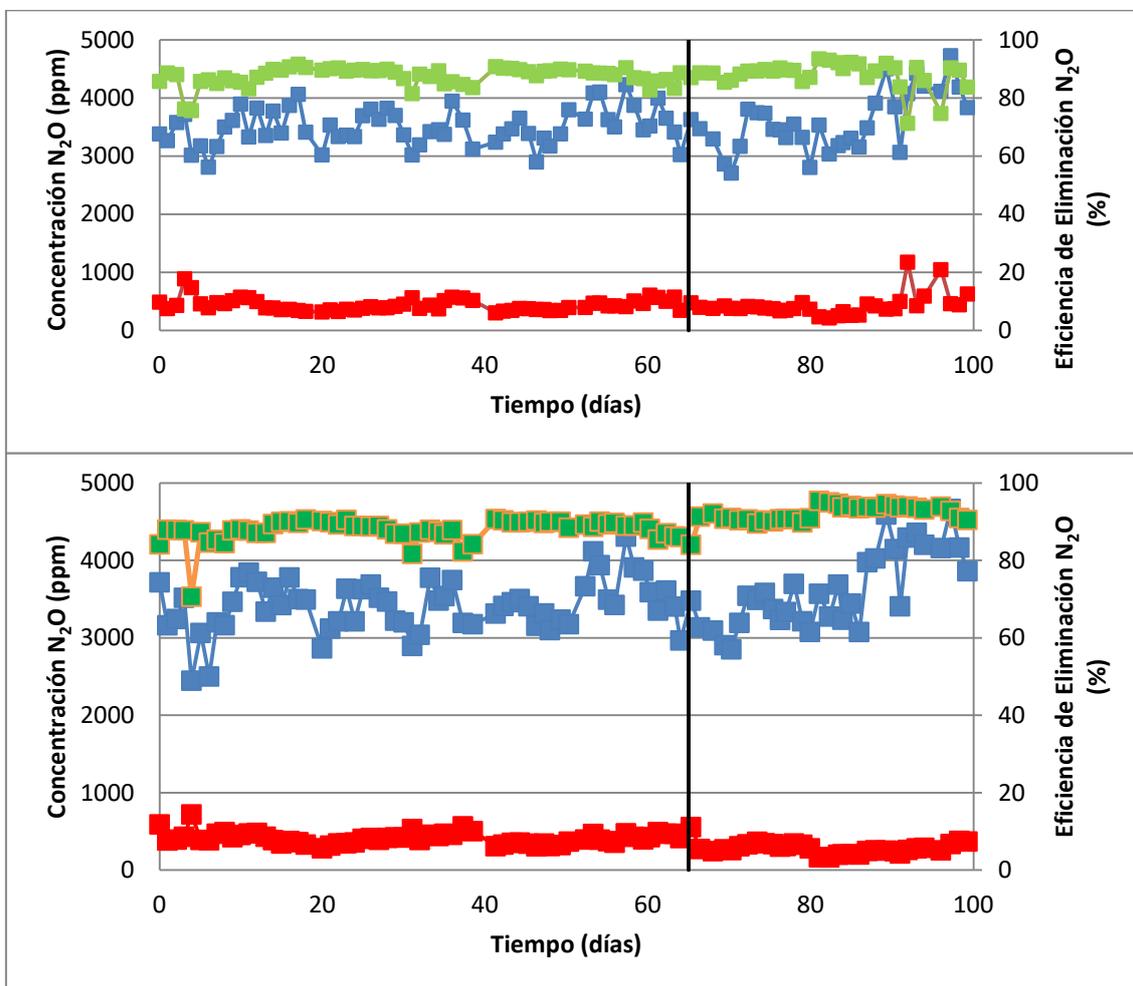


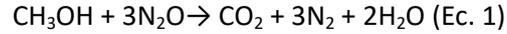
Figura 8. Valores de concentración de N₂O gas a la entrada (línea azul) y salida (línea roja) con el porcentaje de eliminación (línea verde) del N₂O en el R1 (figura superior) y R2 (figura inferior). La línea negra indica el inicio de la etapa II (Fuente: propia).

