

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción de biometano a partir del gas de síntesis derivado de la gasificación de resíduos sólidos como una alternativa de tecnología limpia a la generación de combustibles fósiles.

Autor: D. Anderson José da Silva
Tutor 1: Dr. Raúl Muñoz Torre
Tutor 2: Dra. Minerva E Maya Yescas

Valladolid, Julio de 2025

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Producción de biometano a partir del gas de síntesis derivado de la gasificación de resíduos sólidos como una alternativa de tecnología limpia a la generación de combustibles fósiles.

Autor: D. Anderson José da Silva
Tutor 1: Dr. Raúl Muñoz Torre
Tutor 2: Dra. Minerva E Maya Yescas

Valladolid, Julio de 2025

RESUMEN

Con el aumento de la población y del consumo ligado a este crecimiento, se deben buscar soluciones urgentes en el marco de la economía circular en diferentes sectores, dada la cantidad y potencial de los residuos que se generan diariamente. En el sector de los residuos, una solución muy relevante en Europa es su valorización energética. Sin embargo, esta tecnología está asociada a un aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, especialmente CO, CO₂ y CH₄. Por ello, se están buscando medidas para tratar estos gases residuales, con el objetivo de reducir la contaminación atmosférica.

Un tratamiento alternativo para estos gases es la fermentación con bacterias y su conversión de productos de valor comercial, como el biometano. En este estudio, se evaluaron dos sistemas microbianos, a saber, un cocultivo sintrófico con presencia de *Methanothermobacter thermautotrophicus* y *Carboxydothermus hydrogenoformans* y un consorcio microbiano mixto, con el objetivo de dilucidar su potencial de generación de biometano en biofiltros, utilizando un gas sintético, con composición similar a la obtenida en la gasificación de biomasa (35% H₂, 30% CO, 25% CO₂ y 10% CH₄). Se evaluó sistemáticamente la producción de biometano a caudales de 6, 12, 24 y 48 mL/min de gas de síntesis.

Este estudio confirmó que el cocultivo sintrófico presentó una mayor oscilación en la eficiencia de biometanización a lo largo del tiempo, lo que indicó que este sistema es más sensible a las condiciones de operación y a posibles variaciones en el suministro de gas de síntesis y en el pH. A pesar de esta inestabilidad, el cocultivo sintrófico logró alcanzar el valor máximo de metanización observado en el estudio, correspondiente al 63,8%, utilizando un flujo de gas de síntesis de 24 mL/min en biofiltros de 2,1 litros de volumen útil, lo que sugiere un alto potencial de biometanización.

El consorcio microbiano mostró un comportamiento mucho más estable y consistente a lo largo del experimento, con un valor promedio de metano de 53,0% \pm 1,4%, mostrando baja fluctuación entre mediciones y una alta selectividad para la producción de biometano en comparación con otros posibles productos secundarios. Esto indica que si bien el cocultivo sintrófico ha logrado la mejor eficiencia en el estudio, el consorcio microbiano podría ser una opción más robusta y confiable para aplicaciones a escala industrial, donde la estabilidad del proceso es un factor determinante.

Palabras clave: Biofiltro, Biometanización, Cocultivo sintrófico, Consorcio microbiano mixto, Economía circular, Gases de síntesis.

ABSTRACT

With the increase in population and consumption linked to this growth, urgent solutions must be sought within the framework of the circular economy across various sectors, given the quantity and potential of the waste generated daily. In the waste sector, a highly relevant solution in Europe is energy recovery. However, this technology is associated with increased emissions of greenhouse gases, especially CO, CO₂, and CH₄. Therefore, measures are being sought to treat these residual gases in order to reduce air pollution.

An alternative treatment for these gases is fermentation with bacteria and their conversion into commercially valuable products, such as biomethane. In this study, two microbial systems were evaluated: a syntrophic coculture involving *Methanothermobacter thermautotrophicus* and *Carboxydotermus hydrogenoformans*, and a mixed microbial consortium, aiming to elucidate their potential for biomethane generation in biofilters, using a synthetic gas with a composition similar to that obtained from biomass gasification (35% H₂, 30% CO, 25% CO₂, and 10% CH₄). Biomethane production was systematically evaluated at flow rates of 6, 12, 24, and 48 mL/min of synthesis gas.

This study confirmed that the syntrophic coculture showed greater oscillation in biomethanation efficiency over time, indicating that this system is more sensitive to operating conditions and possible variations in synthesis gas supply and pH. Despite this instability, the syntrophic coculture achieved the highest methanation value observed in the study, corresponding to 63.8%, using a synthesis gas flow rate of 24 mL/min in 2.1-liter biofilters, suggesting a high biomethanation potential.

The microbial consortium showed much more stable and consistent behavior throughout the experiment, with an average methane value of 53.0% \pm 1.4%, showing low fluctuation between measurements and high selectivity for biomethane production compared to other possible by-products. This indicates that while the syntrophic coculture achieved the best efficiency in the study, the microbial consortium could be a more robust and reliable option for industrial-scale applications, where process stability is a determining factor.

Keywords: Biofilter, Biomethanation, Syntrophic coculture, Mixed microbial consortium, Circular economy, Synthesis gas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento a la Beca del Instituto de Corresponsabilidad por la Educación (ICE), en las personas del Dr. Marcos y Odenilda, quienes fueron esenciales durante todo el proceso: desde la financiación de la beca hasta el apoyo en el aprendizaje del español y los trámites para la obtención de la visa. Muchas gracias.

Mi eterno agradecimiento a mis tutores, Raúl Muñoz y Maya Yescas, por todo lo aprendido a lo largo del camino.

Mi gratitud a mi familia, quienes me enseñaron todo lo que soy hoy. Estoy muy orgulloso de ustedes.

A mi querida novia, que me da tanta fuerza y orgullo.

Y a los amigos que hice aquí en Valladolid, tanto durante mi Máster en Ingeniería Ambiental como a través de mis interacciones en otros entornos: muchas gracias. Hicieron que todo el proceso fuera más llevadero.

Y por último, pero no menos importante, a mi Dios, que es mi fuerza e inspiración diaria.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1. Inóculo y medios de cultivo	8
2.2. Procedimiento Experimental	9
2.3. Métodos Analíticos	12
2.4. Cálculos	13
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1. Producción de Biometano	14
3.2. Correlación entre la generación de biometano y el pH	19
3.3. Flujo de carbono y selectividad	23
3.4. Eficiencia de la biometanización	25
4. CONCLUSIÓN	28
5. SUGERENCIA PARA TRABAJOS FUTUROS	28
6. REFERENCIAS	29

1. INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación de la sociedad civil, ante los imponentes riesgos de contaminación ambiental, ha impulsado un cambio de mentalidad a nivel mundial respecto a la limitación de los recursos naturales disponibles y la necesidad de sustituir matrices materiales y energéticas.

En la Unión Europea, el Pacto Verde Europeo pone de relieve la preocupación de la población por una política medioambiental, que defina objetivos que aceleren la necesidad de la transición material, a través de la economía circular y la transición energética. [1]

Una economía diseñada de forma circular permea desde el diseño de un producto con menor impacto ambiental, hasta la reinserción material/energética de los residuos generados en la cadena productiva.

La necesidad de reintegrar los residuos a la cadena productiva es fundamental, dado el gran volumen generado, los gastos que supone su gestión y las consecuencias de contaminación ambiental por una gestión inadecuada. En la Unión Europea en 2022 se generaron 2.233 millones de residuos, entre los que destacan las siguientes actividades económicas: Construcción (38,4%), minas y canteras (22,7%), servicios de residuos y agua (10,5%), industria manufacturera (10,4%), viviendas (8,9%), servicios (5,2%) y energía (3,0%). [2]

En 2022 en la Unión Europea se trajeron 1.992 millones de toneladas de residuos dentro del territorio, restando los residuos exportados de la cantidad generada. De estos, el 61,4% se recuperó mediante reciclaje, relleno (el uso de residuos en áreas excavadas para recuperación de taludes o con fines de seguridad o con fines de ingeniería en paisajismo) y recuperación de energía. Mientras tanto, el 38,6% fue depositado en vertederos, incinerado sin recuperación de energía o dispuesto de otras maneras, como se muestra en la Figura 01. [2]

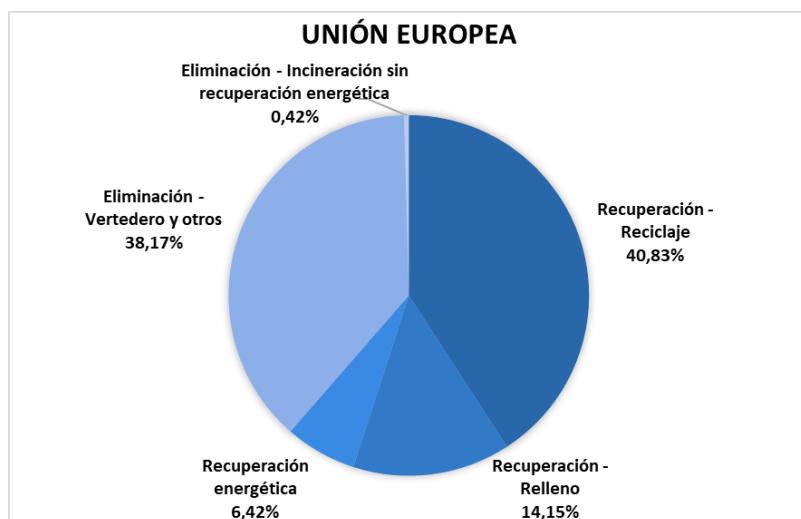


Figura 01.: Distribución porcentual de las actividades de tratamiento de residuos en la Unión Europea. adaptado [2].

Si bien los residuos sólidos urbanos representan alrededor del 10% de los residuos generados, son de gran importancia debido a su complejidad, gravimetría, distribución y vinculación con el patrón de consumo de la población [3]

En el año 2023, la Unión Europea tuvo los siguientes destinos promedio para sus residuos domésticos: a) 30% reciclaje de materiales; b) 26,33% recuperación de energía e incineración; c) 23,47% Disposición en vertederos (y otros); d) 20,20% compostaje y digestión [3]. A pesar de los notables avances, la Directiva 850/2018 de la Unión Europea establece que los Estados miembros deben adoptar las medidas necesarias para garantizar que, de aquí a 2035, la cantidad de residuos municipales depositados en vertederos se reduzca al 10 % o menos de la cantidad total de residuos municipales producidos (en peso) [4].

Esto conducirá a un aumento de la contribución del reciclaje, el compostaje, la digestión anaerobia y el tratamiento térmico, siguiendo principalmente la jerarquía de gestión de residuos sólidos urbanos presentada por la Directiva 2008/98/CE, que presenta el orden de prioridad en la legislación para la política de prevención y gestión de residuos sólidos. A saber: a) Prevención, b) Preparación para la reutilización, c) Reciclaje, d) Recuperación (por ejemplo, energética) y e) Eliminación [5].

La recuperación de energía es especialmente importante en los casos en que los residuos tienen un alto valor calorífico. Además, la gasificación se ha utilizado ampliamente para procesar sustratos recalcitrantes y residuos municipales, dado que las tecnologías biológicas no pueden procesarlos en períodos cortos.

En Europa, aproximadamente 100 millones de toneladas de residuos municipales, comerciales e industriales se procesan en aproximadamente 500 plantas de incineración WtE (Waste-to-Energy), que son capaces de proporcionar electricidad a 21 millones de personas y calefacción a 17 millones de personas [6].

