



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN/HAMBRUNA COMO ALTERNATIVA ROBUSTA EN LA BIOFILTRACIÓN DE METANO

Autor:

Merchán Catalina, Laura

Tutor 1:

Muñoz Torre, Raúl

Tutor 2:

Lebrero Fernández, Raquel

Tutor 3:

López Neila, Juan Carlos

Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente
Valladolid, Junio del 2017

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron las estrategias de alimentación/hambruna en dos biofiltros alternos, siendo comparado su desempeño con el de un biofiltro estándar alimentado de forma continua con metano como fuente de carbono. Se evaluó la robustez de los biofiltros a lo largo de cuatro diferentes etapas de operación mediante el aumento de los periodos de hambruna, la disminución de la tasa de riego y la privación de aire en el periodo de hambruna. Las unidades alternas se caracterizaron por capacidades de eliminación medias de un 17,4 % y mineralizaciones medias de un 12,6 % mayores que en la unidad control, así como por caídas de presión promedio de 1,6 veces menores que las registradas en dicha unidad. Los periodos de recuperación de actividad en las unidades alternas (1,5 h) observados son los más bajos registrados hasta la fecha en procesos de biofiltración de contaminantes gaseosos.

Palabras clave

Biofiltro, eliminación de gases de efecto invernadero, estrategias de control de biomasa, metanótrofos, robustez.

ABSTRACT

In the present study, feast-famine strategies were evaluated in two alternative biofilters and compared with a standard continuous biofilter using methane as a carbon source. The robustness of the biofilters was evaluated along four different operational stages towards increasing famine periods, the reduction of the rate of irrigation and the air deprivation in the famine period. The alternate biofilters exhibited higher CH₄ elimination capacities (17,4 % higher on average) and mineralizations (12,6 % higher on average) than the standard biofilter, together with average pressure drops 1,6 times lower than those recorded for the control unit. The recovery periods observed after pollutant supply resumption (1,5 h) were the lowest so far reported in biofiltration

Keywords

Biofilter, biomass control strategies, greenhouse gas abatement, methanotroph, robustness.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Metano y su problemática medioambiental.....	7
1.2. Tecnologías de eliminación de metano.....	9
1.2.1. Tratamientos físicos y químicos.....	9
1.2.2. Tratamientos biológicos.....	11
1.3. Metanótrofos.....	15
1.4. Problemática de las biotecnologías de CH ₄	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Medio mineral, gases, reactivos e inóculo.....	23
3.2. Ensayo en <i>batch</i>	25
3.3. Enriquecimiento de metanótrofos.....	26
3.4. Configuración del sistema experimental de biofiltros.....	27
3.5. Modo de operación.....	28
3.6. Métodos analíticos.....	30
3.7. Cálculos.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Selección del medio de nutrientes.....	33
4.2. Enriquecimiento en reactor de tanque agitado.....	34
4.3. Operación de los BFs.....	34
4.3.1. Desempeño de los BFs durante el tratamiento de CH ₄ ...34	
4.3.2. Evolución de la caída de presión.....	39
4.3.3. Evolución del proceso de nitrificación.....	41
5. CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	55
ANEXO I. Rectas de calibrado.....	55
ANEXO II. Imágenes del sistema.....	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metano y su problemática medioambiental

El metano (CH_4) es un compuesto apolar que se presenta en forma gaseosa a temperatura y presión ambiente. Es incoloro, inodoro y su solubilidad en agua es baja (siendo 29,4 su constante de Henry adimensional a 25°C y 1 atm). En la Tabla 1 se recogen las propiedades físicas y químicas más importantes del CH_4 (ficha de datos de seguridad de Abelló-Linde, España).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del CH_4 .

Propiedad	Valor
Densidad (kg m^{-3})	0,7
Masa molar (g mol^{-1})	16,0
Solubilidad en agua (mg L^{-1} 25°C)	22,0
Punto de fusión (K)	90,6
Punto de ebullición (K)	111,6
Punto de inflamabilidad (K)	85,2
Límites de explosividad (% en volumen)	
LEI (límite de explosividad inferior)	5,0
LES (límite de explosividad superior)	15,0

Las fuentes de emisión del CH_4 pueden ser naturales, como producto final de la degradación anaerobia de la materia orgánica en ecosistemas naturales, o antropogénicas, como producto derivado de las actividades industriales y domésticas humanas. Además, el CH_4 es considerado el segundo gas de efecto invernadero (GEI) más perjudicial por detrás del CO_2 , con un potencial de calentamiento global 25 veces mayor que el del CO_2 y con una vida media en atmósfera de aproximadamente 12,4 años (EPA, 2016).

Los GEIs tales como el CH_4 absorben parte de la energía solar reirradiada por la superficie terrestre y la devuelven a ella, creando un efecto de cubierta que aumenta la temperatura media de nuestro planeta. Se estima que para el año 2100 las temperaturas medias globales podrían aumentar entre $1,1^\circ\text{C}$ y $6,4^\circ\text{C}$ en base al crecimiento de emisiones antropogénicas anuales de los GEIs desde la era preindustrial, alcanzándose en 2010 un valor máximo de producción de $49 \text{ Gt CO}_2\text{-eq año}^{-1}$ (EPA, 2016). Además del mencionado aumento de la temperatura, se están dando alteraciones en otros aspectos climáticos tales como los patrones de lluvia u olas de calor, deshielos de la capa de hielo en los polos y el consiguiente aumento del nivel del mar (IPCC, 2014). En este sentido, las inspecciones por satélite han revelado recientemente que en las capas de hielo de Groenlandia y la Antártida se están desprendiendo alrededor de 125 billones de toneladas de hielo al año (equivalente a $0,4 \text{ mm}$ por año), lo que

seguramente provocará un aumento del nivel del mar entre 0,3 y 0,6 metros para 2100 (IPCC, 2014). En última instancia, el cambio climático derivado de las emisiones de GEIs ha alterado la sucesión de estaciones a lo largo del globo terráqueo, lo que consecuentemente ha provocado la migración de tanto especies marinas, como de terrestres y aves, conllevando así cambios importantes en la estructura de los diferentes ecosistemas (EPA, 2016).

Las concentraciones atmosféricas de CH₄ en el año 2011 superaron en un 150 % los valores registrados antes de la revolución industrial, representando alrededor del 60 % de las emisiones de origen antropogénico (IPCC, 2014; EPA, 2016). Entre las fuentes antropogénicas de CH₄ cabe destacar la actividad ganadera (187 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) y el tratamiento de residuos (146 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014, casi 108 Mt de CO₂-eq por residuos sólidos y unas 27 Mt de CO₂-eq por tratamiento de aguas residuales), contribuyendo en menor medida la agricultura (44 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) y la actividad minera derivada de la extracción del carbón (23 Mt de CO₂-eq en la UE en 2014) (EEA, 2016). Las concentraciones de CH₄ de estas emisiones pueden variar entre 0 – 0,2 g CH₄ m⁻³ en el caso de las pilas de compostaje y entre 20 – 100 g CH₄ m⁻³ en el caso de antiguos vertederos. Es importante mencionar que más del 55 % de estas emisiones de CH₄ poseen concentraciones por debajo del límite de explosividad (5 % v/v), por lo que no son adecuadas para la obtención de energía (Estrada *et al.*, 2014).

La aplicación del Protocolo de Kioto, por el cual los países firmantes se comprometían a reducir las emisiones globales de GEIs al menos en un 5 % respecto de las dadas en el año 1990, ha endurecido las normas sobre emisiones, y con ello las concentraciones permitidas. A nivel nacional, España ha desarrollado la Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia (EECCEL, 2007) 2007-2012-2020, la cual forma parte de la Estrategia Española de Desarrollo Sostenible, como medida de prevención del cambio climático y sus efectos, adoptando diferentes medidas de actuación en contribución al desarrollo sostenible y energía limpia (EEDS, 2007). En este marco se encuentra la Estrategia Regional contra el Cambio Climático en Castilla y León 2009-2012-2020 (BOCyL, 2009), la cual incluye un total de 104 medidas de adaptación y mitigación agrupadas en un total de 7 planes de carácter sectorial y uno de carácter transversal con los que se persigue reducir las emisiones en dicha comunidad hasta 15,0 Mt CO₂-eq año⁻¹ más que las 12,1 Mt CO₂-eq año⁻¹ que se estarían reduciendo con la aplicación de la EECCEL. Dadas las crecientes restricciones anteriormente mencionadas y la importante contribución del metano a las emisiones nacionales, es de especial relevancia desarrollar tecnologías sostenibles y económicamente rentables para el tratamiento de las emisiones diluidas de CH₄.

1.2. Tecnologías de eliminación de metano

1.2.1. Tratamientos físicos y químicos

Desde el siglo pasado, los gases residuales industriales se han tratado tradicionalmente mediante métodos físico-químicos derivados de la industria petroquímica como la incineración, la oxidación química, la condensación o la adsorción en carbón activo. El principal proceso empleado para este fin ha sido la incineración o combustión, que puede ser a su vez térmica o catalítica. Se describen a continuación el fundamento de las principales tecnologías físico-química:

Combustión térmica

Se basa en la degradación de compuestos orgánicos, en este caso el CH_4 , mediante una oxidación en presencia de oxígeno, que será el comburente de la operación, para generar agua y CO_2 . Para realizar dicha transformación se utilizan incineradores, antorchas o quemadores de postcombustión. Se introduce en ellos los elementos de la combustión: combustible (CH_4), comburente (O_2), el tiempo y la temperatura adecuada (en torno a unos 0,3-0.5 s y 650°C de media en un incinerador de llama directa) (Brunner, 1996). En algunos casos se hace necesario la utilización de combustibles de apoyo, con lo cual se incrementa la huella de CO_2 . Con las condiciones adecuadas se pueden llegar a conseguir rendimientos de eliminación de CH_4 del 96 al 99,5 % (Seoáñez, 1998).

Combustión catalítica

Consiste en un proceso de combustión sin llama, basado en la utilización de catalizadores o agentes que provocan o aceleran la oxidación sin participar directamente. Las fases de esta reacción son las siguientes:

- Difusión de los reactivos con la corriente de gas a través del fluido estancado que rodea la superficie del catalizador.
- Adsorción de los reactivos en la superficie del catalizador.
- Reacción de los reactivos para formar los productos.
- Desorción de los productos de la superficie del catalizador.
- Difusión de los productos desde los poros y la película superficial del catalizador a la fase gas exterior del catalizador.

Este método de tratamiento requiere catalizadores formados por metales nobles como el platino, paladio, rodio, etc., pudiéndose utilizar también otros materiales como el cromito de cobre y los óxidos de cobre, cromo, manganeso, níquel y cobalto (Brunner, 1996). Generalmente se necesitan pequeñas cantidades de catalizador para conseguir la mayor cantidad de superficie de contacto con la corriente gaseosa.

El gas debe ser puesto a la temperatura de ignición y si es necesario se usa combustible externo, aunque al ser esta temperatura inferior a la empleada en combustión sin catalizador suele requerirse menor cantidad de combustible de apoyo (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de temperaturas para la oxidación de metano.

Combustible	Térmica (°C)	Catalítica (°C)	Diferencia de Temperatura (°C)	Rendimiento Catalítica/térmica
Metano	630	500	130	85

Se hace necesario un buen control de la temperatura del gas a través del lecho de catalizador, así como una cantidad suficiente de oxígeno en la corriente gaseosa para asegurar un buen rendimiento del proceso. Además, la corriente de gas debe estar libre de partículas para proteger el catalizador del ensuciamiento y taponamiento de los poros, de lo contrario sería necesario hacer un pretratamiento del gas mediante separación ciclónica o precipitación electrostática. Este tipo de combustión puede utilizarse en corrientes más diluidas, con concentraciones de metano inferiores al 25 % del LEI (Brunner, 1996).