Alumno: Barriguín García, Gonzalo

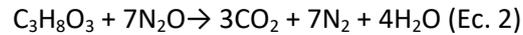
Titulación: Máster en Ingeniería Ambiental- Escuela de Ingenierías industriales

Universidad de Valladolid

Durante la etapa I, la eliminación de N₂O tuvo lugar mediante desnitrificación anóxica en la que la que el metanol aportó el carbono necesario para el crecimiento de *P. denitrificans* y la acumulación de PHBV, y los electrones para llevar acabo la reducción de N₂O a N₂. La ecuación 1 muestra la estequiometria de la reducción de N₂O con metanol:



A partir del día 65 de operación se realizó el cambio de fuente de carbono y donador de electrones (etapa II). Este cambio no resultó en ninguna variación en la eficiencia de eliminación de R1, donde se mantuvo un valor medio de 88±5%. Del mismo modo, R2, cuyas condiciones de operación no fueron modificadas con respecto a la etapa I, presentó un leve incremento en la eficiencia de eliminación de N₂O (91±2%) aunque podría considerarse insignificante debido a la desviación de los valores de concentración y eliminación de N₂O. El glicerol durante esta etapa II permitió la reducción de N₂O a N₂ de acuerdo a la ecuación 2.



En cuanto a la producción de CO_2 generada por la oxidación bacteriana de la fuente de carbono, el R1 en la etapa I registró una producción media de $296 \pm 16 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de CO_2 (Figura 9). Por otro lado, la producción de CO_2 observada en R2 se mantuvo en una media de $281 \pm 15 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de CO_2 en la etapa I. Una vez realizado el cambio correspondiente a la etapa II, se pudo comprobar un aumento de la producción de CO_2 en R1, con una producción promedio de CO_2 de $334 \pm 27 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Por su parte, R2 mantuvo una producción de $302 \pm 20 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ de CO_2 , similar a la registrada en la etapa I (Figura 9).

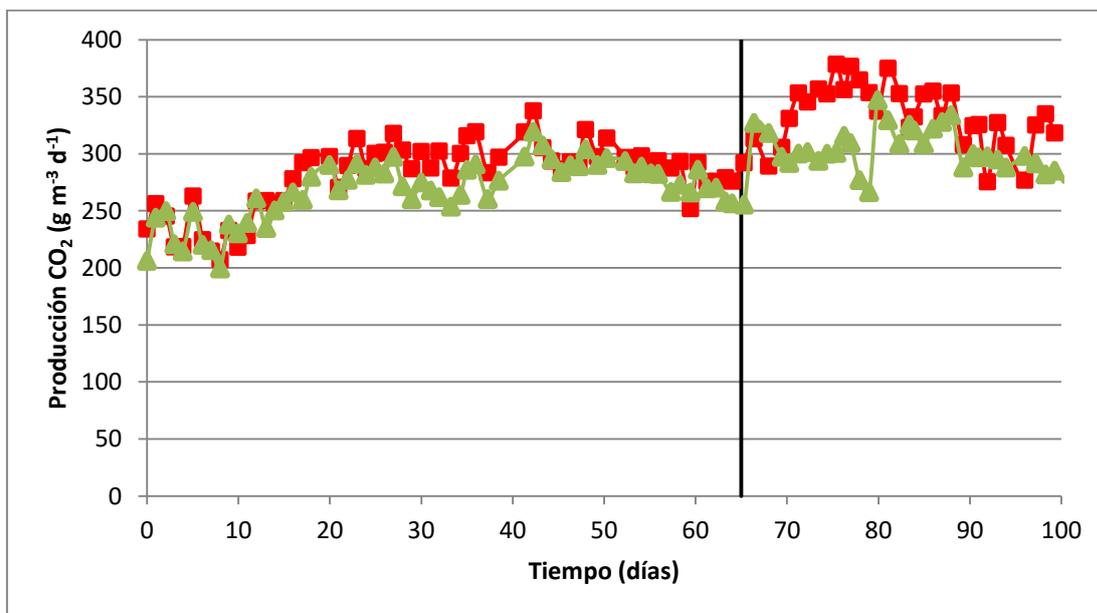


Figura 9. Producción de CO_2 en R1 (línea roja) y el R2 (línea verde) durante la reducción biológica de N_2O . La línea vertical negra representa el momento del cambio de la fuente de carbono/energía. (Fuente: propia)