Al utilizar energía Waste-to-Energy (WtE), Europa evita el uso de al menos 10 millones de toneladas de combustibles fósiles, como gas, petróleo y carbón, evitando así la emisión de al menos 22 millones de toneladas de CO₂. [6]

Sin embargo, dependiendo de los residuos que se incineren, se pueden emitir altas concentraciones de gases de efecto invernadero, como por ejemplo los residuos plásticos, que pueden emitir 580 g CO₂ eq/KWh, superando así los 340 g CO₂ eq/KWh emitidos por el uso de gas fósil.[7]

Por lo tanto, existe mucha discusión acerca de los reactores termoquímicos para procesar estos materiales. Lopes (2014) presenta las principales diferencias entre los sistemas de incineración y gasificación, destacando, sobre todo, los productos finales de ambos sistemas. En este sentido, la incineración tiene como producto final gases de combustión, escorias y cenizas, mientras que la gasificación presenta como productos finales: gases combustibles, vapor de agua y ácidos orgánicos. Esta diferencia se produce, sobre todo, porque en el proceso de gasificación, el

oxígeno se encuentra en una concentración menor, generando un gas de síntesis, compuesto básicamente por CO, H₂, CH₄, CO₂ y N₂.[8]

Estos gases combustibles presentes en el gas de síntesis, procedentes de biomasa y residuos municipales, tienen los componentes básicos de todas las moléculas con alto contenido de carbono, al igual que el gas de síntesis procedente de combustibles fósiles. La diferencia es que los combustibles fósiles se formaron en el pasado geológico, mientras que la biomasa y los residuos se formaron en el pasado más reciente. [9]

En la siguiente tabla elaborada por Paniagua (2022), a partir de múltiples estudios experimentales, podemos verificar las concentraciones habituales (%) presentes en el gas de síntesis procedente de la gasificación de residuos sólidos urbanos. [10]

Tabla 1. Composición del gas de síntesis en función de la materia prima empleada en la gasificación. [10]

Materia prima	H ₂ (%)	CH ₄ (%)	CO (%)	CO ₂ (%)	N ₂ (%)	Referencia
Agente de gasificación: Vapor						
Lodos de depuradora	58-63	1-3	13-18	14-17	-	[11]
Residuos sólidos urbanos	42-45	14-17	15-18	23-26	-	[12]
Agente de gasificación: Aire						
Residuos Plásticos	18-22	0-4	12-18	8-12	60-63	[13]
Desperdicios de alimentos	1-5	1-6	3-8	12-18	57-68	[14]

Para obtener compuestos con valor comercial, como el metano, es necesario transformar este gas de síntesis. En este escenario existen dos soluciones: la primera es la catálisis química a través, por ejemplo, del proceso Fischer-Tropsch (FT) y la segunda es la catálisis bioquímica, utilizando microorganismos que siguen la ruta metabólica deseada. [9]

El proceso Fischer-Tropsch consiste en una serie de reacciones químicas catalizadas que convierten una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno en derivados de hidrocarburos a temperaturas que oscilan entre 150 y 300 °C y presiones que oscilan entre 15 psi y 1000 psi. El proceso Fischer-Tropsch presenta una baja selectividad de producto, considerando los diferentes compuestos químicos formados y la necesidad de nuevos procesos de separación, y los catalizadores utilizados también son sensibles a las impurezas del gas de síntesis. [15]

Cabe destacar que, la fermentación bioquímica permite la conversión de gas de síntesis en metano a través del metabolismo de microorganismos metanogénicos a temperaturas más bajas (35–75 °C) y presión atmosférica [10], lo que permite una operación más sencilla del reactor, con el objetivo de reducir los costes de enfriamiento del gas de síntesis después de la gasificación (650°C–1400°C). Estudios recientes han destacado la fermentación gaseosa termófila como una alternativa prometedora, no sólo por la menor necesidad de enfriamiento del gas de síntesis en comparación con la fermentación mesófila, sino también por la mayor eficiencia termodinámica del proceso de reducción hydrogenotrofica de CO y CO₂ a metano [16]. El rango de temperatura termófila puede disminuir la solubilidad del gas de síntesis en el medio acuoso, considerando que la fermentación involucra tres fases heterogéneas: la fase gaseosa (gas de síntesis), el medio de cultivo (líquido) y las células microbianas (sólido) adheridas al soporte en biofiltros o en suspensión en reactores de columna de burbujeo. En este sentido, para esta alternativa biotecnológica se deben buscar reactores que logren altas tasas de transferencia de masa y también altas densidades celulares [17]. Cabe destacar que la fermentación bioquímica tiene un menor impacto ambiental que la conversión química del gas de síntesis, además de conllevar parámetros de operación moderados, y por lo tanto, se ha visto más influenciada [9]

Sin embargo, surgen preguntas sobre qué microorganismos deberían utilizarse para producir biometano dentro de estos reactores de alta tasa de transferencia de masa. En este sentido se presenta en la tabla 2, a continuación, las principales vías metabólicas para generar metano a partir de gas de síntesis.

Tabla 2. Tres vías metabólicas principales de la biometanización del gas de síntesis. [9] [10]

Vías	Reacción	Energía de Gibbs (kJ/mol)
Vía Carboxidotrófica	$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2$	$\Delta G = -210,9$
Vía hidrogenotrófica	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	$\Delta G = -135,6$
Vía Acetoclásica	$CH_3COO + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	$\Delta G = -31$

Vía Carboxidotrófica: En la vía carboxidotrófica, el monóxido de carbono (CO) actúa como agente reductor, ya que cede electrones al ser parcialmente oxidado a CO₂, permitiendo así la reducción de carbono a metano (CH₄). Vale la pena señalar que el monóxido de carbono (CO), presente en el gas de síntesis, puede considerarse una excelente fuente de energía y carbono para los organismos metanogénicos, pero el crecimiento carboxidotrófico sólo se ha demostrado para unas pocas especies metanogénicas. Las posibles causas de este desajuste en los metanógenos podrían estar relacionadas con la toxicidad inherente del CO [18]. Por lo tanto, los microorganismos seleccionados para la producción de biometano a partir de gas de síntesis también deben tener resistencia a la toxicidad del monóxido de carbono.

Vía hidrogenotrófica: Se produce a partir de la transformación de hidrógeno, formiato o ciertos alcoholes en metano utilizando CO₂ como aceptor de electrones. En este sentido, el H₂ se utiliza como donante de electrones para la reducción del CO₂, un proceso casi universal entre las arqueas metanogénicas [19]. Esta ruta es la más disponible para los microorganismos metanogénicos, ya que el 74,5% puede utilizarla [20]

Vía acetoclástica: Consiste en la conversión de acetato en metano, en la que el grupo metilo (-CH₃) del acetato se reduce a metano (CH₄), mientras que el grupo carboxilo (-COOH) se oxida a dióxido de carbono (CO₂) [19]. Siendo utilizado sólo por el 8,5% de los microorganismos metanogénicos [20].

Buscando evitar la inhibición debida al monóxido de carbono y con el objetivo de aumentar aún más la producción de metano, se han propuesto dos estrategias biotecnológicas en estudios recientes: 1) Conversión de CO en acetato por bacterias acetogénicas y, posteriormente, acetato en metano a través de la vía acetoclástica. 2) Conversión de CO en hidrógeno, por organismos *hidrogenogénicos carboxidotróficos*, y luego, hidrógeno en metano a través de la vía hidrogenotrófica. (Paniagua, 2022) Considerando la ecuación de la vía hidrogenotrófica, se espera que el hidrógeno sea el reactivo limitante, en este sentido se ha puesto mayor énfasis en la segunda alternativa [10].

Galani et al (2025), citando a otros autores, realizaron un co-cultivo de microorganismos carboxidotróficos termófilos capaces de generar biometano, hidrógeno y acetato a partir de gas de síntesis. Se destacan en la tabla 3, los que utilizan gas de síntesis (CO/H₂/CO₂) y generan biometano o hidrógeno [16]

Tabla 3. Resumen de termófilos carboxidotróficos aislados que generan biometano e hidrógeno a partir de gas de síntesis. [16]

Organismo	Fuente de aislamiento	Temperatura óptima (°C)	Producto principal de la fermentación de CO	Referencia
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	Digestor de aguas residuales	70	CH ₄	[21]
<i>Metanotermobacter marburgensis</i>	Digestor de aguas residuales	65	CH ₄	[22]
<i>Carboxydotermus Hydrogenoformans</i>	Pantano Calliente	70-72	H ₂ /Acetato	[23]
<i>Carboxydotermus Pertinax</i>	Fuente termal terrestre	65	H ₂	[24]
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	Lago Caliente	66	H ₂ /Acetato	[25]

En este sentido, los co-cultivos sintróficos surgen como una posibilidad biotecnológica para la producción de compuestos con valor de mercado, como el biometano. Sin embargo, cabe destacar que los microorganismos que participarán en el cocultivo sintrófico deberán tener el mismo rango de pH, temperatura y concentración de sales [26]. Un ejemplo exitoso fue presentado por Diender *et al.* (2018) donde los microorganismos *Carboxydotothermus hydrogenoformans* (carboxidotrófico e hidrogenógeno) y *Methanothermobacter thermautotrophicus* (arquea hidrogenótrofa y metanogénica) se mezclaron en un reactor CSTR y obtuvieron una generación de metano del 72%, a partir de un gas de síntesis (66,6% H₂: 33,3% CO) [27].

Otra solución biotecnológica es el uso de consorcios microbianos naturales que contienen microorganismos carboxidotróficos, ya que presentan múltiples ventajas frente a la fermentación en monocultivo, como una menor sensibilidad a la inhibición. Pero se requiere una mayor comprensión de cómo la composición microbiana gestiona la biometanización del gas de síntesis y en particular la conversión de CO [10]. Un estudio exitoso realizado por García-Casado *et al.* (2024) demostró la producción eficiente de metano a partir de gas de síntesis y lodos de depuradoras, utilizando botellas serológicas como reactores. Las pruebas dieron como resultado una concentración promedio de metano de 41,6 ± 2,0%, utilizando una mezcla de gases compuesta por 35% H₂, 30% CO, 25% CO₂ y 10% CH₄. Los lodos utilizados estuvieron formados predominantemente por microorganismos de los géneros *Methanosaerina*, *Acetobacterium* y *Thauera* [28].

En este Trabajo fin de Master se utilizará un consorcio microbiano obtenido a partir de una mezcla 1:1 de lodos mesófilos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Valladolid (ES) y lodos termófilos de la planta de tratamiento de residuos urbanos de San Sebastián (ES), presentado en detalle por Rodríguez-Gallego *et al.* (2025), donde tras el análisis metataxonómico del gen 16S rRNA, se identificó la presencia mayoritaria de los géneros *Methanothermobacter* (arqueas metanogénicas) y del filo *Firmicutes* (bacterias carboxidotróficas) en la tercera fase del experimento (donde se obtuvo la muestra de este estudio), de las cuales destaca la abundancia de arqueas del género *Methanothermobacter* en un 52,4% de la comunidad microbiana. [29]

Aunque existen estudios sobre la generación de biometano a partir de gas de síntesis, aún queda mucho por descubrir sobre los mejores parámetros operativos de los reactores, tipos de reactores y qué microorganismos metanogénicos se deben utilizar, especialmente cuando se trata de microorganismos carboxidotróficos termófilos, que parecen ser los más prometedores para esta bioconversión.

Por tanto, en este trabajo se estudiará en un reactor de biofiltro empacado con arcilla expandida el comportamiento de un co-cultivo sintrófico con presencia de *Methanothermobacter thermautotrophicus* (arquea hidrogenotrófica y metanogénica) y *Carboxydotothermus hydrogenoformans* (bacteria carboxidotrófica e hidrogenogénica) y en otro biofiltro empacado

con arcilla expandida el comportamiento de un consorcio microbiano mixto con presencia de arqueas metanogénicas del género *Methanothermobacter* y bacterias carboxidotróficas del filo *Firmicutes*, a diferentes caudales de gas de síntesis, con una mezcla de syngas sintético que se aproxima a la composición real del gas de síntesis obtenido por gasificación de biomasa (35% H₂, 30% CO, 25% CO₂ y 10% CH₄).

1.1. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar sistemáticamente el rendimiento de biometanización de un consorcio microbiano mixto con presencia de arqueas metanogénicas del género *Methanothermobacter* y bacterias carboxidotróficas del filo Firmicutes y de un co-cultivo sintrófico con presencia de los microorganismos *Methanothermobacter thermautotrophicus* y *Carboxydotothermus hydrogenoformans* utilizando diferentes caudales de gas de síntesis, cuya composición es similar a la obtenida en la gasificación de biomasa.

Se definió el siguiente objetivo específico:

- Evaluar la producción de biometano, comparado con otros productos secundarios en biorreactores con el consorcio microbiano y con co-cultivo sintrófico a diferentes caudales de gas de síntesis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Inóculo y medios de cultivo

Reactor 01, con co-cultivo sintrófico: Las cepas de *Methanothermobacter thermautotrophicus* *ΔH* (DSM 1053) y *Carboxydothermus hydrogenoformans* Z-2901 (DSM 6008) se seleccionaron de la colección de cepas del Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). Se cultivaron inicialmente por separado a 65 °C en sus respectivos medios minerales, a saber: DSM 1523 para la cepa *Methanothermobacter thermautotrophicus* *ΔH* y DSM 507 para la cepa *Carboxydothermus hydrogenoformans* Z-2901, utilizando procedimientos de cultivo anaeróbicos. Se prepararon 500 mL del respectivo medio de cultivo en tres botellas diferentes en frascos de vidrio de 2 litros con tapón de goma. Para monitorear el crecimiento de la respectiva cepa, se monitoreó el aumento de metano en una de las botellas con *Methanothermobacter thermautotrophicus* y el aumento de hidrógeno en una de las botellas con *Carboxydothermus hydrogenoformans* mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de conductividad térmica.