Condensación

Se trata de un proceso físico-químico muy útil durante el tratamiento de gases, puesto que puede servir para recuperar parte del producto tratado. Se fundamenta en la separación de los contaminantes condensables de la corriente gaseosa (Seoáñez, 1998). Existen 2 tipos de condensadores para este fin:

- De contacto: Mezclan el condensado, los vapores y el refrigerante (normalmente agua). Este tipo de condensador da lugar a mayor cantidad de condensado, aunque el consumo de agua es mayor. Puede ser usado como un sistema de lavado previo a un sistema de combustión u oxidación.
- De superficie: Provocan el contacto de los vapores y el condensado con una superficie refrigerada, sin mezclarse con el refrigerante.

Adsorción

Esta tecnología se basa en las propiedades físicas de algunos sólidos porosos de estructura ultramicroscópica de atraer selectivamente los gases y adsorberlos en su superficie. El proceso consiste en hacer pasar el aire a través de un lecho del sólido poroso con capacidad para retener el compuesto gaseoso en cuestión, en este caso el CH₄. Normalmente se utiliza como

adsorbente el carbón activo debido a que tiene una gran superficie específica, es un material no polar y se puede regenerar con facilidad. El carbón activo se va cargando con el gas contaminante hasta alcanzarse el punto de saturación. Alcanzado este punto, el filtro se puede desechar y tratar como residuo sólido, o bien regenerarlo haciendo pasar una corriente de vapor o de un gas inerte, pudiéndose recuperar el contaminante (CH_4) eliminado de la corriente de aire original (Seoáñez, 1998).

1.2.2. Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos se basan en el uso de microorganismos, como bacterias u hongos, para degradar los compuestos orgánicos perjudiciales mediante procesos metabólicos. Presentan una amplia gama de aplicaciones como el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles (COVs) e incluso compuestos inorgánicos volátiles (CIVs). Estos tratamientos presentan grandes ventajas frente a los tratamientos físico-químicos debido a que operan a presión y temperatura ambiente, no generan subproductos tóxicos, evitan la utilización de compuestos químicos, se reducen los costes energéticos y son más respetuosos con el medio ambiente por su menor huella de carbono (Estrada *et al.*, 2013).

Se han desarrollado diferentes tipos de biorreactores para el tratamiento de contaminantes gaseosos como el CH_4 , siendo sistemas bien de ventilación forzada – donde el aire contaminado es suministrado a un recipiente cerrado o abierto mediante ventilación forzada en modo de flujo ascendente o descendente – o ventilación pasiva – en los que el suministro de CH_4 asciende desde la parte baja del sistema (generalmente abierto) y el oxígeno es difundido desde el aire en la parte superior del biorreactor (Gebert *et al.*, 2003; Gebert y Gröngröft, 2006). Los biorreactores cerrados con ventilación forzada son los sistemas más utilizados para la eliminación de CH_4 a escala de laboratorio, si bien los abiertos por ventilación pasiva se instalan generalmente para tratar las emisiones reales de CH_4 en vertederos. Cabe destacar que en estos sistemas la biomasa debe mantenerse repartida lo más uniformemente posible en todo el volumen de reactor y que la fuente de carbono (y energía) y el resto de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos han de ser eficazmente suministrados para satisfacer el consumo de los mismos.

A continuación, se describen las diferentes configuraciones de reactores utilizadas para el tratamiento de contaminantes gaseosos como el CH_4 (Rittmann y McCarty, 2005):

- Biorreactor de tanque agitado. Consiste en un tanque de cultivo biológico con agitación mecánica para conseguir una mezcla perfecta que mantenga tanto el

cultivo microbiano en suspensión como una alta área interfacial gas-líquido (Figura 1). El agitador suele ser de tipo turbina de disco, de palas planas o de hélice. El gas contaminado es inyectado por la parte inferior del tanque a través de un difusor que lo distribuye por todo el seno del líquido con ayuda del agitador. Debido a que los parámetros que controlan el proceso son la velocidad de agitación y el flujo de entrada del aire, pueden ser empleados en un gran número de procesos sin grandes modificaciones de diseño. Esta configuración de biorreactor es apropiada en procesos de bioconversión de contaminantes gaseosos a bioproductos de valor, ya que permiten una fácil recuperación de la biomasa.

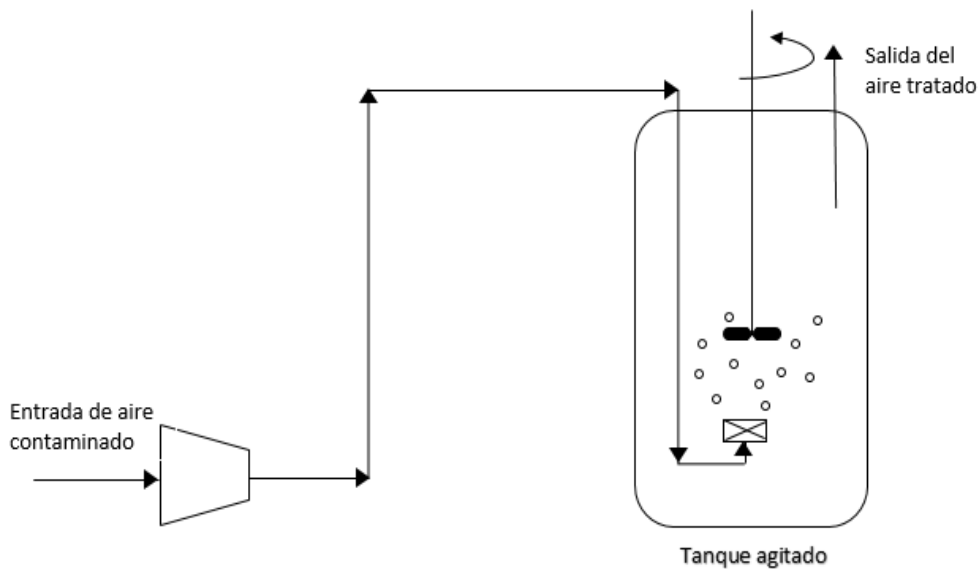


Figura 1. Esquema de un biorreactor de tanque agitado.

- *Air-lift*. En este caso la propia inyección del gas contaminado por la parte inferior del reactor se convierte en el mecanismo de agitación por gradiente de densidad. Está constituido por dos zonas separadas que se encuentran comunicadas únicamente por las partes superior e inferior (Figura 2). El aire se inyecta por la zona ascendente, lo que altera la densidad del líquido y provoca la existencia de un gradiente de densidades que hace que el líquido se mueva hacia arriba. Análogamente, en la zona descendente el aire se mueve hacia abajo de manera continua, asegurando la mezcla adecuada (Bu'lock y Kristiansen, 1991). Los esfuerzos cortantes son homogéneos, por lo que no causa mucho estrés celular en el cultivo que lleva a cabo la biodegradación de los contaminantes. Este tipo de reactor mejora la mezcla homogénea del líquido y la velocidad de transferencia de oxígeno y del contaminante a tratar. Además, la energía consumida es moderada (asociada únicamente al compresor de aire), a diferencia de los reactores de tanque agitado en los que la agitación mecánica requiere de consumo de potencia por el agitador.

Sin embargo, es importante destacar que el diseño del sistema es más complejo que en el caso anterior.

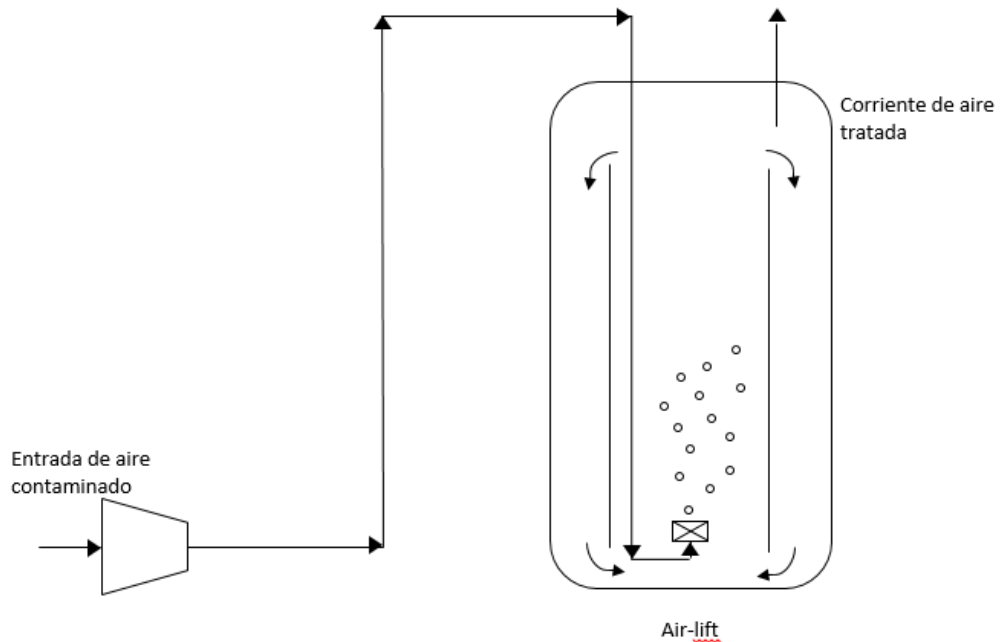


Figura 2. Esquema de un biorreactor tipo *air-lift*.

- Biofiltro. Consiste en un tanque en el que la biomasa se hace crecer en un soporte sólido, bien orgánico o inorgánico, que actúa de lecho filtrante fijo a través del cual se hace circular el aire contaminado (Figura 3). Los contaminantes son degradados por los microorganismos que se encuentran en la biopelícula formada en torno al material de empaque o soporte. El lecho se riega de forma periódica o constante con agua o una solución de aporte de nutrientes. Este sistema permite trabajar en volúmenes reducidos y proporciona a los microorganismos una mayor resistencia frente a las variaciones de pH y temperatura, y frente a los efectos tóxicos de otros metabolitos.

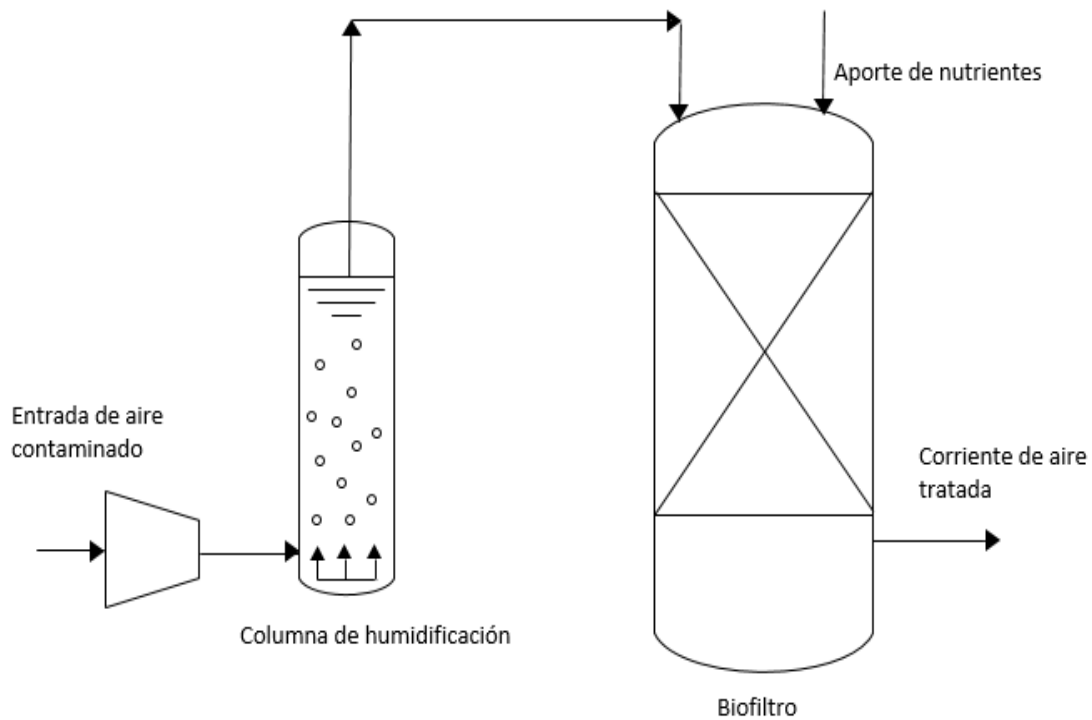


Figura 3. Esquema de un biofiltro.