La concentración de sólidos observada al inicio de la operación de ambos reactores fue de aproximadamente $500 \text{ mg SST L}^{-1}$, la cual fue aumentando hasta llegar a unos valores estables después de algo más de 30 días de operación. Así, las concentraciones de SST registradas durante el estado estacionario en la etapa I en R1 fueron de $1242 \pm 154 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que las registradas en R2 fueron de $1087 \pm 53 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 10). Esta diferencia observada concuerda con la mayor producción de CO_2 descrita en el párrafo anterior, donde el R1 presentó una mayor producción de dióxido de carbono debido a una mayor concentración de sólidos (SST) en el sistema. Posteriormente al cambio de fuente de carbono en R1, se observó un aumento paulatino de la concentración de sólidos totales en el cultivo, llegando a un promedio de $2167 \pm 280 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 10). Fue difícil estimar si este aumento pueda atribuirse al cambio de la fuente de carbono, debido a que la concentración de SST en R2 registró un aumento similar, llegando a valores medios de $1603 \pm 92 \text{ mg L}^{-1}$. Sin embargo, sí se puede considerar la diferencia de concentraciones de biomasa observadas en los reactores como significativa teniendo en cuenta que el glicerol es un compuesto orgánico energéticamente más favorable que el metanol para la reducción de N_2O , y esto pudo haber repercutido en un mayor crecimiento

celular en R1. Por otro lado, el aumento inesperado en la concentración de sólidos del R2 pudo haberse debido a una contaminación del medio de cultivo por parte de otras bacterias capaces de emplear N_2O como aceptor de electrones y metanol como fuente de carbono y energía. Como bien puede observarse, los sistemas no llegaron a un estado estacionario hasta después de 30 días de operación, lo que confirma las bajas velocidades de crecimiento de la bacteria *Paracoccus denitrificans*. En este sentido, una contaminación con otras especies que dispongan de una tasa de crecimiento más elevada conllevaría a un aumento de la concentración de sólidos en los reactores.

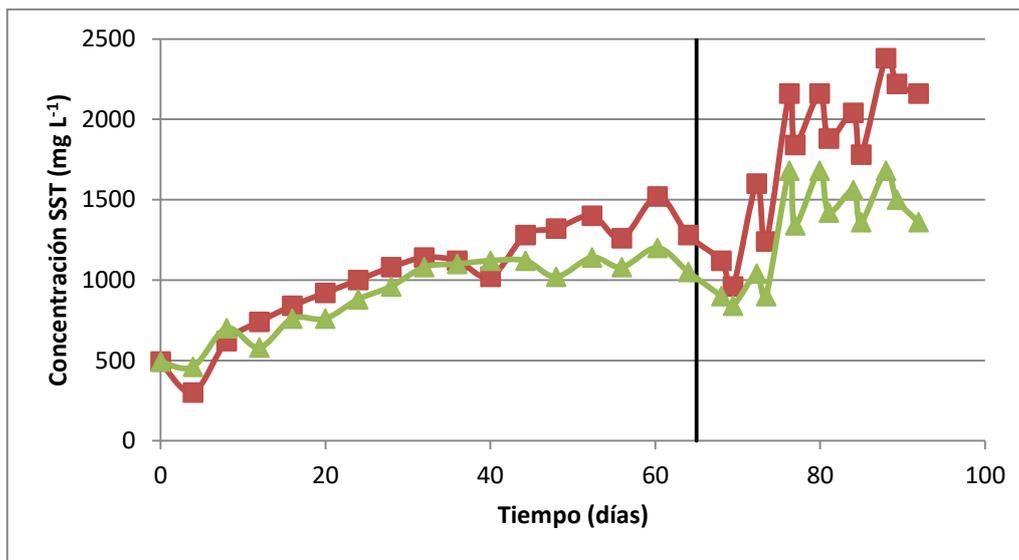


Figura 10. Evolución con el tiempo de la concentración de sólidos suspendidos totales. La línea roja representa la concentración de biomasa en R1, mientras que la línea verde representa la concentración de biomasa en R2, en las mismas unidades. La línea vertical negra representa el momento del cambio de fuente de energía. (Fuente: propia)

El hecho de que el aumento en la concentración de biomasa en ambos reactores durante la etapa II no conllevara un aumento en la eficiencia de eliminación de N_2O confirmó que el proceso de biodegradación de N_2O en ambos sistemas estuvo limitado por el transporte de N_2O desde la emisión gaseosa al medio de cultivo que contiene los microorganismos.