Reactor 02, con el consorcio microbiano mixto: enriquecido a partir de una mezcla 1:1 de lodos mesófilos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Valladolid (ES) y lodos termófilos de la planta de tratamiento de residuos urbanos de San Sebastián (ES) [29]. Se cultivó a 65°C en medio mineral BAM, presentado en la tabla 4 a continuación, utilizando procedimientos de cultivo anaeróbicos.

Tabla 4. Basal Anaerobic Medium en el que se propagan el consorcio microbiano. Modificado [30].

Solución 1 (10 mL)	
<i>NH</i> ₄ Cl	100
NaCl	10
MgCl ₂	10
CaCl ₂	5
Solución 2 (10 mL)	
<i>KH</i> ₂ <i>PO</i> ₄	17,7 g·L ⁻¹
Solución 3 (10 mL)	
<i>K</i> ₂ <i>HPO</i> ₄	151,6 g·L ⁻¹
Solución 4 (50 mL)	
<i>NaHCO</i> ₃	52 g. L ⁻¹
Solución 5	
Elementos traza (4,0 mL.)	
FeCl ₂ . 4 H ₂ O	2000 mg·L ⁻¹
<i>H</i> ₃ <i>BO</i> ₃	50 mg·L ⁻¹
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	50 mg·L ⁻¹
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	50 mg·L ⁻¹
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	92 mg·L ⁻¹

ZnCl ₂	50 mg·L ⁻¹
CuCl ₂	30 mg·L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 5 H ₂ O	50 mg·L ⁻¹
AlCl ₃	50 mg·L ⁻¹
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	60 mg·L ⁻¹
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	10 mg·L ⁻¹
HCl	1000 mg·L ⁻¹
Solución 6 (15 mL.)	
Nitrilotriacetic (NTA)	1 g·L ⁻¹
Solución 7	
Vitaminas (1,0 mL.)	
Biotina	20 mg·L ⁻¹
Nicotinamina	200 mg·L ⁻¹
Ácido p-amino benzoico	100 mg·L ⁻¹
Vitamina B1	100 mg·L ⁻¹
Ácido pantoténico	100 mg·L ⁻¹
Piridoxina	500 mg·L ⁻¹
Vitamina B12	100 mg·L ⁻¹
Riboflavin	100 mg·L ⁻¹
Solución 8 (40 mL.)	
Na ₂ S · 9 H ₂ O	25 g·L ⁻¹

Las soluciones 1, 2, 3 y 6 se agregaron a cinco botellas de vidrio de 2 litros con tapón de goma, antes de esterilizarlas en autoclave. Despues de la esterilización se introdujo una atmósfera de syngas en las botellas, considerando las condiciones anaeróbicas requeridas por los microorganismos. Una vez hecho esto se agregaron las soluciones 4, 5 y 8, se ajustó el pH a 7 y se inocularon los microorganismos en estas botellas. Las mismas fueron introducidas a una cámara giratoria (5rpm) con una temperatura de 65° C, para mantener las temperaturas adecuadas para los microorganismos , luego se verificó el crecimiento mediante observación de la turbidez y consumo de gases mediante GC-TCD para su inoculación en los biofiltros.

2.2. Procedimiento Experimental

Para el estudio se utilizaron biofiltros de lecho empacado de flujo continuo, los cuales tuvieron un volumen total de 3 litros, con 2,1 litros de volumen útil del reactor y una altura útil de 48 centímetros. Se llenó cada biofiltro con Arlita (arcilla expandida) para retener la biomasa microbiana. El reactor encamisado empleó agua caliente recirculada mediante un baño termostático para mantener la temperatura interna a 65°C. La corriente de syngas tambien se precalentó a 65° C.

En forma esquemática, la Figura 2 muestra los subsistemas involucrados en la operación de los reactores.

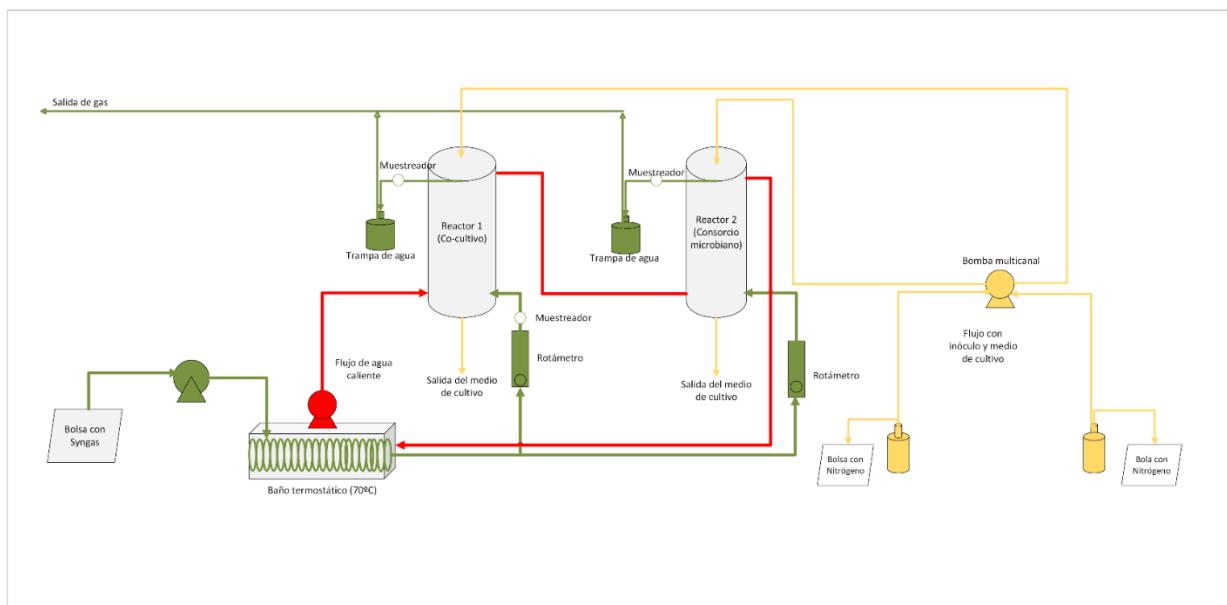


Figura 02.: Sistemas de reactores. A la izquierda (reactor 1) con el co-cultivo sintrófico y a la derecha el reactor 2, con la presencia del consorcio microbiano. Fuente: Autor.

El subsistema rojo representa la recirculación de agua caliente, a través de tuberías debidamente aisladas que salen de un baño de recirculación de agua con termostato digital regulado a 70 °C. Las tuberías entre los dos reactores están conectadas en serie de forma que el agua que sale del baño calienta el primer reactor (zona externa del encamisado) y posteriormente, llena el encamisado exterior del segundo reactor con agua caliente, consiguiendo así calentar el segundo reactor.

Mientras tanto, el subsistema verde corresponde al suministro de gas de síntesis (35% H₂, 30% CO, 25% CO₂ y 10% CH₄) al sistema. La mezcla de gas sintético fue comprada a Carburos metalicos (España). El gas de síntesis se almacena en bolsas Mylar® de 100 litros y, al ser bombeado, se calienta mediante un serpentín sumergido en un baño termostático, donde permanece adecuadamente aislado hasta su alimentación a los reactores. Esta línea de gas está dividida de manera que cada reactor recibe la misma cantidad de gas, controlada por rotámetros en la entrada del reactor. El gas entra al reactor por la parte inferior y fluye hacia arriba en el lecho poroso arcilla expandida, buscando una buena difusión entre el gas de síntesis y el medio de cultivo. Antes y después de los reactores se instalaron puntos de muestreo, con el objetivo de monitorear mediante GC-TC la composición de los gases antes y después del proceso de biometanización.

En la línea amarilla, se contó con 03 configuraciones diferentes dependiendo la etapa del experimento. En la primera configuración en la fase de pre-experimento, se utilizó el subsistema para recircular la solución Buffer, con el fin de ajustar el pH de la arlita presente en el cuerpo de ambos reactores. Se midió el pH del buffer antes de la inoculación y se obtuvieron los siguientes valores: 6,8 para R1-CC y 6,55 para R2-CM, acercándose por tanto a un pH neutro,

en contraste con el pH alcalino que presentaba la arlita previo a la recirculación. En la segunda configuración en la fase de inoculación, se recirculó el medio de cultivo con los respectivos microorganismos, con el objetivo de que se adhirieran al lecho de arlita. Esta fase ocurrió durante los primeros siete días del experimento. Y, por último, la fase del experimento que se realizó sin recirculación de medio mineral, donde diariamente se purgó el medio de cultivo a la salida de los reactores y se midió el pH, con el fin de comprender mejor el comportamiento de los dos sistemas de microorganismos. Para el reactor 2, con el consorcio microbiano, se utilizó el medio de cultivo que se muestra en la Tabla 4, mientras que para el reactor 1, con el co-cultivo sintrófico, se utilizó el medio mixto utilizado por Diender *et al.* (2018) (tabla 5).

Tabla 5. Medio mixto en el que se propagan *Carboxydotothermus hydrogenoformans* y *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Modificado [27].

Solución 1	
<i>KH₂PO₄</i>	0,8 g·L ⁻¹
Solución 2	
<i>K₂HPO₄· 2 H₂O</i>	1,06 g·L ⁻¹
Solución 3	
<i>NH₄Cl</i>	0,3 g·L ⁻¹
NaCl	0,3 g·L ⁻¹
<i>MgCl₂· 6 H₂O</i>	0,1 g·L ⁻¹
Extracto de levadura	0,5 mg·L ⁻¹
Solución 4	
Elementos traza – SL 11 (1,0 mL.)	
<i>H₃BO₃</i>	6,0 mg·L ⁻¹
<i>MnCl₂· 4 H₂O</i>	100 mg·L ⁻¹
<i>FeCl₂· 4 H₂O</i>	1500 mg·L ⁻¹
<i>CoCl₂· 6 H₂O</i>	190 mg·L ⁻¹
<i>NiCl₂· 6 H₂O</i>	24 mg·L ⁻¹
<i>ZnCl₂</i>	70 mg·L ⁻¹
<i>CuCl₂</i>	2 mg·L ⁻¹
<i>Na₂MoO₄· H₂O</i>	36 mg·L ⁻¹
<i>Na₂-EDTA. 2 H₂O</i>	5200 mg·L ⁻¹
Solución 5	
Vitaminas (1,0 mL.)	
Biotina	20 mg·L ⁻¹
Nicotinamina	200 mg·L ⁻¹
Ácido p-amino benzoico	100 mg·L ⁻¹
Vitamina B1	200 mg·L ⁻¹
Ácido pantoténico	100 mg·L ⁻¹
Piridoxina	500 mg·L ⁻¹
Vitamina B12	100 mg·L ⁻¹
Riboflavin	100 mg·L ⁻¹
Solución 6 (20 mL.)	
<i>Na₂S · 9 H₂O</i>	30 g·L ⁻¹

Solución 7 (50 mL.)

$NaHCO_3$

$52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

Los biofiltros se operaron durante 41 días, evaluándose el rendimiento de biometanización a flujos de 6, 12, 24 y 48 mL/min, que correspondieron con tiempos de residencia de lecho vacío del syngas de 350; 175; 87,5 y 43,7 minutos, respectivamente.

2.3. Métodos Analíticos

La cuantificación de la composición del gas de síntesis en la entrada y salida de los reactores se realizó mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Bruker 430 GC-TCD (Bruker Corporation, Palo Alto, EE. UU.). Dicho equipo disponía de un detector de conductividad térmica (TCD) y se operó a temperaturas de 150°C, 45°C y 200°C en el inyector, horno y detector, respectivamente. Se utilizaron tres jeringas de 250 μL (Hamilton Company, NV, EE. UU.) para recolectar gas, una en la entrada y las otras dos en las respectivas salidas de los biorreactores para evitar la contaminación biológica entre los reactores.