- Biofiltros percoladores. Se trata de una configuración similar a la de los biofiltros, utilizándose aquí un empaque o soporte inerte sobre el que generar la biopelícula. Consta de un sistema de recirculación continua de líquido (Figura 4), en paralelo o en contracorriente con la corriente de aire contaminado, que mantiene la humedad en el reactor y favorece la transferencia gas-líquido. Con este tipo de sistemas se promueve un mejor lavado de los metabolitos generados durante la degradación del contaminante.

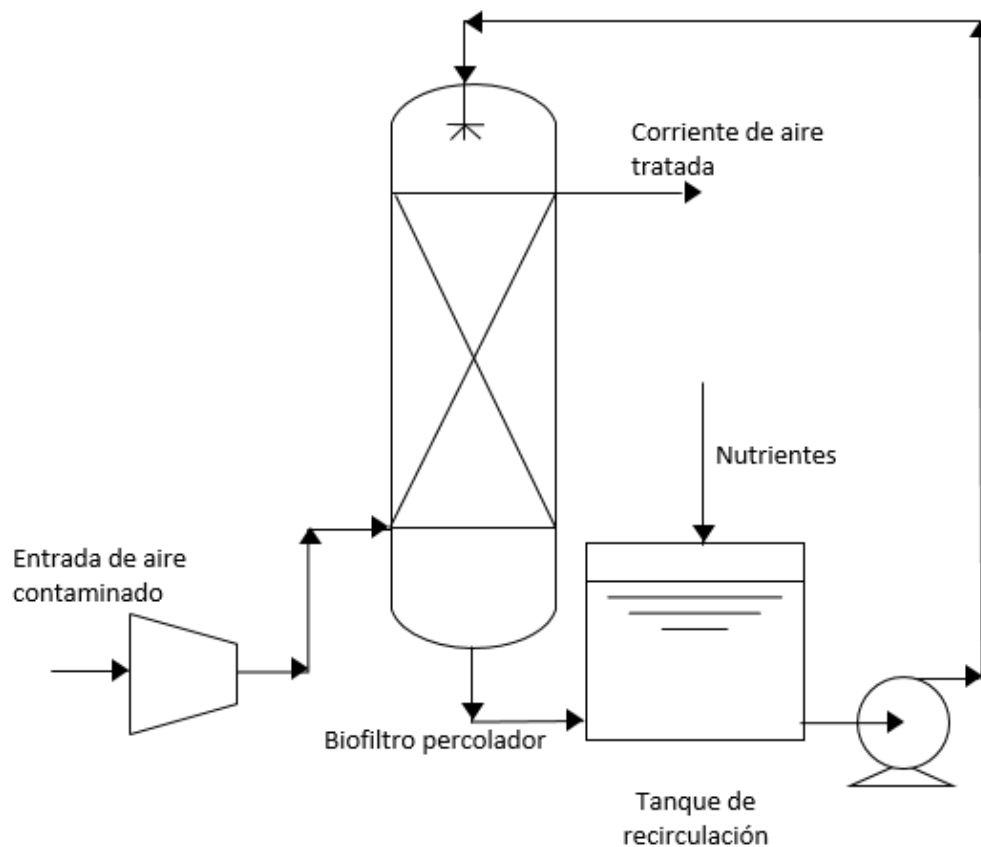


Figura 4. Esquema de un biofiltro percolador.

En los últimos 40 años el desarrollo de biotecnologías de tratamiento de CH_4 en corrientes diluidas ha sido notorio. Las configuraciones más utilizadas son los biofiltros (BFs) (Lebrero *et al.*, 2016; Gómez-Cuervo *et al.*, 2016; Girard *et al.*, 2012) y los biofiltros percoladores (BFP) (Cáceres *et al.*, 2016; Lebrero *et al.*, 2015; Estrada *et al.*, 2014). Eficiencias de eliminación entre 11 y 39 % han sido reportadas para BFPs alimentados con concentraciones entre 0,5-4 % de CH_4 (v/v) a tiempos de residencia de 5-22 min (Cáceres *et al.* 2016; Ávalos-Ramírez *et al.*, 2012; Rocha Ríos *et al.*, 2009). Por otro lado, valores hasta del 50 % fueron obtenidos con BFs con relleno inorgánico trabajando a tiempos de residencia de 4-18 minutos y a concentraciones de 0,1-1 % de CH_4 (v/v) (Girard *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2012; Nikiema y Heitz, 2009) y llegando hasta ~90 % en BFs con relleno orgánico, alimentados al 2 % v/v de CH_4 y operando a tiempos de residencia de 20 minutos (Lebrero *et al.*, 2016).

1.3. Metanótrofos

Las biotecnologías de eliminación de CH_4 anteriormente mencionadas se basan en el uso de los denominados metanótrofos, microorganismos (predominantemente bacterias, aunque también se han descrito arqueas, levaduras y hongos) (Wolf y Hanson, 1979; Enebo, 1967) con la capacidad de

utilizar este compuesto gaseoso como única fuente de carbono y energía. Los metanótrofos son microorganismos metilótrofos, y como tal, pueden utilizar como fuente de carbono y energía aquellos compuestos orgánicos de un átomo de carbono más reducidos que el ácido fórmico, como el CH₄, metanol, metilaminas, halometanos, etc. La mayoría de los metanótrofos oxidan CH₄ en presencia de O₂, aunque en los últimos años se han descrito microorganismos que pueden acoplar la oxidación de CH₄ a la reducción de sulfato, nitrato, nitrito, manganeso o hierro (Knittel y Boetius 2009; Ettwig *et al.*, 2010). Los metanótrofos se encuentran presentes de forma generalizada en el medio ambiente (tundra y humedales, lagos de agua dulce, lodos de depuradora, arrozales, suelos agrícolas, turberas), y tienden a disponerse preferentemente en la interfase entre zonas aerobias y anaerobias con flujos sustanciales de CH₄ (López *et al.*, 2014; Bowman, 2006; Hanson y Hanson, 1996).

La clasificación taxónomica existente hasta la fecha de las bacterias metanótrofas distingue entre tres tipos diferentes: I, II y X. Los metanótrofos de tipo I se caracterizan por formar membranas intracitoplasmáticas en forma de vesículas apiladas compactas, presentar ácidos grasos de membrana de 14-16 átomos de C y utilizar la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) como ruta de asimilación de carbono. Estos metanótrofos pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria* y entre los géneros más representativos se encuentran *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylosarcina* (Bratina *et al.*, 1992). Las bacterias encapsuladas de los géneros *Clonothrix* y *Crenothrix* dentro de la familia *Methylococcaceae* también han sido recientemente identificadas como metanótrofos de tipo I (Op den Camp *et al.*, 2009). Los metanótrofos de tipo II se encuentran dentro de la clase *Alphaproteobacteria* (*Methylosinus* y *Methylocystis*) y se caracterizan por poseer membranas intracitoplasmáticas dispuestas a lo largo de la parte periférica de la célula en forma de laminillas, ácidos grasos de membrana de 18 átomos de C y por utilizar la vía de la serina para la asimilación de carbono (Hanson y Hanson, 1996; Scott *et al.*, 1981; Patt y Hanson, 1978). Los metanótrofos de tipo X, considerados como un subgrupo de los tipo I, presentan características de los dos grupos anteriormente mencionados, de forma que utilizan la vía de la RuMP, poseen una ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa para la fijación de CO₂, crecen a temperaturas más altas que los tipos I y II, y tienen como principal representante al género *Methylococcus* (López *et al.*, 2013; Semrau, 2011; Op den Camp, 2009; Hanson y Hanson, 1996). A pesar del hecho de que la mayoría de los metanótrofos están incluidos en las clases *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, se han identificado algunos en el filo NC10 y en el subgrupo arqueal ANME-2d (metanótrofos anóxicos reductores de nitrito/nitrato), *Verrucomicrobia* y *Euryarchaeota* (López *et al.*, 2016; Lebrero *et al.*, 2016; Ettwig *et al.* 2010).

La oxidación de CH_4 a metanol mediada por metanótrofos aerobios es posible gracias a la acción metabólica de la enzima conocida como metano monooxigenasa (MMO), la cual se puede presentar en forma particulada (pMMO) asociada a la membrana periplasmática interna, o en forma soluble (sMMO) dentro del citoplasma. La enzima MMO tiene una gama más amplia de sustratos que otras monooxigenasas, entre los que se encuentran alcanos de cadena corta o larga, alquenos, sustancias aromáticas y heterocíclicas, pudiendo llegar incluso a usar el amonio como sustrato (Jiang *et al.*, 2010). Esta enzima está compuesta por una hidroxilasa, una reductasa y una proteína reguladora (López *et al.*, 2013; Wallar y Lipscomb, 2001; Hanson y Hanson, 1996; Lipscomb, 1994). El cobre juega un importante papel como regulador de la síntesis y actividad de la MMO, siendo la síntesis de sMMO inhibida a concentraciones relativamente elevadas de Cu^{2+} ($0,86 \mu\text{mol g}^{-1}$ en peso seco), y requiriéndose la presencia de Fe como cofactor clave en su centro de reacción. Por otro lado, la pMMO aparece de forma constitutiva en todos los metanótrofos aerobios cuando el crecimiento tiene lugar a concentraciones de Cu^{2+} y Fe superiores a $0,8 \mu\text{M}$ (Strong *et al.*, 2015; López *et al.*, 2013; Semrau *et al.*, 2010). Esta MMO también está compuesta por tres polipéptidos, aunque con menor actividad específica que en el caso de la sMMO.

La ruta metabólica de degradación de CH_4 implica inicialmente el empleo de un agente reductor por parte de la MMO para convertirlo a metanol. Así, la sMMO emplea $\text{NADH} + \text{H}^+$ como poder reductor, mientras que la pMMO requiere un citocromo para oxidar el CH_4 presente en el citoplasma. A continuación, la enzima metanol deshidrogenasa (MDH) cataliza la conversión del metanol a formaldehído (Figura 5). A partir del formaldehído, la formación de nueva biomasa o material celular puede tener lugar a través de la ruta RuMP en metanótrofos tipo I y X, o de la ruta de la serina en metanótrofos tipo II. El desdoble de la ruta metabólica se dirige a la mineralización del resto de la fuente de carbono hacia CO_2 , previo paso por la formación de ácido fórmico (Figura 5).

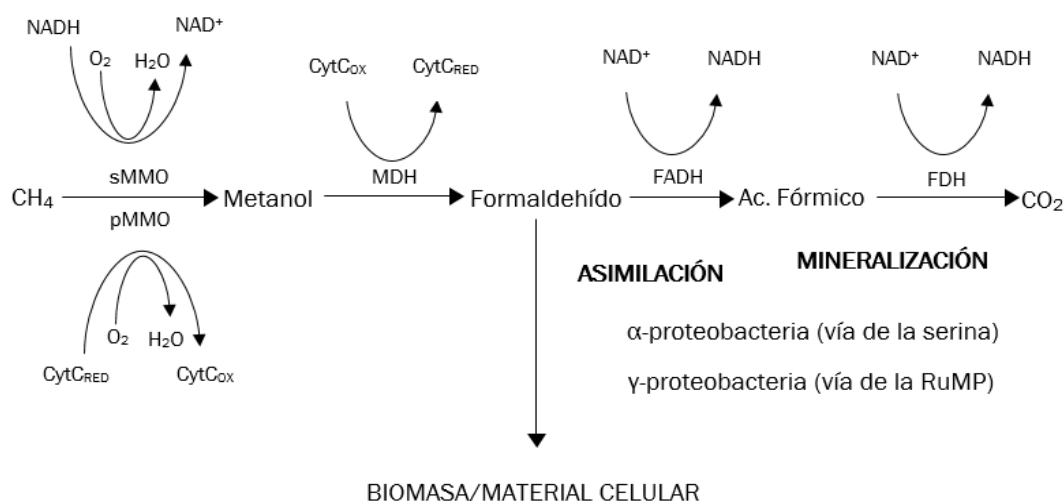


Figura 5. Ruta de la asimilación y mineralización del CH_4 por los metanótrofos (adaptado de Strong *et al.* 2015 y Hanson y Hanson, 1996).