Por otro lado, la adición de metanol al sistema para mantener concentraciones de carbono en exceso en la etapa I conllevó una concentración promedio de COT de 370 ± 56 mg L⁻¹ y 452 ± 79 mg L⁻¹ en el caldo de cultivo de R1 y R2, respectivamente (Figura 11). La mayor acumulación de carbono orgánico disuelto en R2 pudo estar correlacionada con una menor concentración de los SST, de forma que no todo el carbono suministrado se utilizó para la reducción de N_2O . La estabilización de los valores de COT en esta primera etapa coincide con la llegada a estado estacionario de los valores de SST.

En la etapa II, con el suministro de glicerol como la fuente de carbono en R1 se pudo observar una disminución paulatina de la disponibilidad de COT en el medio. Llegado el día 84 de operación, el sistema entra en un estado estacionario donde la concentración de COT promedio fue $75 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$. La presencia de COT en R1 pudo deberse a metabolitos liberados por la actividad biológica bacteriana, debido a que no se detectó glicerol en los análisis realizados. Por otro lado, los valores de COT en R2 se mantuvieron relativamente constantes aunque con una disminución ($416 \pm 22 \text{ mg L}^{-1}$) en comparación a la etapa anterior debido, probablemente, al aumento en la concentración de los SST.

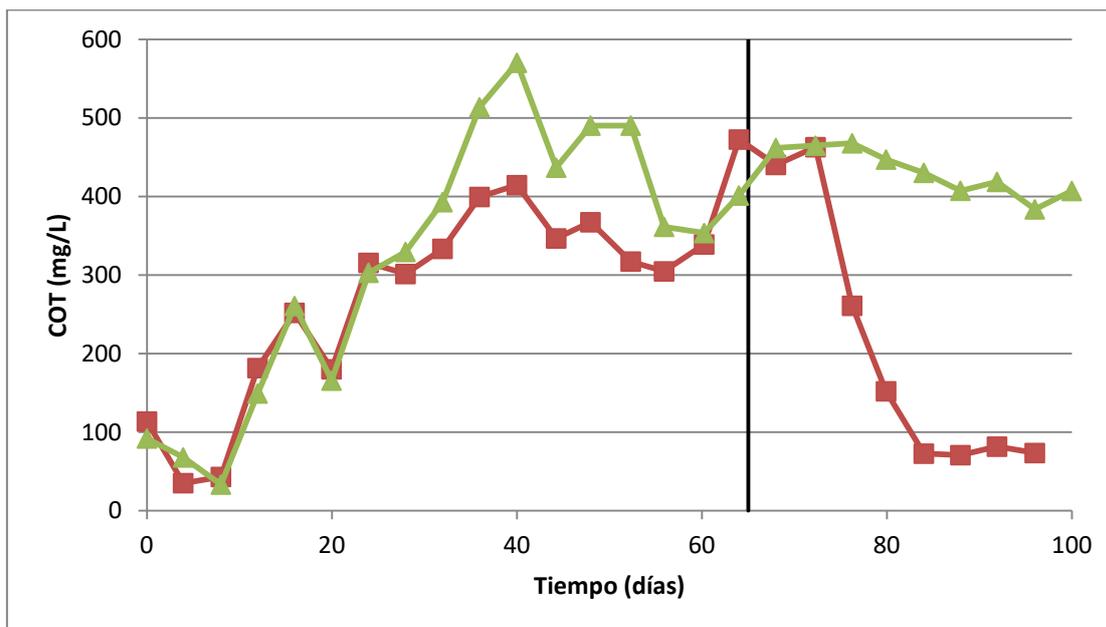


Figura 11. Concentración de COT en R1 (línea roja) y R2 (línea verde). La línea vertical negra representa el momento del cambio de la fuente de carbono (Fuente: propia).

5.2. Acumulación de PHBV durante la eliminación de N_2O

En la etapa I, la acumulación celular del copolímero PHBV en R1 y R2 se mantuvo similar en ambos reactores, con un contenido en estado estacionario de $44 \pm 3\%$ y $44 \pm 6\%$. Una vez realizado el cambio de fuente de carbono en el R1, la acumulación de PHBV se vio disminuida a valores cercanos a $23 \pm 6\%$ (Figura 12). Del mismo modo, la acumulación registrada en el R2 también disminuyó, aunque de forma menos considerable, llegando a una media de $29 \pm 6\%$. Esta disminución en la capacidad de acumulación del biopolímero en R2, a pesar de no haber sufrido ninguna variación en las condiciones de operación, pudo haber sido consecuencia de la contaminación biológica del mismo. En este contexto, microorganismos que no poseen la capacidad de sintetizar este compuesto como una reserva energética pudieron haberse desarrollado en el cultivo, desplazando a aquellos con la capacidad de producir PHBV.