A la salida del reactor (línea amarilla en la Figura 2), el medio de cultivo se purgó diariamente después de lavar la arlita. El líquido extraído se utilizó para el análisis diario de pH, realizado con un medidor de pH Basic 20 (Crison, España). Además, se realizaron dos veces por semana análisis de Carbono Orgánico Total (COT), Carbono Inorgánico (CI), Nitrógeno Total (NT) y determinación de ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico y ácido hexanoico).

Para los análisis de COT, CI y NT el filtrado obtenido fue diluido en frascos de vidrio de 50 mL, de acuerdo a la concentración esperada. Este ajuste en las diluciones se parametrizó, con base en los resultados del análisis previo realizado y los límites de detección del equipo. La dilución tuvo como finalidad garantizar que el resultado de la muestra tuviera una concentración entre 0 y 100 mg/L. Todos los análisis se realizaron por duplicado para cada reactor. Del volumen colectado de la purga, se filtraron 6 mL con filtros de 0,22 μm para realizar las pruebas. En este sentido, la muestra se diluyó inicialmente para ambos reactores en una proporción de 1:10 (3 mL de la muestra en un volumen total de 30 mL). También se prepararon muestras de control de agua tipo 2, las mismas utilizadas en las diluciones, además de otras tres muestras estándar conocidas (100 mg TOC/L, 100 mg IC/L, 100 mg TN/L). Los análisis se llevaron a cabo en un analizador de carbono orgánico total Shimadzu TOC-V CSH acoplado a una unidad de medición de nitrógeno total TNM-1 de quimioluminiscencia con muestreador automático ASI-V.

Por otra parte, los análisis de ácidos grasos volátiles se prepararon, en duplicado, colocando 2 mL en tubos Eppendorf, con previa filtración con filtros de 0,22 μm . Posteriormente los eppendorfs fueron centrifugados a 10 rpm durante 10 minutos. La primera muestra se realizó

sin dilución, considerando los límites de detección de la cromatografía líquida de alta resolución HPLC Waters 432 (Waters Corporation, USA), que se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Límites de detección mediante cromatografía líquida utilizando el HPLC Waters 432.

Limites de detección	Rango (mg/L)
Ácido acético	30-600
Ácido propiónico	37-740
Ácido isobutírico	44-881
Ácido butírico	44-881
Ácido valérico	52-1041
Ácido Isocoproíco	58-1173
Ácido Hexanoíco	59-1184
Ácido Heptanoíco	67-1340

Una vez finalizada la centrifugación, se añadió 1 mL de la muestra a un vial de HPLC, donde se añadieron 20-30 μ L de ácido sulfúrico concentrado (equivalente a una gota) para su acidificación.

Una vez hecho esto las muestras se analizaron en un HPLC-UV-VIA. El HPLC estaba equipado con una columna HyperREZ XP H+ (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.) y un detector UV-VIS (detector 2998 PDA) e IR (detector 2414 RI). El método de medición utilizado mantuvo la columna a 55°C y utilizó ácido sulfúrico como eluyente.

2.4. Cálculos

Una vez conocidas las concentraciones en % (v/v) de los gases, después del ensayo de cromatografía de gases, se utilizó la siguiente ecuación para obtener el valor del flujo molar de cada una de los gases constituyentes del gas de síntesis:

$$PV = nRT$$

Dónde:

P: Presión atmosférica en Valladolid, dado que el reactor opera a presión atmosférica (atm).

V: Volumen de gas de síntesis suministrado a ese experimento durante un día (L).

n: Número de moles (mol).

R: es la constante universal de los gases (0,0821 atm·L/mol·K)

T: temperatura de operación del reactor (K).

También será necesario calcular la selectividad [28]. La selectividad representa la proporción de cada producto formado en relación con el total de productos generados en el sistema.

$$\text{Selectividad} \left(\frac{\text{mol}}{\text{mol}} \right) = \frac{n \text{ productos}}{n \text{ total productos}}$$

Esta fórmula es importante para evaluar qué tan dirigido está el proceso para formar el producto de interés (en este caso, metano). La selectividad nos permite comprender la distribución de los productos metabólicos e identificar si el sistema favorece la formación de metano o subproductos no deseados como ácidos grasos volátiles.

Por último, se debe calcular la eficiencia de la biometanización. Esta eficiencia se utilizó para evaluar la fracción de carbono disponible en el gas de síntesis que se convirtió efectivamente en metano, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Producción de metano} \left(\frac{\text{mol}}{\text{día}} \right)}{\text{carbono total disponible en el syngas} \left(\frac{\text{mol}}{\text{día}} \right)} \times 100$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los flujos de gas de síntesis en los reactores antes mencionados se incrementaron tres veces, obteniendo estados estacionarios para ambos reactores con los siguientes flujos de 6, 12, 24 y 48 mL/min. El caudal se mantuvo en 6 mL/min desde la etapa de inoculación hasta alcanzar el primer estado estacionario. En la etapa de inoculación, los inoculos resuspendidos en el frasco que contenía el medio de cultivo fueron recirculados durante los primeros 7 días del experimento.

3.1. Producción de Biometano

La producción de biometano en estos reactores ocurrió a través de las vías carboxidotrófica e hidrogenotrófica. En este sentido, se espera una disminución, especialmente del monóxido de carbono y del hidrógeno presentes en el gas de síntesis. Además, se espera un incremento del metano en la composición del gas a la salida de ambos biorreactores. Sin embargo, respecto al dióxido de carbono, la proporción puede permanecer igual, disminuir o aumentar dependiendo de la vía prioritaria, o incluso de la generación de ácidos carbónicos en el contacto del gas dióxido de carbono con la fase acuosa, dada su afinidad con ésta.

Como se presentó anteriormente, se recolectaron muestras de gas de la entrada del reactor 1 con el co-cultivo sintrófico (R1-CC), para verificar la composición del gas a la entrada de los reactores, con el fin de calcular la eficiencia de la biotransformación de los compuestos, así como la entrada de oxígeno para identificar posibles fallas en el mantenimiento de condiciones anaerobias, considerando que los microorganismos en cuestión son estrictamente anaeróbicos. En la Tabla 7, podemos ver la composición promedio presente en el gas de síntesis de entrada durante el período del experimento.

Tabla 7. Composición media del gas de síntesis a la entrada del reactor en % v/v.

Tipo de gas	<i>CO₂</i>	<i>H₂</i>	<i>O₂</i>	<i>N₂</i>	<i>CH₄</i>	<i>CO</i>
Composición media	20,5±0,6	40,0±1,5	0,5±0,3	1,9±1,0	9,9±0,5	27,2±1,0

Con la concentración en % (v/v) es posible obtener el número de moles, considerando la ecuación de los gases ideales y los siguientes parámetros: Operación de los reactores a 65°C, presión interna del reactor igual a la presión atmosférica en Valladolid, es decir 0,9085 atmósferas [31] y el flujo volumétrico de gas de síntesis suministrado a cada reactor, considerando el caudal diario ya mencionado. En la tabla 8, podemos ver la cantidad de moles que entran diariamente a cada reactor biológico. Cabe señalar que en la fase de inóculo y en la prueba 1 los flujos de gas de síntesis fueron los mismos.

Tabla 8. Flujo molar medio del gas de síntesis a la entrada del reactor en mmol/día.

Tipo de gas	<i>CO₂</i> (mmol/día)	<i>H₂</i> (mmol/día)	<i>CH₄</i> (mmol/día)	<i>CO</i> (mmol/día)
Inoculo	55,4±1,0	110,7±4,2	25,9±1,6	72,9±2,1
1 prueba, caudal 6 ml/min	56,8±1,3	110,9±3,2	26,6±1,3	74,7±2,5
2 prueba, caudal 12 ml/min	108,0±3,7	214,2±8,4	52,9±2,0	144,4±5,3
3 prueba, caudal 24 ml/min	229,8±8,1	444,4±21,3	112,5±4,5	305,7±10,0
4 prueba, caudal 48 ml/min	490,3±2,5	900,5±4,8	241,5±1,8	651,6±1,1

De manera similar, se realizaron cálculos de flujos molares a la salida del reactor 1, con presencia del cocultivo sintrófico (R1-CC) y del reactor 2 con presencia del consorcio microbiano mixto (R2-CM). En la tabla 9, podemos observar el flujo molar medio del gas luego de la fermentación de la arquea *Methanothermobacter thermautotrophicus* y la bacteria *Carboxydothermus hydrogenoformans*. En esta tabla dividimos el experimento en cinco fases, es decir, la fase de inoculación y la fermentación con co-cultivo a flujos de 6, 12, 24 y 48 mL/min de gas de síntesis.

Tabla 9. Flujo molar medio del gas de síntesis a la salida del reactor R1-CC, en mmol/día

Tipo de gas	<i>CO₂</i> (mmol/día)	<i>H₂</i> (mmol/día)	<i>CH₄</i> (mmol/día)	<i>CO</i> (mmol/día)
Inoculo	80,8±17,6	129,8±17,8	23,4±2,0	29,3±29,4
1 prueba, caudal 6 ml/min	141,8±17,1	20,9±51,9	104,0±33,2	0,1±0,1

Tipo de gas	CO_2 (mmol/día)	H_2 (mmol/día)	CH_4 (mmol/día)	CO (mmol/día)
2 prueba, caudal 12 ml/min	$288,4 \pm 6,2$	-	$224,8 \pm 5,9$	$0,1 \pm 0,2$
3 prueba, caudal 24 ml/min	$602,9 \pm 5,9$	-	$478,1 \pm 11,9$	$2,8 \pm 3,7$
4 prueba, caudal 48 ml/min	$917,8 \pm 79,6$	$401,0 \pm 20,8$	$680,7 \pm 33,2$	$275,7 \pm 90,5$

Haciendo una comparación en la fase de inóculo entre la entrada del reactor y la salida del R1-CC, tenemos un aumento de CO_2 e hidrógeno mientras que se observa una disminución de CO, tendencia que se aproxima al comportamiento fermentativo esperado para la bacteria *Carboxydothermus hydrogenoformans* [32], indicando por tanto actividad microbiana predominante en esta fase. Mientras tanto, analizando la entrada y salida de R1-CC para el primer estado estacionario, se observa un aumento en el número de moles de CO_2 y CH_4 , mientras que se observa una disminución de CO y H_2 , promoviendo así la actividad microbiana de *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Para esta fase del experimento con un flujo de gas de síntesis de 6 mL/min, R1CC obtuvo una eficiencia de conversión de CO del 99,90%. Podemos ver en la figura 03 a continuación los valores en número de moles que presentan los gases a la salida de R1 CC cada día.

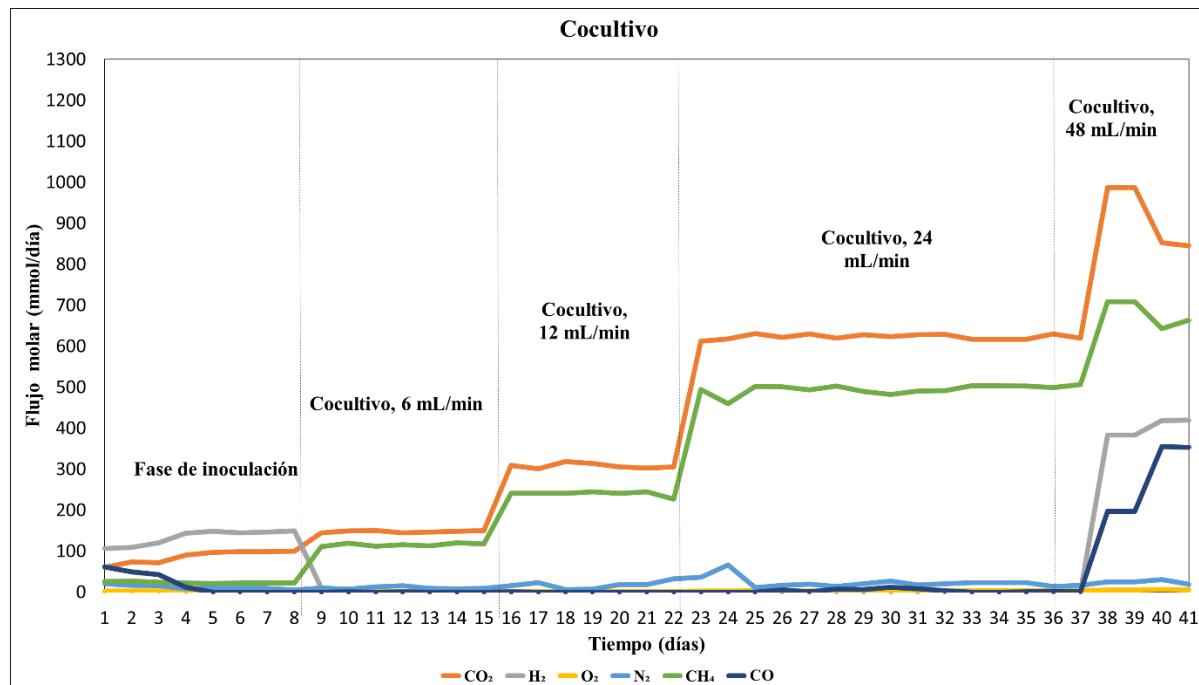


Figura 03.: Evolución temporal de los flujos molares de CO_2 , H_2 , oxígeno, nitrógeno, CH_4 y CO en los ensayos de inoculación y cocultivo con 6, 12, 24 y 48 mL/min. Fuente: Autor.