La eficiencia de oxidación de CH_4 de los metanótrofos se ve enormemente afectada por factores tales como el pH, la temperatura, el grado de humedad, así como por la presencia/ausencia y las concentraciones de macro- y micronutrientes (a destacar elementos traza como Cu^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+}). De forma genérica, la oxidación de CH_4 se ve favorecida a temperaturas entre 25 y 35 $^{\circ}C$, pHs entre 7 y 7,7 – aunque es posible encontrar metanótrofos en ambientes alcalinos (pH 9) y ácidos (pH 2-2,5) – así como concentraciones de NH_4^+ y Cu^{2+} en el rango 10-60 μM y por debajo de 4,3 μM , respectivamente (López *et al.*, 2013; Bender y Conrad, 1995). La concentración de CH_4 y O_2 , así como el ratio entre ambos, también afecta significativamente al crecimiento de los metanótrofos. En este contexto, se ha observado que bajos ratios CH_4/O_2 favorecen la aparición de metanótrofos tipo I (Bender y Conrad, 1995), mientras que altos ratios CH_4/O_2 favorecen la presencia de metanótrofos de tipo II. Este hecho se asocia a la mayor afinidad (menor valor de K_s , constante de afinidad de Monod) por CH_4 que tienen los metanótrofos tipo I en comparación con los de tipo II (mayor valor de K_s) (Chidambarampadmavathy *et al.*, 2016; Strong *et al.*, 2015; López *et al.*, 2014).

Entre las fuentes de nitrógeno más utilizadas por metanótrofos se encuentran el nitrato, el amonio, y en menor medida el nitrito, que puede resultar tóxico (Stein *et al.*, 2012; Bédard y Knowles, 1989). La oxidación del amonio es mediada por la enzima amonio monooxigenasa (AMO) en bacterias nitrificantes, y en el caso particular de los metanótrofos, por la enzima MMO en cualquiera de sus formas. Esto último se debe a la baja especificidad por sustrato de la MMO, lo que lleva a los metanótrofos a establecer interacciones con microorganismos nitrificantes y desnitrificantes y a competir por las fuentes de nitrógeno en cuestión (Stein *et al.* 2012; Bédard y Knowles, 1989). En este

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

1.4. Problemática de las biotecnologías de CH₄

A pesar del potencial de las biotecnologías para el tratamiento de gases, la escasa solubilidad del CH₄ dificulta la transferencia de éste a la fase acuosa donde se encuentran los microorganismos y, con ello, la aplicación de dichos tratamientos para la reducción de este GEI. Además, a día de hoy, las biotecnologías de tratamiento de gases como el CH₄ aún requieren de investigación centrada en demostrar la robustez del proceso y en solventar los fallos operacionales asociados al exceso y disposición preferencial de biomasa (Lebrero *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2013). En este sentido, la acumulación en exceso de biomasa dentro de BFs puede generar fallos operacionales durante el tratamiento tales como una mayor resistencia al flujo de aire y una mayor caída de presión y canalización del flujo, lo que puede conducir en última instancia a una reducción de la capacidad de eliminación del contaminante y terminar colmatando el sistema (Devanny y Ramesh, 2005; Morgan-Sagastume *et al.*, 2001). Entre las opciones disponibles para prevenir o solventar estos inconvenientes se encuentran el lavado químico, el lavado a contracorriente o la eliminación mecánica de biomasa por agitación del lecho (Wübker *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996; Weber y Hartmans, 1996; Sorial *et al.*, 1995). Sin embargo, el requerimiento de largos tiempos de recuperación de la actividad microbiana post-tratamiento, el complejo diseño de los reactores o el coste adicional de los respectivos equipos hacen que estas opciones no sean viables hasta la fecha.

En este sentido, el uso de estrategias coordinadas de bajo coste para el control de la biomasa basadas en regímenes de alimentación y hambruna sucesivos podrían permitir un correcto desempeño en los tratamientos biológicos a largo plazo. Las estrategias de alimentación/hambruna (*feast-famine*) consisten en dos periodos de alimentación alternos, uno de alimentación (*feast*) durante el cual se aporta la fuente de C al sistema, y uno de hambruna (*famine*) durante el cual el sistema no es alimentado con dicha fuente. Así, en el periodo de alimentación los microorganismos oxidan la fuente de C para almacenarla a nivel intracelular como material de reserva y nueva biomasa, mientras que en el periodo de hambruna utilizan estos compuestos almacenados como fuente de energía (Suarez-Mendez *et al.*, 2014). Es importante mencionar que durante el periodo de inanición o *famine* puede darse tanto un mantenimiento del

cultivo, como cambios significativos en el número de células, en la composición de la comunidad o en el estado fisiológico (Konopka *et al.* 2002). En este sentido, estudios anteriores en BFs enfocados al tratamiento de tolueno demostraron la existencia de grandes pérdidas de biomasa durante los periodos de hambruna. En concreto, Cox y Deshusses (2002) reportan una pérdida del 10-50 % de masa después de un periodo de inanición de 7 días, obteniéndose al mismo tiempo incrementos en la capacidad de eliminación del contaminante hasta de 2× en comparación con valores previos a la inanición. A pesar de que los microorganismos permanezcan grandes periodos de tiempo sin alimentación, se ha demostrado en biofiltros enfocados a la eliminación de tolueno que el sistema puede recuperar la capacidad de eliminación rápidamente, requiriendo 2 horas para periodos de inanición de una noche y 6 horas para periodos de 2 días de hambruna (Dorado *et al.*, 2012; Álvarez-Hornos *et al.*, 2008). Aunque las estrategias de alimentación/hambruna han sido eficazmente aplicadas en biotecnologías para el tratamiento de tolueno, su aplicación en la eliminación de CH₄ es escasa y no existen estudios que evalúen su robustez en este escenario de creciente relevancia ambiental (Ferdowsi *et al.*, 2016; Dorado *et al.*, 2012; Cox y Deshusses, 2002).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de las estrategias de alimentación/hambruna como alternativas de bajo coste para controlar la acumulación de biomasa y mejorar el desempeño de BFs orientados a la eliminación de CH_4 a concentraciones diluidas (4 %). El desempeño de un BF trabajando bajo alimentación continua de CH_4 y de dos unidades de trabajo alterno bajo sucesivos periodos de alimentación/hambruna se comparó en términos de capacidades de eliminación de CH_4 y mineralización a CO_2 , evolución de la caída de presión, eliminación de N y conversión a los correspondientes subproductos. Como objetivos específicos de este trabajo fin de grado se plantearon:

- Estudio de la duración de los periodos alimentación/hambruna (3:3 y 5:5 días) en el desempeño del sistema en estado pseudo-estacionario y en la capacidad de recuperación de la eliminación de CH_4 .
- Estudio de la velocidad de riego ($130,4$ y $78,3 \text{ mL L}_{\text{relleno}} \text{ d}^{-1}$) en el desempeño del sistema en estado pseudo-estacionario y en la capacidad de recuperación de la eliminación de CH_4 .
- Estudio de la presencia o ausencia de aire durante la etapa de hambruna en el desempeño del sistema en estado pseudo-estacionario y en la capacidad de recuperación de la eliminación de CH_4 .

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medio mineral, gases, reactivos e inóculo

Tres diferentes medios nutritivos fueron utilizados para cultivar metanótrofos en el presente trabajo: medio mineral salino (MMS) sintético, centrado (sobrenadante obtenido de la centrifugación de los lodos resultantes de la digestión anaerobia de lodos mixtos realizada en las estaciones de depuración de aguas residuales – EDAR) y centrado diluido 1/3.

El medio mineral salino (MMS) utilizado en el ensayo *batch* es una modificación del medio Brunner usado anteriormente para el enriquecimiento de metanótrofos (López *et al.*, 2014). La descripción detallada de la composición del MMS se indica en las Tablas 3, 4 y 5. A mayores, al MMS se le adicionaron 0,635 mL L⁻¹ de una solución stock de CuSO₄ hasta ajustar la concentración de Cu²⁺ a 10 µM con el fin de evitar limitaciones de cobre sobre la actividad metanotrófica.

Tabla 3. Composición del MMS utilizado en la experimentación.

Componente	Concentración (g/L)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6,15
KH ₂ PO ₄	1,52
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Solución SL-4	10 (mL/L)

Tabla 4. Composición de la solución SL-4 empleada en la preparación del MMS.

Componente	Concentración (g/L)
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,64
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
Solución SL-6	100

Tabla 5. Composición de la solución SL-6 de elementos traza.

Componente	Concentración (g/L)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂	0,11
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,10
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,03
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,02
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01

El centrado fue utilizado como medio de aporte de nutrientes de bajo coste en el ensayo en *batch*, siendo recibido mensualmente de la EDAR de Valladolid y conservándose a 4°C hasta su uso. Este centrado se caracteriza por contener una baja fracción de materia orgánica biodegradable y una alta concentración de nutrientes, según se puede observar en la Tabla 6 (Posada *et al.*, 2015). Dada la alta concentración de NH₄⁺ presente en el centrado, una dilución 1/3 con agua destilada de este medio nutritivo fue también utilizada tanto para el ensayo en *batch* como para el posterior enriquecimiento de metanótrofos y riego de biofiltros. El centrado diluido 1/3, cuyas características se pueden observar en la Tabla 7, fue suplementado con SO₄²⁻ (en forma de MgSO₄·7H₂O) para alcanzar una concentración final de 150 mg SO₄²⁻ L⁻¹ y prevenir una posible limitación biológica por ausencia de azufre en el medio nutritivo.

Tabla 6. Características físico-químicas del centrado puro (mg L⁻¹).

TN	TOC	IC	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	S-SO ₄ ²⁻	P-PO ₄ ³⁻
653,1	101,2	621,9	646,6	5,1	-	2,9	56,5
± 42,1	± 28,3	± 38,7	± 24,7	± 0,4		± 0,5	± 13,8

Tabla 7. Características físico-químicas del centrado diluido 1/3 (mg L⁻¹).

TN	TOC	IC	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	S-SO ₄ ²⁻	P-PO ₄ ³⁻
197,4	16,3	156,4	181,5	0,2	6,0	52,4	15,6
± 14,6	± 12,3	± 27,7	± 19,8	± 0,6	± 5,7	± 2,0	± 5,0

El CH₄ fue adquirido de Abelló-Linde, S.A. (Barcelona, España) con una pureza de al menos el 99,5 %. Todos los químicos y reactivos fueron adquiridos a Panreac® (Barcelona, España) con una pureza de al menos el 99 %.

El inóculo utilizado en el ensayo en *batch* fue un consorcio metanotrófico mixto compuesto principalmente por las bacterias oxidadoras de metano (MOBs)

Methylobacterium agile, *Methylobacter* sp., *Methylosarcina lacus* y *Methylocystis parvus* (López et al., 2014).