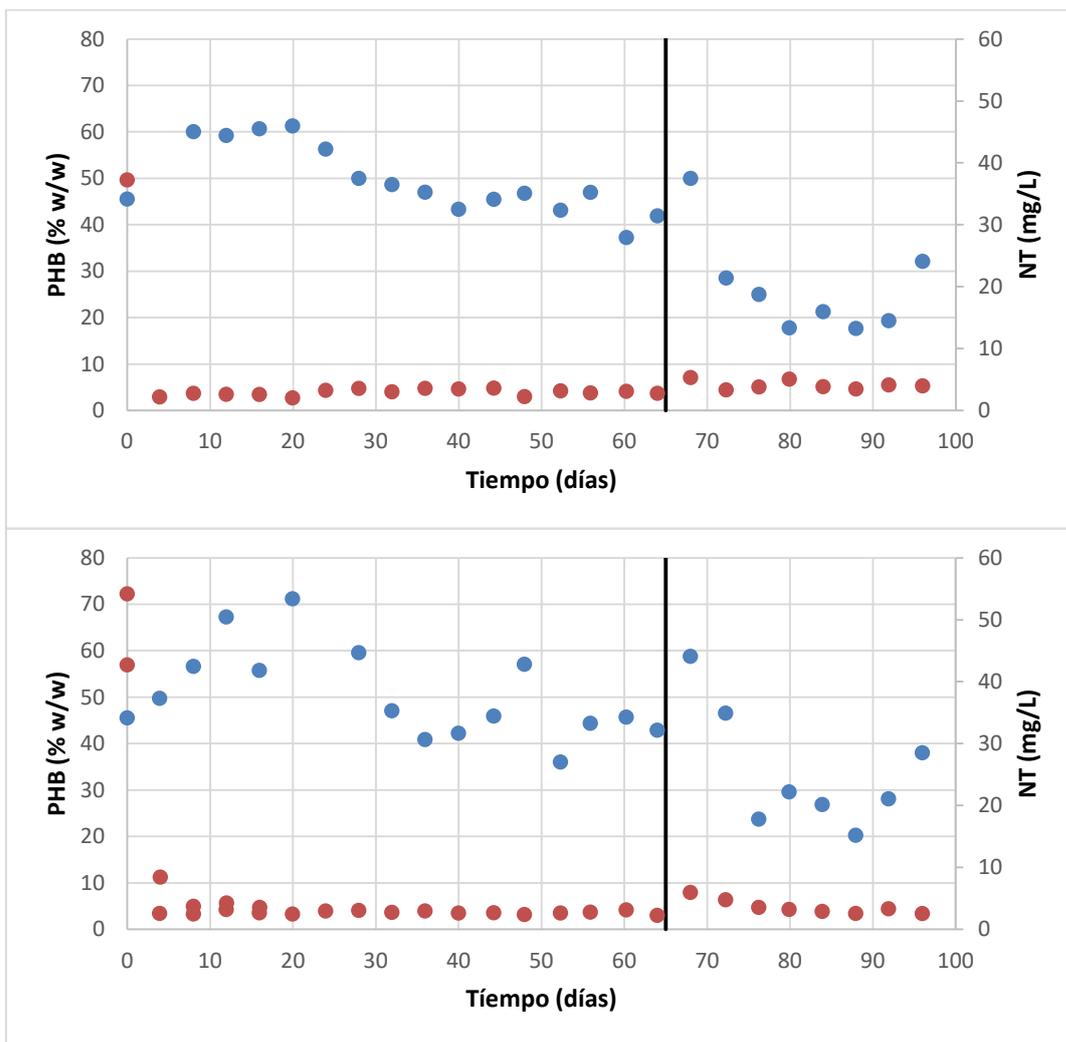


Figura 12. Evolución con el tiempo de la concentración de PHB (puntos azules) y nitrógeno total presente en el reactor (puntos rojos). La gráfica superior representa R1 mientras que la gráfica inferior representa R2. (Fuente: propia)