En la figura 03, podemos observar el aumento del flujo molar de hidrógeno disponibles a partir del segundo día, a través de la producción de *Carboxydothermus hydrogenoformans* y el consumo de hidrógeno a partir del décimo día, indicando junto con el aumento de metano la actividad microbiológica de *Methanothermobacter thermautotrophicus*.

En las etapas 2 y 3, presentados en las tablas 8 y 9, observamos el mismo patrón de aumento de biometano y CO₂, además de resaltar la conversión de CO y el consumo total de hidrógeno. Las eficiencias de bioconversión de CO fueron, respectivamente: 99,96% para la etapa 2, con un caudal de 12 mL/min y 99,08% para la etapa 3, con un caudal de gas de síntesis de 24 mL/min.

Como se presentó anteriormente, Diender et al. (2018) para un reactor CSTR, operado de forma continua, con presencia de los microorganismos *Methanothermobacter thermautotrophicus* y *Carboxydothermus hydrogenoformans*, obtuvieron una eficiencia de conversión de CO de 93% [27], mientras que, en el presente estudio, se obtuvo una eficiencia de hasta 99,96% para el flujo de 12 mL/min del reactor 01.

Finalmente, en la etapa 4 con un flujo de syngas de 48 mL/min, se observa una disminución en la eficiencia de bioconversión de CO, obteniendo un valor promedio de 57.7% y con ello, una reducción en la producción de biometano para el R1 CC.

En la tabla 10, podemos comprobar los valores de flujos molares de salida del reactor con el consorcio microbiano mixto (R2-CM), en la que podemos observar que la conversión de CO e hidrógeno en las etapas 2, 3 y 4 fueron del 100%, además de la conversión del 99,96% de CO y 98,20% de hidrógeno en la prueba 1, con el caudal de syngas de 6 mL/minuto.

Tabla 10. Flujo molar medio del gas de síntesis a la salida del reactor R2-CM, en mmol/día.

Tipo de gas	CO ₂ (mmol/día)	H ₂ (mmol/día)	CH ₄ (mmol/día)	CO (mmol/día)
Inoculo	113,0±40,9	41,1±51,1	80,1±40,5	23,0±32,3
1 prueba, caudal 6 ml/min	145,4±4,0	2,0±2,7	112,6±2,0	0,0±0,1
2 prueba, caudal 12 ml/min	280,6±6,9	-	219,0±3,5	-
3 prueba, caudal 24 ml/min	591,8±11,2	-	462,5±10,2	-
4 prueba, caudal 48 ml/min	1263,1±18,1	-	978,5±9,9	-

Sin embargo, cabe destacar el importante consumo de monóxido de carbono y hidrógeno a partir del tercer día, todavía en fase de inoculación, a diferencia de lo ocurrido con el cocultivo,

donde hubo un consumo total de monóxido de carbono y un aumento de la producción de biometano a partir del décimo día. Por tanto, se destaca que para el experimento mencionado, el reactor con el consorcio microbiano tuvo una respuesta de fermentación de biometano más rápida.

Cabe destacar que los microorganismos carboxidotróficos en el reactor con el consorcio microbiano fueron más efectivos en la biotransformación de monóxido de carbono, considerando que en los primeros 7 días (fase de inoculación) R2-CM obtuvo una tasa de conversión de 68,9%, mientras que R1-CC obtuvo una tasa de 59,9%, principalmente a través de la transformación en biohidrógeno con *Carboxydotothermus hydrogenoformans*.

En la figura 04 a continuación, podemos ver la evolución diaria de los flujos molares presentes a la salida del reactor con la presencia del consorcio microbiano.

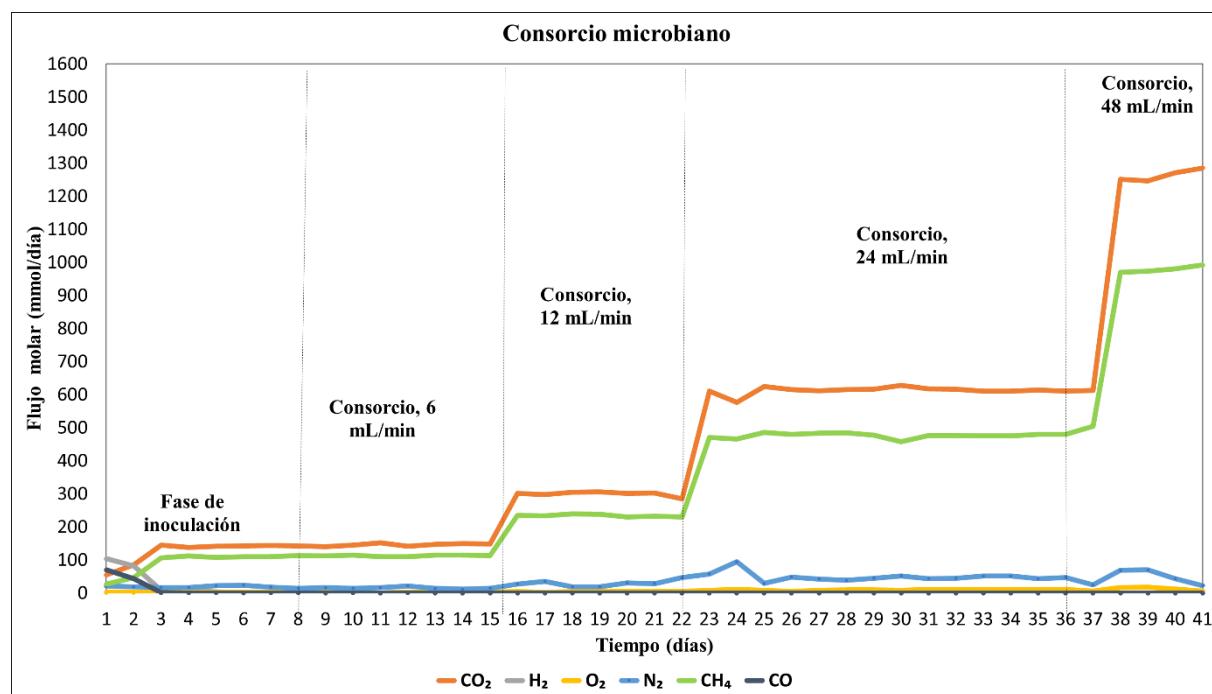


Figura 04.: Evolución temporal de los flujos molares de CO_2 , H_2 , oxígeno, nitrógeno, CH_4 y CO en pruebas de inoculación y consorcio microbiano con 6, 12, 24 y 48 mL/min. Fuente: Autor.

Es de destacar que con el flujo de 48mL/minuto de syngas, los microorganismos presentes en el reactor mantuvieron las tasas de conversión y no se presentaron problemas relacionados con el transporte en la fase gas-líquido, como posiblemente ocurrió con R1-CC, lo que permitió que se produjera la reducción de la conversión de monóxido de carbono.

Los valores de concontración de metano obtenidos en el presente estudio en %(v/v) $39,9 \pm 3,8\%$, para el consorcio microbiano son muy cercanos a los obtenidos por García Casado et al.

(2024) para otro consorcio, obtenidos a partir de lodos de depuradora, que fueron de $41,6 \pm 2,0\%$ [28].

3.2. Correlación entre la generación de biometano y el pH

El pH en el lixiviado de ambos reactores se midió diariamente durante todo el experimento, así como la producción de ácidos grasos volátiles dos veces por semana después de la fase de inoculación. En la Figura 5, podemos ver la correlación entre el pH y la generación de biometano para el reactor R1-CC. En él, podemos observar un ligero descenso del pH a lo largo del experimento, marcado por una línea recta con una pendiente de $-0,36\%$, marcada por un rango desde 6,46 pH mínimo hasta 7,31 pH máximo.

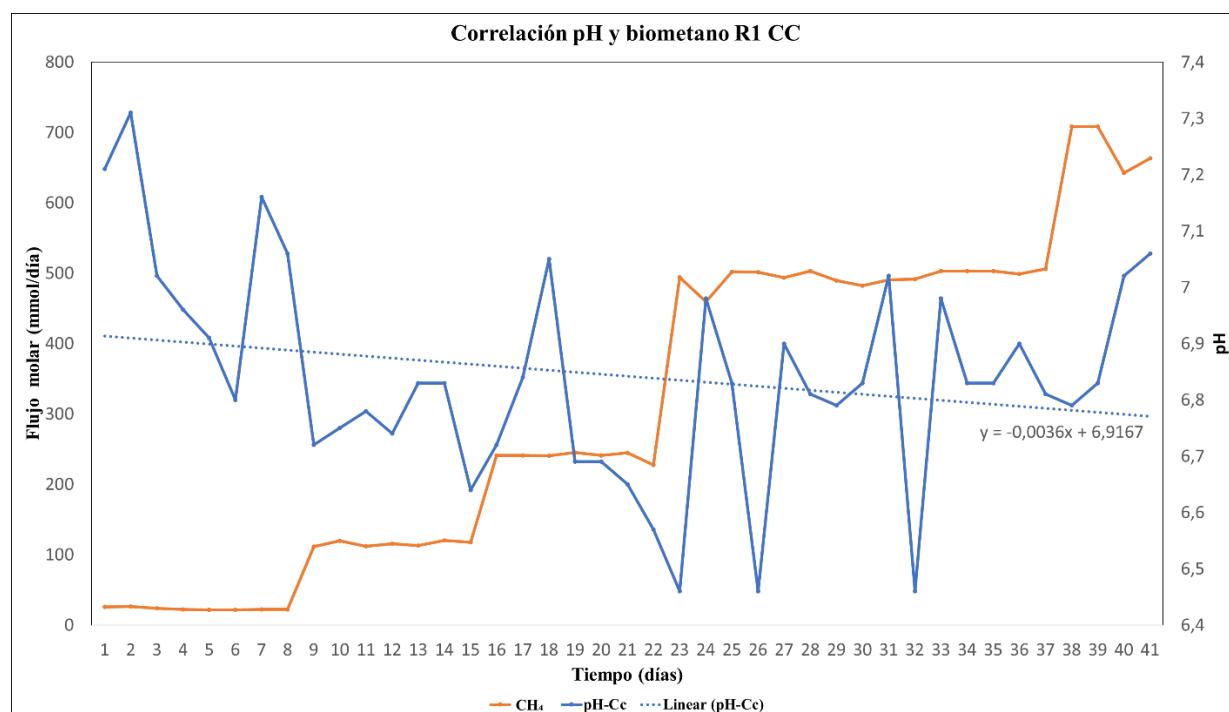


Figura 05.: Evolución del pH y la producción de biometano (CH_4) en el reactor R1-CC durante 41 días. Fuente: Autor.

A pesar de la ligera acidificación del medio, no se percibió ninguna reducción en la producción de biogás, dado que el rango de valores obtenidos durante el experimento no está lejos del valor óptimo de los microorganismos presentes en el reactor con cultivo sintrófico, para el microorganismo *Methanothermobacter thermautotrophicus*, que es un pH entre 7,2 y 7,6 [33] y para el microorganismo *Carboxydothermus hydrogenoformans*, que es de 6,8-7,0 [23].