3.2. Ensayo en *batch*

Los ensayos en *batch* se realizaron en botellas de 1,2 L con 400 mL de medio de cultivo, bien MMS, centrado puro o centrado diluido 1/3 (Figura 6). Las botellas fueron inoculadas al 1 % (v/v) y cerradas con tapones de caucho y rosca, quedando 800 mL de espacio de cabeza con una concentración inicial de CH₄ aproximada del 4 % (v/v) ($28,8 \pm 0,9$ g CH₄ m⁻³), que será la concentración de trabajo posterior en los BFs. Las botellas se colocaron en una placa de agitación magnética que permite mantener el líquido en constante movimiento con un régimen de giro de 200 rpm, y fueron incubadas a una temperatura constante de 25°C en un laboratorio climatizado. Se realizaron medidas de la composición de la fase gas de las botellas mediante cromatografía de gases (GC-TCD) a intervalos regulares para controlar la evolución de la concentración de CH₄, CO₂ y O₂.

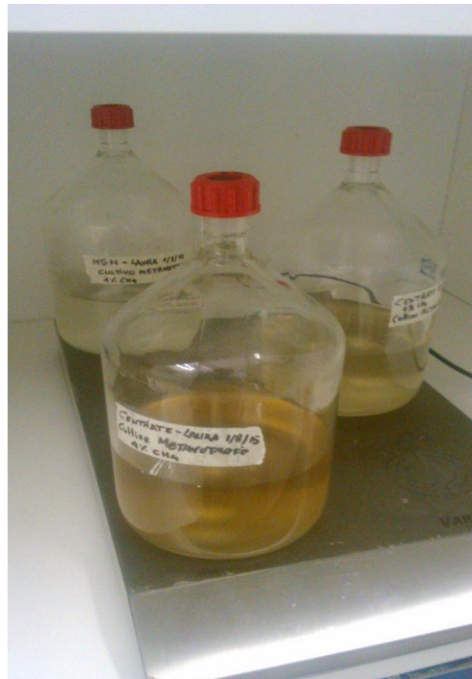


Figura 6. Botellas en crecimiento durante el ensayo en *batch*.

3.3. Enriquecimiento de metanótrofos

Para el enriquecimiento de metanótrofos se utilizó un reactor de tanque agitado (RTA) a escala de laboratorio de 10 L con alimentación continua de CH_4 diluido en aire durante un periodo de 30 días (Figura 7). El inóculo utilizado fue lodo activado aerobio fresco procedente de la EDAR de Valladolid. Se introdujeron en el RTA 7,5 L de anillos Micro Kaldnes K1 (Evolution Aqua Ltd., Reino Unido) para evitar la adherencia de la biomasa a las paredes y promover la adherencia de la biomasa en dicho medio de empaque, que se utilizó posteriormente para el relleno de los BFs. Se añadieron 6 L de centrado diluido 1/3 inoculados con lodos activados al 10% (v/v). La mezcla se dejó en agitación magnética constante de 200 rpm y la temperatura se mantuvo a 25°C en una habitación climatizada. La tasa de renovación del centrado diluido 1/3 se fijó en 2 L cada 3 días (tasa de dilución, $D = 0,1 \text{ d}^{-1}$).

La corriente gaseosa se obtuvo mezclando aire procedente de compresor, y que se humidificaba previo paso a reactor mediante paso a través de una columna de agua (9 L), con una corriente de CH_4 puro, teniendo la mezcla final un $4,7 \pm 0,2 \%$ (v/v) de CH_4 ($30,9 \pm 1,1 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3}$). El caudal de alimentación introducido al tanque por un difusor cerámico poroso situado en el fondo del mismo (10 μm diámetro de poro) fue de 420 mL min^{-1} , dando lugar a un tiempo de residencia del gas (GRT) de 19,5 min y una carga de alimentación de CH_4 (CA) de $92,3 \pm 3,2 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. La corriente gaseosa de salida del reactor fue conducida a un extractor comunicado con el exterior. Se realizaron medidas periódicas de la composición de la fase gas a la entrada y salida del sistema mediante cromatografía de gases (GC-TCD) con el fin de controlar la evolución de la concentración de CH_4 , CO_2 y O_2 . Una vez finalizado el periodo de enriquecimiento, se centrifugó el cultivo metanotrófico y se resuspendió la biomasa en 450 mL de centrado diluido 1/3 fresco. Para la inoculación posterior de los BFs se utilizaron 150 mL de este caldo junto con 2,3 L de anillos Kaldnes impregnados de cultivo por cada unidad.



Figura 7. Tanque agitado utilizado en el enriquecimiento de metanótrofos.

3.4. Configuración del sistema experimental con BFs

El diagrama del sistema experimental utilizado en el presente trabajo se representa en la Figura 8, estando formado por:

- Un manorreductor que regula la presión de la corriente de aire exterior, proporcionada por un compresor de uso común en las instalaciones del laboratorio.
- Una columna de humidificación de PVC (Plasthermar, España) que contiene un baño de agua a través del que se hizo pasar la corriente de aire para asegurarse de que ésta tuviera una humedad suficiente para el crecimiento de los metanótrofos.
- Un manorreductor (GmbH & Co. KG, Alemania) que controla la presión de la bombona de CH₄ del laboratorio.
- Un controlador de flujo (Aalborg™, USA) para regular la corriente de CH₄ puro.
- Una cámara de mezcla de 2 L para producir una mezcla homogénea de aire con el CH₄ puro.
- Un termohigrómetro digital Testo 605-H1 (Testo AG, Alemania) que permitía medir la humedad y la temperatura de la corriente gaseosa de alimentación.
- Tres rotámetros conectados cada uno a una torre para controlar el caudal de la corriente de gas que entraba a cada reactor (Aalborg™, USA).
- Tres biofiltros (BFs 1-3) a escala de laboratorio consistentes en una columna cilíndrica de PVC de una altura de 45 cm y un diámetro interior de 8 cm (Plasthermar, España). Cada biofiltro se rellenó con los 2,3 L de anillos Kaldnes

previamente mencionados. Las unidades poseían una conexión en la parte alta de la misma por donde se introdujo la corriente de gas y una conexión en la parte baja por donde salía el gas una vez que atravesaba el relleno. Además, en la parte superior y en la inferior existía un orificio por el que se suministraba el centrado diluido (superior) y se recogía el lixiviado (inferior), ambos permaneciendo cerrados salvo para la introducción y retirada de líquido.

- Seis tomamuestras de gas (Fisher, Reino Unido), dos por unidad, situados uno en la conducción de entrada y otro en la de salida, que permitieron tomar las muestras de gas para su posterior análisis.

- Válvulas de cierre colocadas en las conducciones de alimentación de las dos unidades que son sometidas a alimentación y hambruna de forma alterna (BFs 2 y 3) y que permitieron controlar la condición de operación.

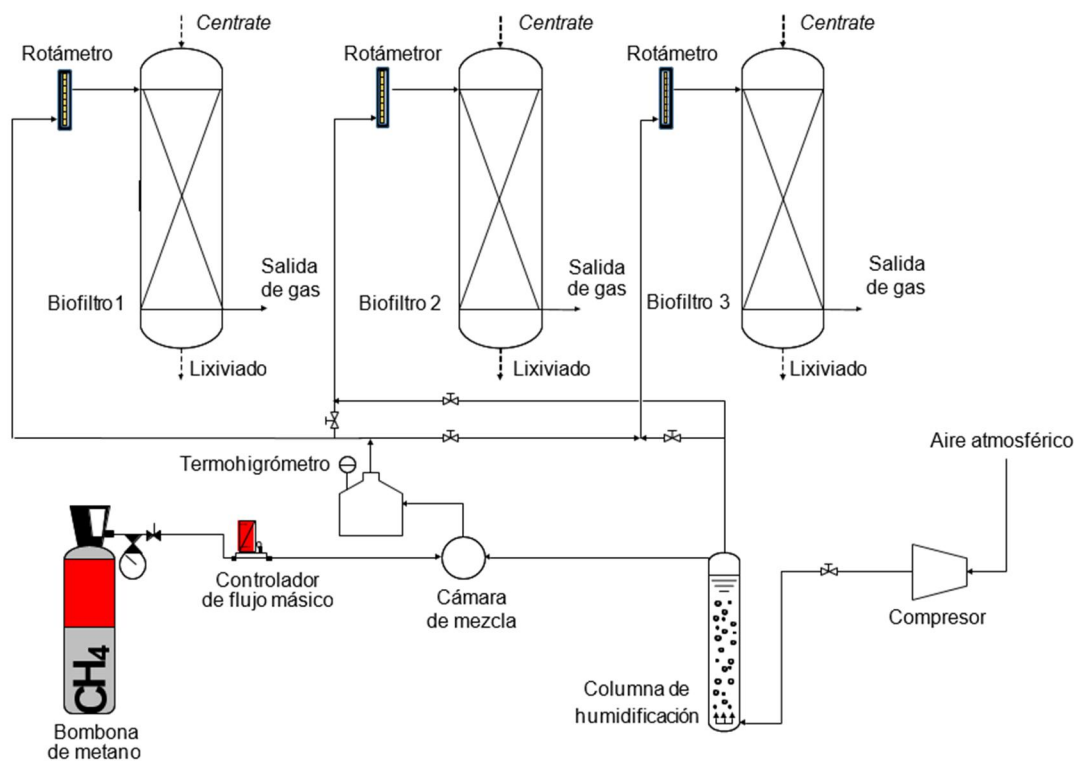


Figura 8. Diagrama del sistema experimental empleado en el laboratorio.

3.5. Modo de operación

Inicialmente los biofiltros fueron operados en condiciones abióticas durante 3 días para descartar la posible fotólisis o adsorción del CH_4 en el sistema experimental. Después de la inoculación, los lixiviados que contenían microorganismos no adheridos se realimentaron al menos dos veces al día a través de los biofiltros para asegurar una fijación de biomasa adecuada durante las dos primeras semanas.

La corriente gaseosa de alimentación al biofiltro control (BF1) y al que operaba bajo condiciones de alimentación (BF2 o BF3 según corresponda en el ciclo) se mantuvo en $8,4 \text{ L h}^{-1}$. La CA aplicada a las unidades alimentadas con CH_4 fue de $108,7 \pm 4,5 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, resultando una corriente de gas de alimentación con una concentración de CH_4 de $31,0 \pm 1,3 \text{ g m}^{-3}$ ($4,7 \pm 0,2 \text{ \% v/v}$), una humedad de $96,8 \pm 3,2 \text{ \%}$ y un GRT de $17,1 \text{ min}$. El biofiltro en condiciones de hambruna (BF3 o BF2, según corresponda en cada ciclo) se alimentó con aire a $8,4 \text{ L h}^{-1}$ o se cerró completamente dependiendo de la etapa de operación.

Los BFs 2 y 3 fueron sometidos a ciclos de alimentación/hambruna alternos mediante cambios en la corriente gaseosa de alimentación. Cada ciclo se compuso de un periodo de hambruna, es decir, de privación de la alimentación de CH_4 , y un periodo de alimentación con el contaminante, siendo alternados entre una unidad y otra. Antes de alternar entre fase de alimentación/hambruna, la fase gaseosa de la unidad previamente en periodo de hambruna se purgó con aire a 30 L h^{-1} durante $0,5 \text{ h}$ para evitar una sobreestimación en la producción de CO_2 durante las primeras horas del periodo de alimentación consecuente.

El experimento se llevó a cabo en 4 diferentes etapas operacionales con el fin de evaluar el rendimiento y la robustez de las estrategias de alimentación/hambruna aplicadas durante la biofiltración de CH_4 :

- Etapa I: Esta etapa duró 30 días y en ella se alimentó con CH_4 las tres unidades de forma continua. La tasa de riego (cantidad de *centrado* suministrada por volumen del relleno por día) fue de $130,4 \text{ mL L}_{\text{relleno}} \text{ d}^{-1}$ para cada una de las unidades.