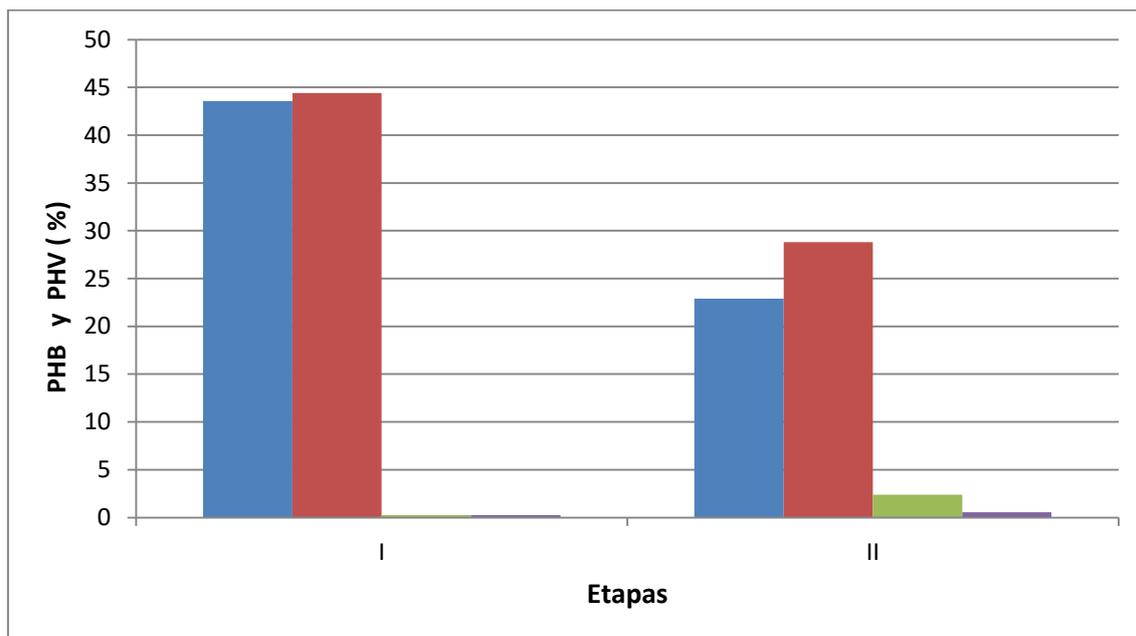


Figura 13. Contenido intracelular del polímero PHBV (en azul en R1 y en rojo el R2) y del homopolímero PHV (en verde el R1 y en morado el R2) en las dos etapas de operación (Fuente: propia)

Por otro lado, es importante destacar el efecto de la fuente de carbono en la síntesis del homopolímero PHV dentro del copolímero PHBV. En este sentido, mediante los análisis efectuados con el cromatógrafo de masas, se pudo observar que en la Etapa I la síntesis de PHV dentro del copolímero PHBV presentaba solamente un 0,57% en ambos reactores. Sin embargo, después del cambio de fuente de carbono/energía en la Etapa II se registró una composición de PHV media de más del 1,7% en R1. Por otro lado, el cultivo en R2 no presentó variación significativa en lo que respecta a la proporción de PHV/PHBV, manteniéndose en el 1% aproximadamente. Estos resultados demuestran que el glicerol puede ser una fuente alternativa interesante cuando se requiere de biopolímeros con características específicas. A modo de ejemplo, las propiedades físico-químicas del copolímero PHBV mejoran al aumentar la proporción de homopolímero PHV. Un mayor ratio PHV/PHBV confiere al polímero una menor cristalinidad y punto de fusión, lo que aumenta el rango de aplicación del mismo.