Se observó una ligera basificación del medio acuoso tras el aumento del caudal de gas de síntesis y, en consecuencia, la producción de biometano fermentado en dicho reactor. Este aumento en la generación de base es seguido de una acidificación en el medio acuoso del reactor de igual intensidad. Los valores de pH entre 6,5 y 7,6 se consideraron como límites adecuados

para R1-CC. Por tanto, el día 30 del experimento se comenzaron a irrigar ambos reactores con medio de cultivo con pH 8, debido a la acidificación del medio ocurrida los días 23 y 26 del experimento, lo que resultó en una acidificación fuera del rango propuesto.

La acidificación del medio acuoso ya estaba empezando a reducir la eficiencia de bioconversión de CO, por lo tanto, el experimento con el flujo de gas de síntesis de 12 mL/min fue mayor (99,96%), en comparación con el 99,08% en el experimento con un flujo de gas de síntesis de 24 mL/min. Podemos ver en la tabla 11 la concentración de ácidos grasos volátiles y su representación porcentual durante el experimento R1 CC.

Tabla 11. Concentración media y distribución porcentual de ácidos grasos volátiles en el reactor R1 CC

Ácido	Promedio R1 CC (mg/L)	Porcentaje R1 CC
Acético	240,2±180,2	28,5%
Propiónico	102,6±84,6	12,2%
Isobutírico	50,1±33,1	5,9%
Butírico	140,8±177,2	16,7%
Isovalérico	220,9±180,8	26,2%
Valérico	22,3±180,8	2,6%
Isocaproíco	29,4±39,4	3,5%
Hexanoíco	36,7±33,7	4,4%

Se observa que los ácidos grasos volátiles más representativos fueron los ácidos acético, propiónico, isovalérico y butírico, que en conjunto representan el 88,6% del total. La evolución temporal de estos ácidos en relación al pH del R1 CC se representa en la figura 06.

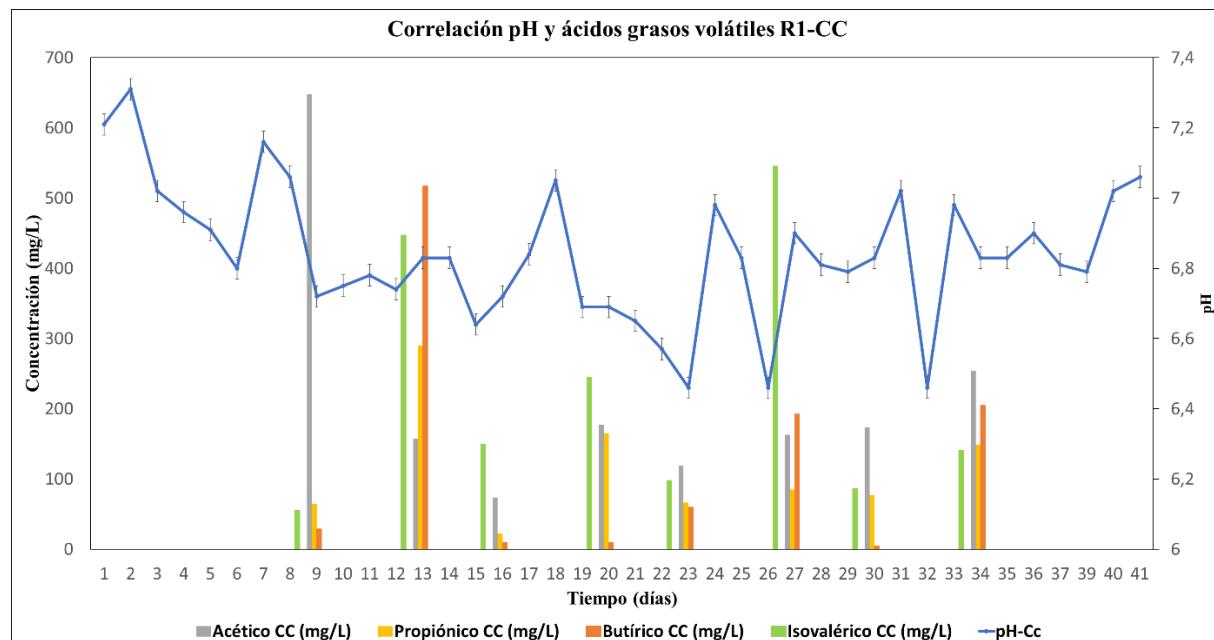


Figura 06.: Evolución del pH y acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) en el reactor R1-CC. Fuente: Autor.

Se puede observar una relación directa entre las concentraciones de los principales ácidos grasos volátiles y la acidificación del medio acuoso. Se destaca el predominio del ácido acético en el día 9 del experimento, lo que coincide también con la fecha de formación de biometano en el reactor, a través del microorganismo *Methanothermobacter thermautotrophicus*, considerando que hasta el día 9 del experimento las actividades fermentativas más expresivas fueron realizadas por *Carboxydotermus hydrogenoformans*, considerando el aumento en la concentración de hidrógeno y CO₂ y en el consumo de CO, lo que se puede apreciar en la figura 3, presentada anteriormente.

Mientras tanto, en la Figura 7, podemos verificar la correlación entre el pH y la generación de biometano para el reactor R2-CM. También se observa a lo largo del experimento una ligera disminución del pH, sin embargo marcada por una línea recta con una pendiente de -1,01%, marcada por un rango desde un pH mínimo de 6,47 a un pH máximo de 7,21.

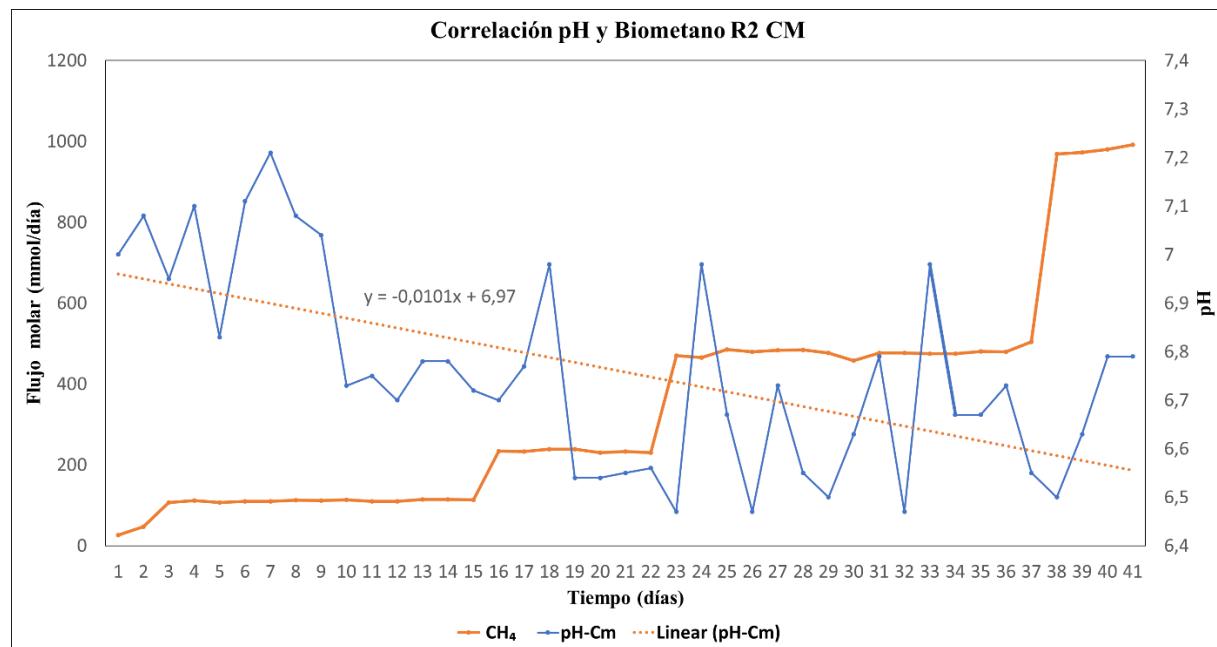


Figura 07.: Evolución del pH y la producción de biometano (CH₄) en el reactor R2-CM durante 41 días. Fuente: Autor.

De manera similar a lo ocurrido en el reactor R1-CC, se observa un aumento de la alcalinidad del reactor a medida que aumenta el caudal de syngas a la entrada, seguido de una acidificación en el medio acuoso de igual o mayor intensidad. No hay una disminución notable en la producción de biometano debido a las fluctuaciones del pH, lo que sugiere que el sistema es resistente a las fluctuaciones del pH. Podemos ver en la Tabla 12 la concentración de ácidos grasos volátiles y su representación porcentual durante el experimento R2 CM.

Tabla 12. Concentración media y distribución porcentual de ácidos grasos volátiles en el reactor R2 CM.

Ácido	Promedio R2 CM (mg/L)	Porcentaje R2 CM
Acético	226,0±156,4	22,7%
Propiónico	104,8±72,5	10,5%
Isobutírico	60,2±57,3	6,1%
Butírico	141,9±204,5	14,3%
Isovalérico	387,5 ± 291,8	39,0%
Valérico	16,9±291,8	1,7%
Isocaproíco	24,8±16,8	2,5%
Hexanoíco	31,5±28,0	3,2%

Se verifica una vez más que los ácidos grasos volátiles más representativos en el lixiviado del reactor 2 fueron el ácido acético, el ácido butírico, el ácido isovalérico y el ácido propiónico, totalizando el 86,6% del total. Por lo tanto, se presentan en la figura 8, en correlación con la generación de pH en el consorcio microbiano.

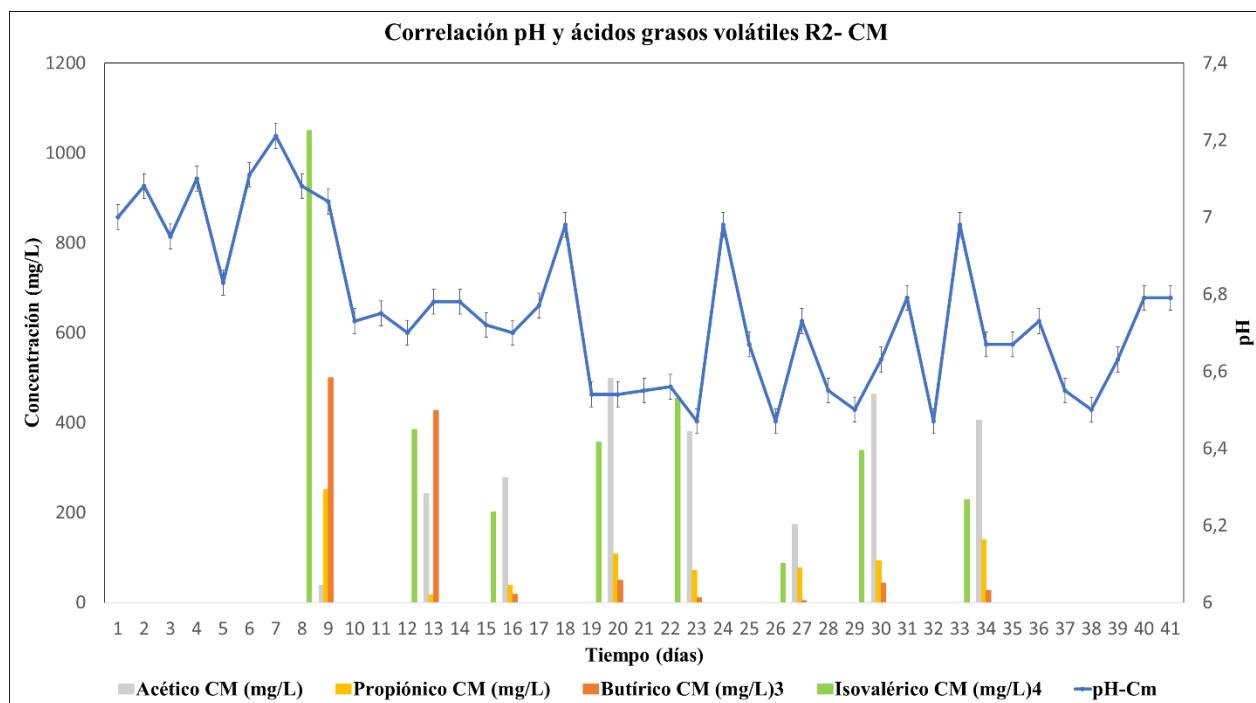


Figura 8.: Evolución del pH y acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV) en el reactor R2-CM. Fuente: Autor.