- Etapa II: Esta etapa se extendió desde el día 31 hasta el 103 de operación. Durante este periodo de tiempo se alimentó el BF1 de forma continua y los BFs 2 y 3 se sometieron a ciclos de 3 días de alimentación/hambruna (3d:3d) de forma alterna. Durante el periodo de hambruna, la torre correspondiente fue alimentada con corriente de aire. La tasa de riego siguió siendo de $130,4 \text{ mL L}_{\text{relleno}} \text{ d}^{-1}$.

- Etapa III: Entre los días 109 y 142 (previo ensayo de transferencia de masa de 6 días), se continuó sometiendo a los BFs 2 y 3 a ciclos de alimentación/hambruna con un incremento en la duración de los mismos a 5 días (5d:5d). La unidad en periodo de hambruna se mantuvo con alimentación de corriente de aire. La tasa de riego se redujo a $78,3 \text{ mL L}_{\text{relleno}} \text{ d}^{-1}$.

- Etapa IV: Esta última etapa se extendió entre los días 173 y 243. Se mantuvieron los periodos de alimentación/hambruna de 5 días (5d:5d) pero la unidad en hambruna careció de alimentación alguna de gas (cierre por válvula) y de riego. La tasa de riego en los BFs en operación se mantuvo en $78,3 \text{ mL L}_{\text{relleno}} \text{ d}^{-1}$.

Se tomaron muestras de gas periódicamente en las corrientes de entrada y de salida de cada BF para controlar la evolución de las concentraciones de CH₄, O₂ y CO₂ mediante cromatografía de gases (GC-TCD). Se tomaron muestras líquidas del lixiviado y del centrado diluido utilizado para el riego una vez por semana para la determinación de las concentraciones de nitrógeno total (TN), de amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻) y fosfato (PO₄³⁻), así como para medir el pH de los líquidos. La caída de presión en los BFs se midió periódicamente coincidiendo con los momentos de toma de muestra de gases. Al final del experimento, se extrajo la biomasa de cada biofiltro y se midió la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).

3.6. Métodos analíticos

Las concentraciones de CH₄, O₂ y CO₂ en las corrientes gaseosas de entrada y de salida de los BFs se determinaron en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, E.E.UU.) equipado con columnas CP-Molsieve 5A (15 m x 0,53 μm x 15 μm) y un CP-PoraBOND Q (25 m x 0,53 μm x 10 μm). Las temperaturas del horno, inyector y del detector se mantuvieron a 45°C, 150°C y 200°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a 13,7 ml min⁻¹, siendo el tiempo del análisis de 5 min (López *et al.*, 2014). La caída de presión en las torres se midió empleando como manómetro un tubo en U conectado a la entrada y a la salida de gases de cada torre, siendo el fluido manométrico agua. La temperatura y la humedad se determinaron mediante un termohigrómetro digital Testo 605-H1 (Testo AG, Alemania). El pH se midió utilizando un electrodo de membrana de vidrio modelo PH BASIC 20 (Crison, Spain). Las concentraciones de iones NO₃⁻, NO₂⁻ y PO₄³⁻ presentes en el lixiviado de los biofiltros y en el centrado diluido fueron determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de conductividad iónica (HPLC-IC) después de ser filtradas las muestras (1 mL) a través de filtros de nylon de 0,22 μm. El equipo utilizado para este análisis fue un 515 HPLC acoplado con un detector de conductividad Waters 432 y equipado con una columna IC-PAK Anion HC (4,6 x150 mm) y una pre-columna IC-PAK (Waters, E.E.U.U.) (López *et al.*, 2016). La concentración de NH₄⁺ de las muestras de lixiviados y centrado diluido previamente filtradas se determinó mediante un electrodo de amonio Orion Dual Star (Thermo Scientific, Países Bajos). El análisis de TN en las muestras líquidas se llevó a cabo mediante un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, Japón) equipado con un módulo de TNM-1 de quimioluminiscencia. Los análisis de SST y SSV se realizaron de acuerdo al método estándar (APHA, 2005), lo que conlleva el filtrado a vacío de las muestras sobre un filtro previamente preparado y pesado, quedando posteriormente éste en estufa a 100°C durante aproximadamente 24 h. Posteriormente, los filtros se secaron y pesaron para determinar los SST, y se

introdujeron en la mufla durante 2 h a una temperatura de 550°C, para la determinación de los SSV.

3.7. Cálculos

Para evaluar el desempeño del proceso en las distintas unidades, se calculó la capacidad de eliminación de CH₄ (CE), la tasa de producción de CO₂ (PCO₂), la mineralización de CH₄ (RCO₂) y el rendimiento de producción de CO₂ (YCO₂) en la fase gaseosa, así como la caída de presión, la eficiencia de eliminación (EE) del TN, N-NH₄⁺ y P-PO₄³⁻ y la concentración de NO₂⁻ y NO₃⁻ en el lixiviado a lo largo de las diferentes etapas de operación. Los cálculos realizados se detallan a continuación para cada uno de los parámetros:

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

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

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

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

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

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

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

Donde $[i]_e$ y $[i]_s$ representan la concentración del contaminante i en g m⁻³ a la entrada y a la salida, respectivamente; donde i puede ser CH₄, CO₂, TN, N-NH₄⁺ o P-PO₄³⁻. Q es el caudal de emisión gaseosa total en m³ h⁻¹ y V el volumen de trabajo en m³. α es el cociente entre el peso molecular del CO₂ y el peso molecular del CH₄ (2,75) y representa la cantidad máxima de CO₂ que se puede producir por oxidación de todo el CH₄, asumiendo que no haya producción de biomasa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección del medio de nutrientes

La Figura 9 muestra la evolución de la concentración de CH₄ en los cultivos metanotróficos crecidos bajo diferente solución nutritiva. El consorcio metanotrófico inoculado en centrado puro apenas mostró crecimiento durante el ensayo, manteniéndose la concentración de CH₄ en torno a 26,7 ± 2,0 g m⁻³ a lo largo del ensayo. Los cultivos alimentados con centrado diluido 1/3 y MSM fueron, no obstante, capaces de degradar la totalidad del contaminante gaseoso en 9 y 4 días, respectivamente (Figura 9).

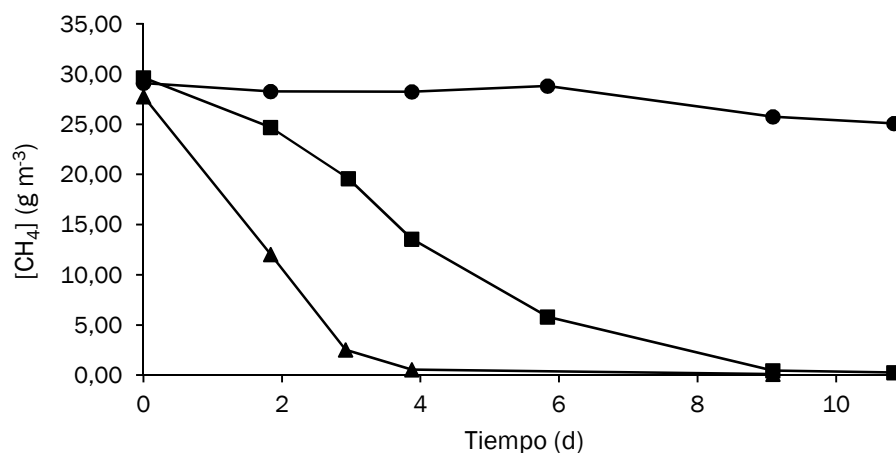


Figura 9. Evolución temporal de la concentración de CH₄ en las botellas en *batch* cultivadas en centrado (●), centrado diluido 1/3 (■) y MSM (▲).

Estos resultados son acordes con los obtenidos previamente por Dunfield y Knowles (1995), quienes sugirieron una preferencia de los metanótrofos para asimilar el nitrógeno en forma de NO₃⁻ frente al NH₄⁺ o el NO₂⁻. Por otro lado, la concentración de NH₄⁺ presente en el centrado puro (>600 mg L⁻¹) es significativamente superior a la indicada anteriormente como inhibitoria para la oxidación de CH₄ (>360 mg L⁻¹), mientras que la concentración de NH₄⁺ presente en el centrado 1/3 (~200 mg L⁻¹) se encuentra en el rango de valores tolerados por estos microorganismos (Bender y Conrad, 1995; Bosse *et al.*, 1993).

Estos resultados demuestran por tanto la viabilidad del centrado diluido 1/3 para su uso como líquido de aporte de nutrientes durante el cultivo de metanótrofos. En consecuencia, se decidió utilizarlo como solución de alimentación tanto en el proceso de enriquecimiento metanotrófico en tanque agitado como en la operación posterior de los BFs. El uso de aguas residuales como solución nutritiva para eliminar las emisiones de metano en EDAR conllevaría menores costes de operación y una menor carga de nutrientes a

tratar en la línea de aguas (puesto que los centrado normalmente son recirculados a cabeza de planta para su tratamiento en la línea de aguas)

4.2. Enriquecimiento en reactor de tanque agitado

El periodo de enriquecimiento se caracterizó por valores de CE y PCO_2 progresivamente en aumento, llegándose al final del periodo a valores máximos de CE y PCO_2 de $8,8 \pm 0,9$ y $11,0 \pm 0,9$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$, respectivamente (Figura 10). Estos resultados son acordes con los observados previamente en arranques tanto de BFs como de BFPs orientados a la eliminación de CH_4 (Lebrero *et al.*, 2015; Estrada *et al.*, 2014; Nikiema y Heitz., 2007). Los bajos valores de CE y PCO_2 aquí observados se atribuyen a la limitación biológica propiamente impuesta por la baja concentración de biomasa metanotrófica durante el inicio de la operación (Nikiema y Heitz, 2007).

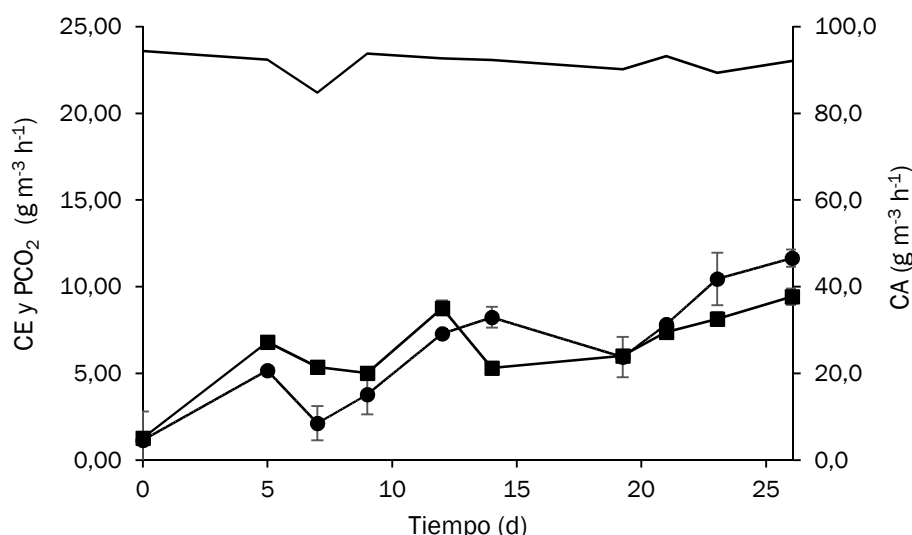


Figura 10. Evolución temporal de la CA (línea continua), CE (■) y PCO_2 (●) en el reactor de tanque agitado durante la etapa de enriquecimiento.