6. CONCLUSIONES

1. La eficiencia de eliminación del N_2O observada en ambos reactores se mantuvo similar en la etapa I. La adición de glicerol en lugar de metanol como fuente de carbono y energía no conllevó una variación significativa en la capacidad de eliminación de N_2O del sistema.
2. La adición de glicerol en R1 conllevó un aumento en la concentración de biomasa, aumento que también se registró en reactor suplementado con metanol, aunque no de forma tan elevada. Mientras que el aumento en R1 se pudo deber a la mejor asimilación de glicerol por parte de *P. denitrificans*, el aumento en R2 se debió a la contaminación del cultivo.
3. El aumento en la concentración de biomasa en la etapa II no resultó en un aumento en la eficiencia de eliminación del GEI modelo en ninguno de los sistemas, lo que indicó que la eliminación de N_2O estuvo limitada por el transporte de N_2O desde la fase gas al medio de cultivo.
4. Los sistemas no alcanzaron un estado estacionario hasta después de 30 días de operación, lo que confirmó el crecimiento lento de la bacteria *Paracoccus denitrificans*.
5. La producción del copolímero PHBV fue similar en ambos reactores cuando se alimentaron con metanol. La adición de glicerol conllevó menores contenidos de biopolímero que en la etapa I, aunque similares a los obtenidos en la etapa II con metanol debido a la contaminación del cultivo. El uso de metanol como fuente de carbono y energía soportó un aumento del porcentaje de PHV en el copolímero.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Europea del Medio Ambiente (2016) <http://www.eea.europa.eu/es>
- APHA (2005) *Standard methods for the examination of water and waste water*, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC.
- Boswell, J. (2001) *Understand the capabilities of bio-oxidation*. ChemEngProg 98:48–53
- Chanprateep, S. (2010). *Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates*. Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand.
- Davidson, E., Kanter, D. (2014) *Inventories and scenarios of nitrous oxide emissions*. Environmental Research Letters.
- Desloover, J., Puig, S., Viridis, B., Clauwaert, P., Boeckx, P., Verstraete, W., Book, N. (2011) *Biocathodic nitrous oxide removal in bioelectrochemical systems*. Environ Sci Technol 45:10557–10566
- Devigny, J.S., Deshusses, M.A., Webster, T.S. (1999) *Biofiltration for air pollution control*. Lewis, Boca Raton
- Frutos, O., Quijano, G., Perez, R., Muñoz, R. (2016) *Simultaneous biological nitrous oxide abatement and wastewater treatment in a denitrifying off-gas bioscrubber*. ChemicalEngineeringJournal
- IPCC (2013). *Quinto informe de evaluación del cambio climático*. <http://www.climatechange2013.org/>
- Lopez, J., Quijano, G., Souza, T., Muñoz, R., Lebrero, R. (2013) *Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges*. ApplMicrobiolBiotechnol.
- O. P. Karthikeyan, K. Chidambarampadmavathy, Samuel Cirés & Kirsten Heimann (2015) *Review of Sustainable Methane Mitigation and Biopolymer Production*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 45:15, 1579-1610, DOI
- Organización Meteorológica Mundial (2016) http://www.wmo.int/pages/index_es.html
- Parker, A. (2001) *Contaminación del aire por la industria*. Editorial reverté, S.A.
- Saharan, B., Grewal, A., Kumar, P., (2014) *Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments*. Hindawi Publishing

Corporation Chinese Journal of Biology Volume 2014, Article ID 802984, 18 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/802984>

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. (2008) *Determinación de los azúcares o subproductos y degradación de productos de fracción líquida*. Technical Report NREL/TP-510-42623

Sprajcar, M., Horvat, P., Krzan, A. (2012) *Biopolymers and bioplastics: plastics aligned with nature. Informational - educational material for teachers and laboratory assistants of chemistry at primary and secondary schools*. National Institute of Chemistry, Ljubljana

Utami, TS., Hermansyah, H., Nasikin, M. (2012) *Biofiltration of nitrous oxide using cow-manure based compost as medium filter*. J EnvironProt 3:584–588

Warner, K. (2004) *Contaminación del aire: Origen y control*. Limusa Noriega editores

Yamane, T., Chen, X., Ueda, S. (1995) *Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of Paracoccus denitrificans*. FEMS Microbiology Letters.

8. ANEXOS

Tabla 1. Composición del medio mineral.

Medio Mineral (Medio Brunner modificado)		
Elemento	Concentración	Unidades
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6,14	g/L
KH ₂ PO ₄	1,52	g/L
NH ₄ Cl	0,26	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20	g/L
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,05	g/L
Solución de elementos traza SL-4	10	mL/L
pH	7,00	
Solución de elementos de traza SL-4		
Elemento	Concentración	Unidades
EDTA	0,5	g/L
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,2	g/L
Solución de traza SL-6	100	mL/L
Solución de elementos de traza SL-6		
Elemento	Concentración	Unidades
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,10	g/L
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,03	g/L
H ₃ BO ₃	0,30	g/L
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,20	g/L
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01	g/L
NiCl ₂ ·6 H ₂ O	0,02	g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,03	g/L

Alumno: Barriguín García, Gonzalo

Titulación: Máster en Ingeniería Ambiental- Escuela de Ingenierías industriales

Universidad de Valladolid