En el reactor con presencia del consorcio microbiano se observa un incremento en la concentración de ácido acético a medida que avanzan los días del experimento, obteniendo el mayor valor el día 20 del experimento con un valor de 498,75 mg/L. Mientras tanto, el ácido butírico disminuyó con el aumento de la edad de la biomasa microbiana.

3.3. Flujo de carbono y selectividad

Analizando el flujo de carbono que sale del reactor, podemos considerar los gases posteriores a la fermentación de las bacterias, presentados en el apartado de generación de biometano, y también el carbono que queda en el medio acuoso. Es decir, carbono inorgánico, formado por carbono elemental, monóxido de carbono, dióxido de carbono, carbonatos y bicarbonatos [34]. El carbono orgánico, que puede estar representado por ácidos grasos en este estudio, se midió utilizando un analizador de carbono orgánico total disuelto, donde la muestra pasa por un filtro de 0,22 µm antes de realizar el análisis.

En la tabla 13 a continuación podemos ver los resultados de los análisis de carbono orgánico total y carbono inorgánico para ambos reactores, pasando por las etapas a los diferentes flujos de gas de síntesis evaluados.

Tabla 13. Concentraciones de carbono orgánico e inorgánico disueltos en los reactores R1-CC y R2-CM.

	Carbono orgánico total disuelto (mg/L)	Carbono inorgánico disuelto (mg/L)
R1- CC6	509,1 ±59,9	492,4±189,3
R1-CC12	257,1±148,4	280,4±55,4
R1-CC24	332,8±49,1	216,1±56,9
R1-CC48	359,9±0,0	230,0±0,0
	Carbono orgánico total disuelto (mg/L)	Carbono inorgánico disuelto (mg/L)
R2-CM6	91,8±29,6	207,8±34,7
R2-CM12	361,2±115,2	348,7±43,0
R2-CM24	545,1±200,0	275,9±41,6
R2-CM48	560,2±0,0	245,0±0,0

Se puede observar para el reactor 1 que hubo una mayor concentración de carbono orgánico total disuelto (COTD) al inicio del experimento, con una tendencia decreciente, demostrando, por tanto, que la interacción de los microorganismos en este reactor no genera muchos compuestos orgánicos intermedios con el envejecimiento de la biomasa microbiana. Además, la misma tendencia a la disminución de la concentración de carbono inorgánico también se observa para R1-CC, lo que indica que estos compuestos tampoco se acumulan en el biorreactor.

Sin embargo, en el reactor 2, existe una tendencia a un aumento de compuestos orgánicos volátiles filtrados. Lo que indica una tendencia a la acumulación de compuestos intermedios, como el ácido acético observado en otros estudios [27][35].

En la Tabla 14 a continuación se muestra la concentración de los principales productos del metabolismo extracelular en los dos reactores. En esta tabla, damos cuenta de los diferentes

flujos de gas de síntesis, los principales flujos de carbono extracelular, a saber: CO₂, CH₄ y ácido acético. El CO₂ y el CH₄ son productos, principalmente, de las vías metabólicas carboxihidrotróficas e hidrogenotróficas de *Methanothermobacter thermautotrophicus*, presentes en ambos sistemas. Y ácido acético, un producto secundario que se libera en cantidades más pequeñas en el sistema. Cabe señalar que para estos cálculos se restaron el CO₂ y el CH₄ a la entrada del reactor.

Para calcular el ácido acético en mmol/día se consideró la cantidad de medio mineral purgado diariamente, la masa molar del ácido y la concentración en mg/L obtenida en la prueba de cromatografía líquida.

Tabla 14. Tasas de producción de CO₂, CH₄ y ácido acético (mmol/día) en los reactores R1 (cocultivo sintrófico) y R2 (consorcio microbiano) en diferentes condiciones de flujo de syngas.

Concentración de los principales productos metabólicos extracelulares (mmol/día)			
	CO ₂	CH ₄	Ácido acético
R1- CC6	85,0 \pm 17,1	78,1 \pm 33,1	0,4 \pm 0,3
R1-CC12	180,3 \pm 6,2	198,1 \pm 5,9	0,2 \pm 0,1
R1-CC24	373,1 \pm 5,9	425,2 \pm 11,9	0,3 \pm 0,1
R1-CC48	427,4 \pm 79,6	568,2 \pm 33,2	-
	CO ₂	CH ₄	Ácido acético
R2-CM6	88,6 \pm 4,0	86,0 \pm 2,0	0,1 \pm 0,1
R2-CM12	172,6 \pm 6,9	166,1 \pm 3,5	0,8 \pm 0,3
R2-CM24	362,0 \pm 11,2	350,0 \pm 10,2	0,7 \pm 0,2
R2-CM48	772,8 \pm 18,1	736,9 \pm 9,9	-

Existe una tendencia a que tanto el CO₂ como el CH₄ crezcan en ambos reactores con el aumento del flujo de gas de síntesis, lo que indica que ambos grupos de microorganismos fueron capaces de producir biometano, con los flujos de gas de síntesis propuestos, incluso con la presencia de monóxido de carbono que, como se presentó anteriormente, puede considerarse tóxico en concentraciones más altas.

También se observa que la concentración de ácido acético es mayor en el reactor 2, con la presencia del consorcio microbiano, especialmente con el envejecimiento de la biomasa microbiana. Mientras tanto, el reactor 1 tiene una concentración más alta al comienzo del experimento. Cabe señalar que no se contó con registros de la concentración de ácido acético para el flujo de 48mL/min, dada la falta de representatividad de la muestra.

En la tabla 15 a continuación, podemos ver la selectividad de los principales productos metabólicos extracelulares. Este parámetro indica qué producto está siendo favorecido en el sistema.

Tabla 15. Selectividad del producto (CO₂, CH₄ y acetato) en los reactores R1 (cocultivo sintrófico) y R2 (consorcio microbiano) a diferentes caudales de syngas.

Selectividad			
	CO ₂	CH ₄	Ácido acético
R1- CC6	0,5199	0,4776	0,0025
R1-CC12	0,4762	0,5231	0,0007
R1-CC24	0,4672	0,5324	0,0004
R1-CC48	0,4293	0,5707	-
	CO ₂	CH ₄	Ácido acético
R2-CM6	0,5070	0,4922	0,0008
R2-CM12	0,5085	0,4893	0,0023
R2-CM24	0,5080	0,4910	0,0010
R2-CM48	0,5119	0,4881	-

En el Reactor 1 (R1- CC), se puede observar que a medida que aumenta el flujo de gas de síntesis, también aumenta la selectividad del metano, sin embargo, la selectividad del dióxido de carbono disminuye. Se indica por tanto un sistema que tiende a favorecer la formación de metano incluso con grandes cantidades de gas de síntesis suministradas. También se observó una baja producción de ácido acético, la cual mostró una tendencia a disminuir con el aumento del caudal.

Mientras tanto, en el reactor 2 (R2-CM), la selectividad se mantiene relativamente constante en todas las pruebas, incluso con diferentes suministros de gas de síntesis. Indicando por tanto un sistema más equilibrado y estable. La formación de ácido acético también es mínima, aunque tiende a aumentar a medida que aumenta el tiempo de funcionamiento del reactor.

3.4. Eficiencia de la biometanización

En esta sección se calculará la eficiencia de biometanización para cada flujo de gas de síntesis, en ambos reactores. Con el objetivo de verificar las condiciones óptimas para cada grupo microbiano. En la tabla 16, podemos ver las eficiencias de conversión del carbono presente en el gas de síntesis de entrada en biometano a la salida de ambos reactores.

Tabla 16. Eficiencia de conversión de gas de síntesis a CH₄ en los reactores R1 y R2.

Eficiencia R1-CC (%)	
R1- CC6	49,6%
R1-CC12	61,2%
R1-CC24	63,8%
R1-CC48	41,2%
Eficiencia R2-CM (%)	
R2-CM6	54,6%
R2-CM12	51,3%
R2-CM24	52,5%
R2-CM48	53,5%

Podemos observar que el reactor 1 con presencia de co-cultivo sintrófico logró una mayor eficiencia de biometanización que el reactor 2 para flujos de suministro de gas de síntesis de 12 y 24 mL/min. Sin embargo, es evidente que cuando se alcanzó el caudal de 48 mL/min se produjo una reducción significativa de la biometanización del reactor.

El sistema R1 CC no logró retener una buena porción del flujo para el caudal de 48 mL/min, dado que para este caudal la velocidad de recirculación lineal en el reactor también se duplicó, pasando de $5,4857 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a un caudal de 24 L/min a $10,9714 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ a un caudal de 48 L/min, y como resultado el sistema presentó una baja tasa de transferencia de gas de síntesis.

Sin embargo, se puede observar que el reactor 2 presenta aproximadamente la misma eficiencia en todos los flujos de gas de síntesis, lo que indica que el sistema presenta una mayor robustez con diferentes caudales suministrados. En la figura 09, podemos ver la relación de eficiencia en la biometanización y selectividad para la formación de Biometano para R1-CC, a lo largo de los diferentes caudales.

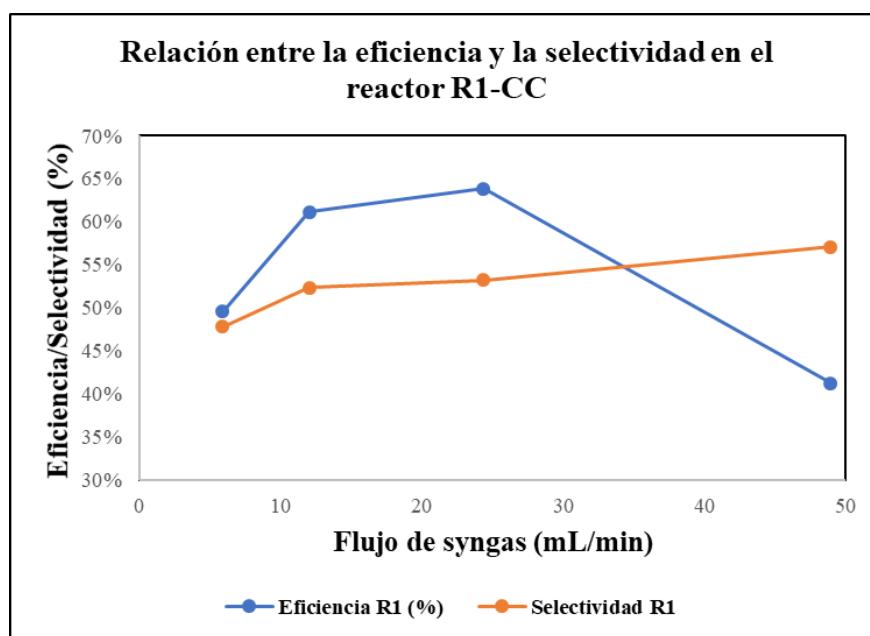


Figura 09.: Comparación entre la eficiencia de conversión y la selectividad hacia CH_4 en el reactor R1-CC. Fuente: Autor.

Se observa que la eficiencia aumenta significativamente entre caudales de 6 y 12 mL/min, alcanzando un valor máximo a un caudal de 24 mL/min. Sin embargo, con un aumento de flujo de 48 mL/min, se produce una fuerte caída en la eficiencia, lo que indica una posible limitación operativa en el sistema.

Sin embargo, la selectividad por el metano presenta un comportamiento creciente y continuo, indicando que, a pesar de la baja eficiencia en la producción de metano para el flujo de 48

mL/min, el sistema aún prefiere formar biometano que otros productos metabólicos extracelulares.

En la figura 10, podemos ver la gráfica comparativa entre eficiencia y selectividad para el reactor 2, con presencia del consorcio microbiano.