4.3. Operación de los BFs

4.3.1. Desempeño de los BFs durante el tratamiento de CH_4

En la temprana etapa I, se observaron valores de CE inestables en torno a $5,9 \pm 2,4$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$ en los BFs, principalmente en el 2 y 3 (Figura 11), posiblemente debido a la distribución poco homogénea y a la fijación débil de la biomasa inoculada a lo largo del lecho empacado. El registro de caídas de presión inicialmente altas (posteriormente discutido en la sección 4.2.2) apoyaría la hipótesis anteriormente mencionada. La PCO_2 se mantuvo en torno a $9,7 \pm 2,9$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$ en las tres unidades, obteniéndose por tanto valores de RCO_2 entre

24,5 y 93,1 % que corresponden a valores de Y_{CO_2} que oscilan entre 0,7 y 2,6 $g\ CO_2\ g\ CH_4^{-1}$. En relación a esto, valores relativamente bajos de RCO_2 y Y_{CO_2} han sido observados previamente durante el arranque de BFPs y se atribuyen a la formación preferente de biomasa mediante anabolismo (Lebrero *et al.*, 2016; Estrada *et al.*, 2014).

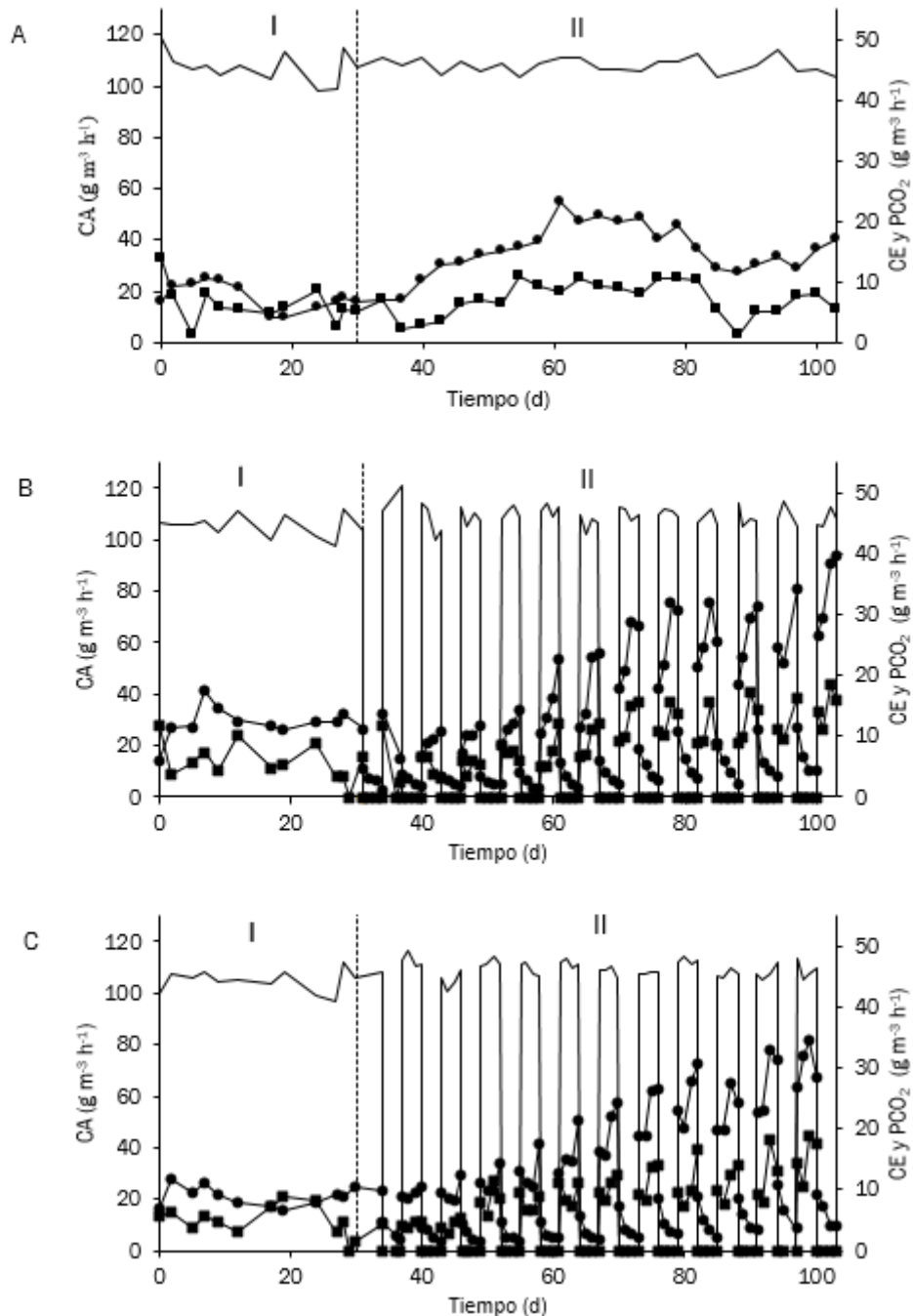


Figura 11. Evolución temporal de la CA (línea continua), CE (■) y PCO_2 (●) en BF1 (A), BF2 (B) y BF3 (C) durante las etapas de operación I y II.

Al comienzo de la etapa II, se observó un progresivo aumento de la CE y la PCO₂ en el BF1 hasta valores de $9,7 \pm 1,1$ y $18,9 \pm 2,5$ g m⁻³ h⁻¹, respectivamente (RCO₂ de $72,1 \pm 16,3$ %) (Fig. 11A). El sistema se estabilizó en valores de CE y PCO₂ de $6,3 \pm 1,4$ y $13,4 \pm 1,4$ g m⁻³ h⁻¹ (RCO₂ de $79,7 \pm 16,8$ %) a partir del día 85 de operación en adelante. En esta segunda etapa la implementación de las estrategias de alimentación/hambruna en los BFs 2 y 3 permitió por otro lado un aumento gradual en la biodegradación de CH₄ hasta alcanzar un estado pseudo-estacionario a partir del día 70 de experimentación (Figura 11B, C), con valores de CE en los periodos de alimentación que oscilaron desde $7,3$ g m⁻³ h⁻¹ al inicio hasta los $18,6$ g m⁻³ h⁻¹ al final de la etapa. Consecuentemente, la PCO₂ también experimentó un aumento progresivo durante los periodos de alimentación desde $17,8$ a $39,6$ g m⁻³ h⁻¹, siendo así los valores de RCO₂ de $79,4 \pm 12,9$ % para el BF2 y $80,8 \pm 15,9$ % para el BF3. Basándonos en estos resultados empíricos, se demuestra que los periodos de inanición a corto plazo (3 días), que podrían representar paradas de fin de semana en instalaciones industriales, no perjudicarían el desempeño de los biofiltros diseñados para el tratamiento de CH₄. Es más, los resultados mostraron que estas estrategias podrían incluso acelerar y mejorar la capacidad de eliminación del contaminante en las primeras etapas de operación, tal como se indicó con anterioridad para biotecnologías orientada a la reducción de tolueno (Álvarez-Hornos *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2005). Aunque las comunidades microbianas de los BFs 2 y 3 mostraron la máxima actividad metanotrófica al final de los ciclos de alimentación (48–72 h), es importante destacar que dichas unidades fueron capaces de recuperar hasta el 70 % de la capacidad de degradación de CH₄ en sólo 1,5 horas tras reanudarse la alimentación de la fuente de carbono y energía. Esta rápida recuperación de la actividad de los BFs indicó un enriquecimiento de las comunidades de MOB aclimatadas a ciclos secuenciales de alimentación y hambruna. De acuerdo a lo descrito en bibliografía, los tiempos de recuperación observados en el presente trabajo son más cortos que los previamente obtenidos para otras biotecnologías sometidas a similares periodos de inanición de contaminante (Cheng *et al.*, 2016; Ferdowsi *et al.*, 2016; Cox y Deshusses, 2002).

Durante la etapa III la reducción de la tasa de irrigación dio como resultado una mejora en el rendimiento de la biodegradación de CH₄ en el BF1, con valores estables a partir del día 130 de CE y PCO₂ de $11,7 \pm 1,7$ y $26,0 \pm 1,0$ g m⁻³ h⁻¹, respectivamente (RCO₂ de $82,6 \pm 11,3$ %) (Figura 12A). En lo referente a las unidades alternas, se obtuvieron valores de CE y PCO₂ en los rangos $5,8 - 20,1$ y $18,1 - 49,2$ g m⁻³ h⁻¹, respectivamente (Figura 12B, C). Los valores medios de RCO₂ durante esta etapa fueron de $87,1 \pm 23,6$ % para BF2 y $91,4 \pm 27,9$ % para BF3, siendo los valores máximos registrados ($145,7$ y $152,6$ %, respectivamente) un 15-20 % superiores al RCO₂ máximo registrado en BF1 ($132,4$ %), probablemente debido a la mayor actividad del metabolismo

endógeno durante los periodos de hambruna. Comparando los resultados de esta etapa con la anterior, las diferencias observadas en la CE y PCO_2 en las unidades de alimentación alterna no son significativas, pese al aumento en 2 días de los periodos de alimentación/hambruna. Hay que señalar que la máxima actividad microbiana se dio a las 48 horas tras reanudarse la alimentación de la fuente de C, reduciéndose así significativamente el tiempo empleado con respecto a la anterior etapa (Figura 12B, C).

En la última etapa del experimento, etapa IV, el BF1 permaneció estable con valores medios de CE y PCO_2 de $11,1 \pm 2,1$ y $27,1 \pm 3,4$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$, respectivamente, con un valor medio de RCO_2 de $91,1 \pm 17,9$ %, correspondiente a un YCO_2 de $2,5 \pm 0,5$ $g\ CO_2\ g^{-1}\ CH_4$ (Figura 12A). En cuanto a las unidades alternas, los valores de CE y PCO_2 que se alcanzaron en estado pseudo-estacionario no difirieron significativamente con respecto a los valores observados en etapas anteriores, variando la CE entre $6,1$ y $23,9$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$ y la PCO_2 entre $17,4$ y $52,0$ $g\ m^{-3}\ h^{-1}$, con valores promedio de RCO_2 de $92,5 \pm 27,3$ y $84,5 \pm 26,3$ % para BF2 y BF3, respectivamente (valores máximos de RCO_2 de $191,0$ y $154,9$ %, respectivamente) (Figura 12B, C). Aunque en esta etapa no hubo aporte de aire durante el periodo de hambruna, el desempeño del proceso durante la misma no difiere significativamente del registrado en las etapas II y III. No obstante, sí se aprecian diferencias en la producción de CO_2 y, por tanto, en los valores máximos de RCO_2 de las unidades alternas, siendo un 45 y un 20 % más altos en BF2 y BF3, respectivamente, con respecto a la unidad control. Esto puede deberse a que durante el periodo de hambruna en el que los microorganismos carecieron de aire y nutrientes, el metabolismo endógeno se vio fuertemente estimulado y los consorcios metanotróficos de estas unidades utilizaron productos de lisis celular, exopolisacáridos y/o productos de la biodegradación del CH_4 (Dorado *et al.*, 2012; Cox y Dehusses, 2002). Es importante señalar que el tiempo necesario para alcanzar la máxima actividad de las MOB en muchos de los ciclos de alimentación en esta última etapa fue de 1,5 horas, lo que puede deberse al enriquecimiento gradual de una comunidad microbiana adaptada a esta estrategia de operación. Así, Cox y Dehusses (2002) encontraron que eran necesarias al menos 10 horas de reacondicionamiento de la biomasa para alcanzar de nuevo la actividad máxima en un BF enfocado a la degradación de tolueno después de un periodo de hambruna similar al aquí aplicado (5 días sin fuente de carbono, aire y riego), debido posiblemente a la falta de adaptación de la comunidad microbiana a interrupciones en la alimentación.