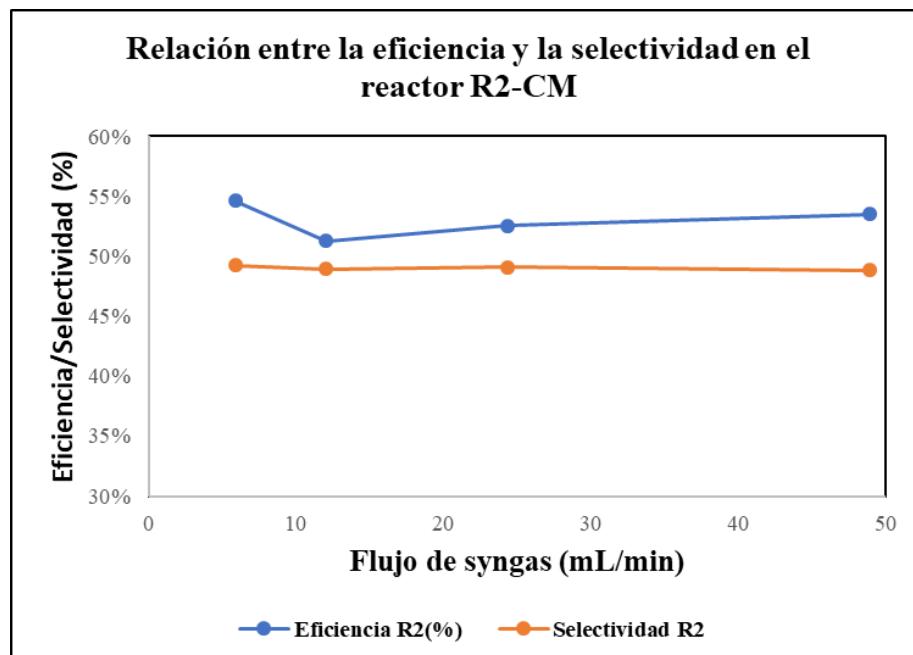


Figura 10.: Comparación entre la eficiencia de conversión y la selectividad hacia CH₄ en el reactor R2-CM. Fuente: Autor.

Para el reactor 2, existe una mayor estabilidad en la formación de biometano con diferentes flujos de gas de síntesis, así como una tendencia estable a la formación de biometano en comparación con otros productos metabólicos extracelulares.

4. CONCLUSIÓN

En este trabajo se investigó el comportamiento de la biometanización del gas de síntesis con una composición similar al generado en procesos de gasificación de biomasa (35% H₂, 30% CO, 25% CO₂ y 10% CH₄), de dos grupos de microorganismos en biofiltros, a saber: un cocultivo sintrófico con presencia de *Methanothermobacter thermautotrophicus* y *Carboxydotothermus hydrogenoformans* y un consorcio microbiano con presencia de arqueas metanogénicas del género *Methanothermobacter* y bacterias carboxidotróficas del filo Firmicutes

Se encontró que el cocultivo sintrófico presentó mayor oscilación en la eficiencia de biometanización, sin embargo, logró alcanzar el valor de metanización más representativo, el cual fue de 63,8%, utilizando un caudal de gas de síntesis de 24 mL/min. Esto contrasta con el valor máximo alcanzado por el consorcio microbiano que fue del 53,49% a un flujo de gas de síntesis de 48 mL/min.

Sin embargo, a pesar de lograr una mayor eficiencia de biometanización, el co-cultivo soportó un proceso más inestable, dado que no fue capaz de asimilar el flujo de gas de síntesis de 48 mL/min, reduciendo la eficiencia de metanización en más de un 22% con relación al máximo citado. En este sentido, el consorcio microbiano se mostró como el sistema más estable en la producción de biometano, dada la baja oscilación en las eficiencias de biometanización y en la selectividad de producción de biometano, y por tanto es el sistema que puede asimilar la mayor concentración de CO.

Respecto a la generación de productos secundarios, existe una tendencia del cocultivo sintrófico a liberar más ácidos grasos volátiles en los primeros días del experimento, probablemente debido a la adaptación de los metabolismos de los microorganismos. Sin embargo, el consorcio microbiano presentó una mayor producción de AGV con el aumento en la carga de gas de síntesis.

5. SUGERENCIA PARA TRABAJOS FUTUROS

Como sugerencia para trabajos futuros, recomendamos la implementación de sensores de temperatura y presión, con captura instantánea de datos a la entrada y salida del reactor, con el objetivo de un monitoreo más inmediato de los cambios. Además de verificar las posibilidades de otros co-cultivos sintróficos en los que los microorganismos tengan características similares para tener mejor adaptabilidad, como se muestra en la tabla 3 de este estudio, citando a Galani et. (2025) [16].

6. REFERENCIAS

- [1] European Commission. (2019). *Communication from the Commission: The European Green Deal* (COM (2019) 640 final). https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:b828d165-1c22-11ea-8c1f-01aa75ed71a1.0008.02/DOC_1&format=PDF
- [2] Eurostat. (2024). *Waste statistics: Total waste generation*. European Commission. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics#Total_waste_generation
- [3] Eurostat. (2025). *Municipal waste statistics: Municipal waste generation*. European Commission. Retrieved May 19, 2025, from https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Municipal_waste_statistics#Municipal_waste_generation
- [4] European Parliament & Council of the European Union. (2018). *Directive (EU) 2018/850 of 30 May 2018 amending Directive 1999/31/EC on the landfill of waste*. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018L0850>
- [5] European Parliament & Council of the European Union. (2008). *Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives*. Official Journal of the European Union, L 312, 3–30. <https://www.boe.es/DOUE/2008/312/L00003-00030.pdf>
- [6] Atstaja, D., Cudecka-Purina, N., Koval, V., Kuzmina, J., Butkevics, J., & Hrinchenko, H. (2024). Waste-to-Energy in the Circular Economy Transition and Development of Resource-Efficient Business Models. *Energies*, 17(16), 4188. <https://doi.org/10.3390/en17164188>
- [7] Zero Waste Europe. (2019). *The impact of Waste-to-Energy incineration on climate* [Policy briefing]. Zero Waste Europe. <https://zerowasteeurope.eu/library/the-impact-of-waste-to-energy-incineration-on-climate/>
- [8] López, I. (2014). *Ánalisis de la viabilidad de la valorización energética de residuos sólidos urbanos en España* [Comunicación técnica]. Congreso Nacional del Medio Ambiente (CONAMA). <http://www.conama11.vsf.es/conama10/download/files/conama2014/CT%202014/1896711942.pdf>
- [9] Anchimas, H. (2022). Waste-to-energy technologies. In *Waste Management* (pp. 567-589). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822810-4.00027-0>
- [10] Paniagua, S., et al. (2022). Syngas biomethanation: Current state and future perspectives. *Bioresource Technology*, 356, 127429. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127436>

- [11] Hu, Q., Dai, Y., & Wang, C.-H. (2020). *Steam co-gasification of horticultural waste and sewage sludge: Product distribution, synergistic analysis and optimization*. *Bioresource Technology*, 301, 122780. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122780>
- [12] Fu, L., Cao, Y., & Du, J. (2022). *H₂-rich syngas produced from steam gasification of municipal solid waste: A modeling approach*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 24(3), 1001–1007. <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02236-3>
- [13] Mojaver, M., Hasanzadeh, R., Azdast, T., & Park, C. B. (2022). Comparative study on air gasification of plastic waste and conventional biomass based on coupling of AHP/TOPSIS multi-criteria decision analysis. *Chemosphere*, 286, 131867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131867>
- [14] Mărculescu, C., Tîrtea, R. N., Khachatryan, L., & Boldor, D. (2022). Investigation of gasification kinetics of multi-component waste mixtures in a novel thermogravimetric flow reactor via gas analysis. *Bioresource Technology*, 343, 126044. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126044>
- [15] Speight, J. G. (2020). Hydrocarbons from synthesis gas. In *Handbook of industrial hydrocarbon processes* (2^a ed., pp. 281–323). Gulf Professional Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809923-0.00008-4>
- [16] Galani, A., Sipkema, D., & Sousa, D. Z. (2025). Hot prospects: Harnessing thermophilic microbes for syngas fermentation. *Trends in Biotechnology*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2025.04.017>
- [17] Klasson, K. T., Ackerson, M. D., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. (1992). Bioconversion of synthesis gas into liquid or gaseous fuels. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(8), 602–608. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90033-K](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90033-K)
- [18] Schöne, C., & Rother, M. (2018). Methanogenesis from carbon monoxide. In A. J. M. Stams & D. Sousa (Eds.), *Biogenesis of hydrocarbons* (pp. 1–19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4_4-1
- [19] Segovia Fernández, E. A. (2018). *Caracterización y cuantificación de las poblaciones de bacterias y arqueas presentes en digestores anaerobios de EDAR* (Trabajo Final de Máster, Máster Interuniversitario en Ingeniería Ambiental). Universitat Politècnica de València. Tutores: D. Aguado García, L. Borrás Falomir, & Á. Baeza Serrano.
- [20] Jabłoński, S., & Łukaszewicz, M. (2015). Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 12), 4675–4679. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.000065>
- [21] Daniels, L., Fuchs, G., Thauer, R. K., & Zeikus, J. G. (1977). *Carbon monoxide oxidation by methanogenic bacteria*. *Journal of Bacteriology*, 132(1), 118–126. <https://doi.org/10.1128/jb.132.1.118-126.1977>
- [22] Diender, M., Afonso Goncalves Pereira, R., Wessels, H. J. C. T., Stams, A. J. M., & Machado de Sousa, D. Z. (2016). Proteomic analysis of the hydrogen and carbon monoxide

metabolism of *Methanothermobacter marburgensis*. *Frontiers in Microbiology*, 7, Article 1049. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01049>

[23] Svetlichny, V. A., Sokolova, T. G., Gerhardt, M., Ringpfeil, M., Kostrikina, N. A., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (1991). *Carboxydotermus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing thermophilic anaerobic bacterium from hydrothermal environments of Kunashir Island. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(3), 254–260. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80377-2](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80377-2)

[24] Yoneda, Y., Yoshida, T., Kawaichi, S., Daifuku, T., Takabe, K., & Sako, Y. (2012). *Carboxydotermus pertinax* sp. nov., a thermophilic, hydrogenogenic, Fe(III)-reducing, sulfur-reducing carboxydrophic bacterium from an acidic hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 7), 1692–1697. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.031583-0>

[25] Weghoff, M. C., & Müller, V. (2016). CO metabolism in the thermophilic acetogen *Thermoanaerobacter kivui*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(8), 2312–2319. <https://doi.org/10.1128/AEM.00122-16>

[26] Zipperle, A., Reischl, B., Schmider, T., Stadlbauer, M., Kushkevych, I., Pruckner, C., Vítězová, M., & Rittmann, S. K.-M. R. (2021). Biomethanation of carbon monoxide by hyperthermophilic artificial archaeal co-cultures. *Fermentation*, 7(4), 276. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040276>

[27] Diender, M., Uhl, P. S., Bitter, J. H., Stams, A. J. M., & Sousa, D. Z. (2018). *High rate biomethanation of carbon monoxide-rich gases via a thermophilic synthetic coculture*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(2), 2169–2176. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03601>

[28] García-Casado, S., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2024). Enrichment of a mixed syngas-converting culture for volatile fatty acids and methane production. *Bioresource Technology*, 400, 130646. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130646>.

[29] Rodríguez-Gallego, V., Bucci, P., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2025, 13 de maio). *Enrichment of mesophilic and thermophilic mixed microbial cultures for syngas biomethanation in bubble column bioreactors under continuous operation* [Pré-print]. SSRN. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5253170>

[30] Bu, F., Dong, N., Khanal, S. K., Xie, L., & Zhou, Q. (2018). *Effects of CO on hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic and extreme-thermophilic conditions*. *Bioresource Technology*, 266, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.092>

[31] Centro de Tratamiento de Residuos de Valladolid. (2025, 7 de abril). *Datos meteorológicos en IQ051*. http://www.ctrvalladolid.com/meteo/iq051/IQ051_meteo.html.

[32] Henstra, A. M., & Stams, A. J. M. (2011). *Deep conversion of carbon monoxide to hydrogen and formation of acetate by the anaerobic thermophile Carboxydotermus*

hydrogenoformans. *International Journal of Microbiology*, 2011, Article 641582. <https://doi.org/10.1155/2011/641582>

[33] Prathiviraj, R., & Chellapandi, P. (2019). Functional annotation of operome from *Methanothermobacter thermautotrophicus* ΔH: An insight to metabolic gap filling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 350–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.100>

[34] Alcaide, R. L. M. Forti, M.C. (2012). PROTOCOLO PARA DETERMINAR CAO DE CARBONO TOTAL EM SOLUÇÕES AQUOSAS [Instituto Nacional de Investigaciones Espaciales (INPE)]. <http://mtc-m16d.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m19/2012/01.20.16.43/doc/publicacao.pdf>

[35] Figueras, J., Benbelkacem, H., Dumas, C., & Buffiere, P. (2023). *Syngas biomethanation: Study of process performances at high syngas flow rate in pressurized stirred column*. *Bioresource Technology*, 376, 128936. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128936>