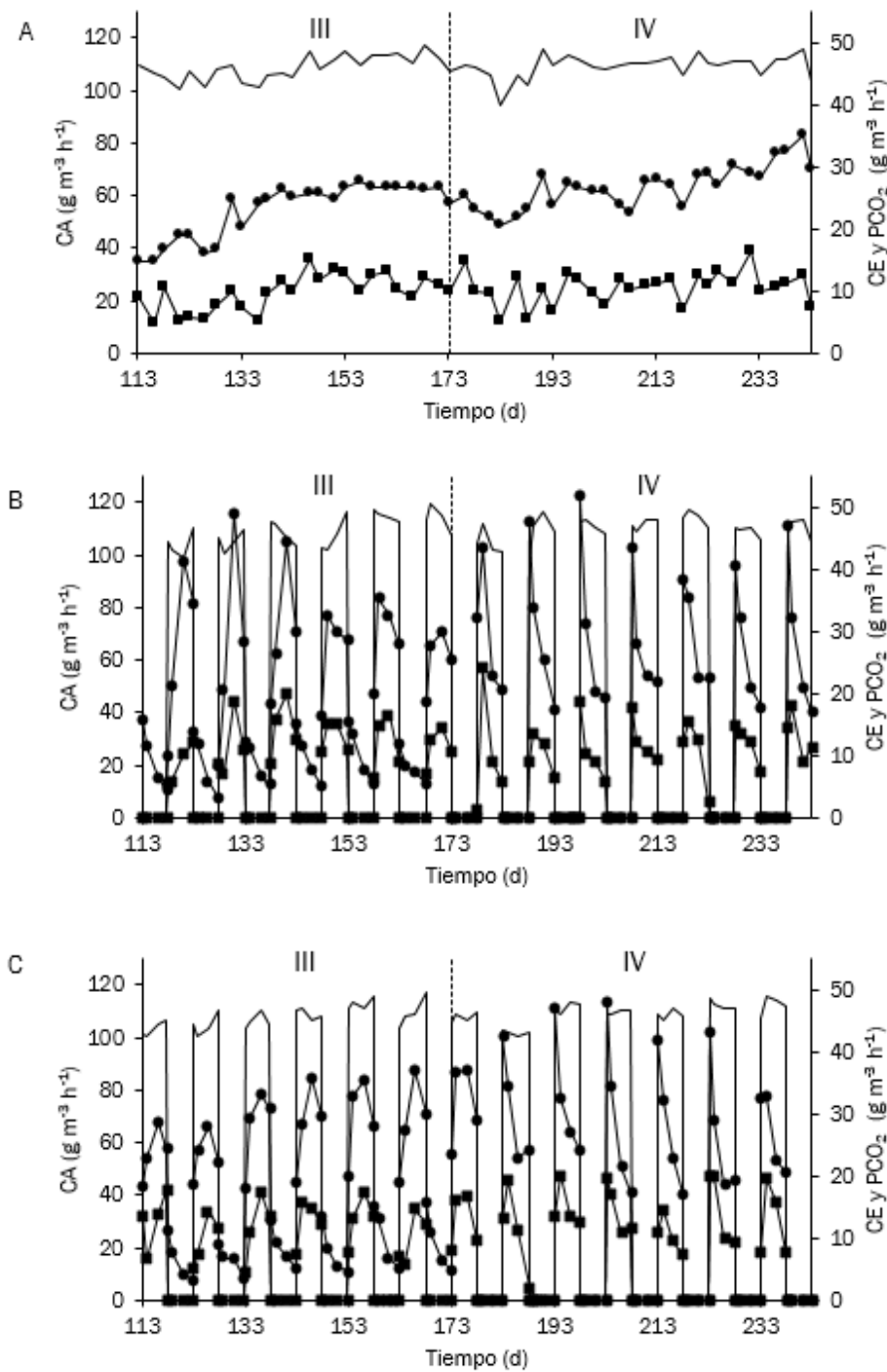


Figura 12. Evolución temporal de la CA (línea continua), CE (■) y PCO_2 (●) en BF1 (A), BF2 (B) y BF3(C) durante las etapas de operación III y IV.

4.3.2. Evolución de la caída de presión

Durante la etapa I se observaron altas caídas de presión, alcanzándose valores máximos de 15,0, 72,0 y 90,0 Pa m⁻¹ en los BFs 1, 2 y 3, respectivamente (Figura 13), muy posiblemente debidas a la distribución heterogénea de la biomasa a lo largo del relleno, como ya se discutió anteriormente. La caída de presión registrada durante la etapa II en la unidad control ($6,8 \pm 1,9$ Pa m⁻¹) fue ligeramente superior a la observada en las unidades alternas ($5,1 \pm 2,8$ y $3,9 \pm 2,7$ Pa m⁻¹ en los BFs 2 y 3, respectivamente). En la etapa III la caída de presión de la unidad control fue bastante variable y sufrió aumentos significativos hasta valores de 54,0 Pa m⁻¹, mientras que las caídas de presión promedio en las unidades alternas permanecieron en torno a $4,3 \pm 3,4$ Pa m⁻¹ en el BF2 y $5,0 \pm 2,6$ Pa m⁻¹ en el BF3. Las caídas de presión gradualmente diferentes registradas en las tres unidades probablemente se debieron a la diferente concentración de biomasa alcanzada en cada uno de ellos, hecho que pudo constatar visualmente en los empaques (Anexo II). Por último, la caída de presión en las unidades alternas permaneció durante la etapa IV sin cambios significativos respecto a anteriores etapas ($5,5 \pm 4,1$ Pa m⁻¹), llegando a aumentar hasta un valor promedio de $13,7 \pm 4,5$ Pa m⁻¹ en la unidad control.

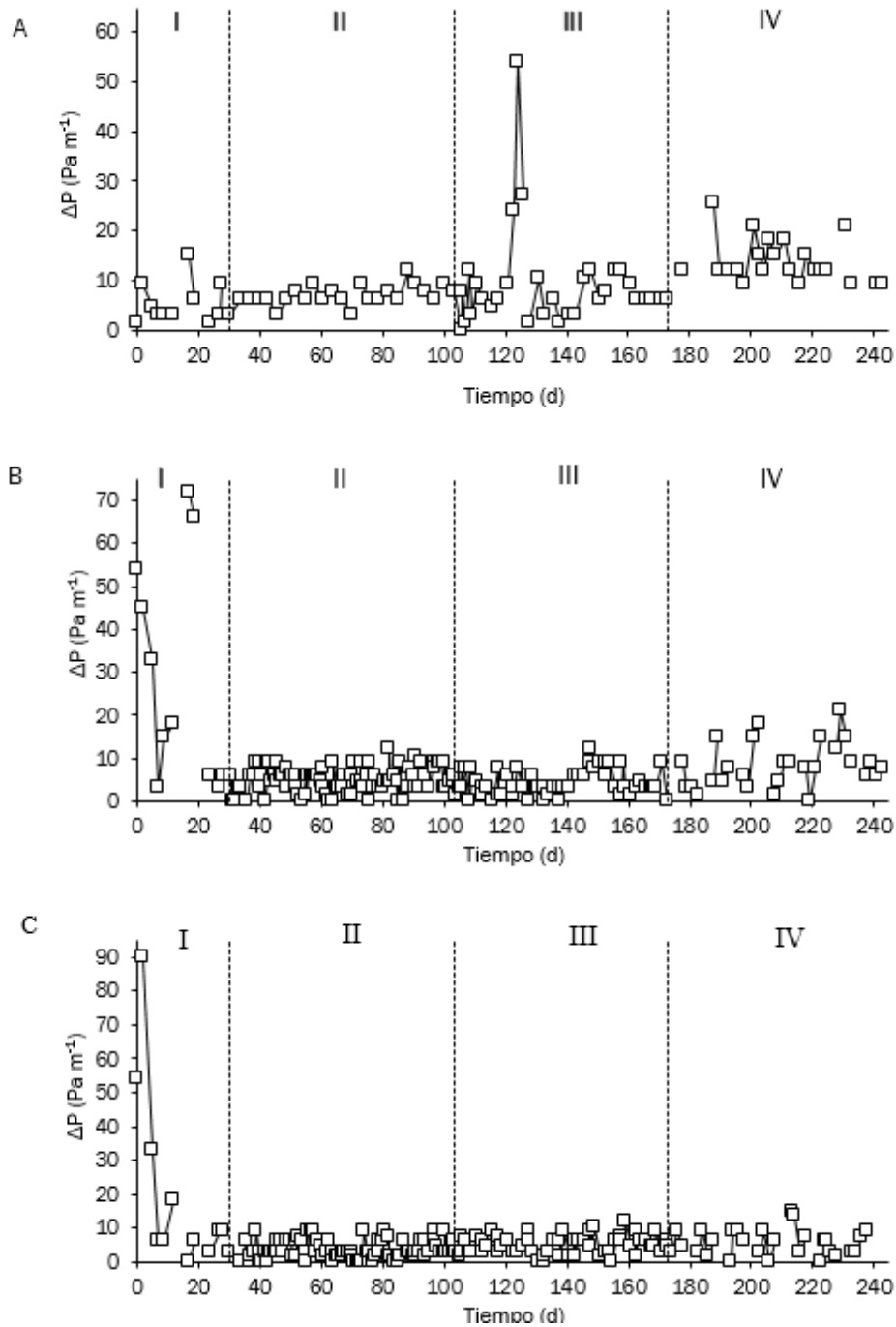


Figura 13. Evolución temporal de la caída de presión en BF1 (A), BF2 (B) y BF3 (C).

Las caídas de presión promedio aquí observadas para los BFs a lo largo de las etapas I-IV fueron similares a las obtenidas en BTF dirigidos a la degradación de CH_4 y en funcionamiento durante tiempos de operación más cortos. Es importante destacar que estos valores estuvieron muy por debajo de la máxima caída de presión tolerable en biofiltración, que se estima en torno a los 980 Pa m^{-1} de acuerdo a criterios económicos (Lebrero *et al.*, 2015; Estrada *et al.*,

2014). Sin embargo, la caída de presión promedio registrada en el BF1 a lo largo de la operación ($9,3 \text{ Pa m}^{-1}$) superó en 140 y 180 % las caídas de presión promedio obtenidas en BF2 y BF3 ($6,7$ y $5,2 \text{ Pa m}^{-1}$, respectivamente). Este hecho puede atribuirse a la mayor cantidad de biomasa acumulada en la unidad control ($8,9 \text{ g L}^{-1}$ al final de los 243 días de operación), en comparación con los valores de $5,1$ y $4,0 \text{ g L}^{-1}$ encontrados en los BF2 y BF3, respectivamente. En este sentido, la acumulación de biomasa, especialmente en las secciones más cercanas a la entrada de alimentación de los BFs, conducen a un cambio en las características del lecho como la reducción del espacio interparticular, causando así la canalización preferencial y un aumento final de la caída de presión (Corsi y Seed, 1995; Swanson y Loehr, 1997; Morgan-Sagastume *et al.*, 2001). Aumentos en la caída de presión durante el proceso se traducen en costes superiores de operación y mantenimiento asociados con el funcionamiento del compresor y el lavado o sustitución del material de relleno, lo cual viene principalmente determinado por el diseño del biofiltro. A escala industrial, el aumento de los costes de inversión derivados del uso de dos unidades alternas operadas bajo regímenes de alimentación/hambruna sería compensado por i) las superiores CEs obtenidas (lo que implicaría poder utilizar menores volúmenes de trabajo de biofiltro), ii) el ahorro de costes de energía y iii) una mayor duración del lecho de empaque utilizado (Estrada *et al.*, 2013; Estrada *et al.*, 2012).

4.3.3. Evolución del proceso de nitrificación

No se observaron diferencias significativas en la actividad de nitrificación entre los BFs durante la etapa I, que se caracterizó por concentraciones medias de N-NO_2^- , N-NO_3^- y N-NH_4^+ en los lixiviados de $38, 7 \pm 8,4$, $15, 6 \pm 4,7$ y $144,1 \pm 8,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (Figuras 14, 15 y 16). Como resultado, valores medios de EE N-NH_4^+ de $20, 5 \pm 5,3 \%$ fueron obtenidos independientemente de la unidad evaluada (Tabla 8). A partir de la etapa I, las concentraciones de N-NO_2^- disminuyeron en todas las unidades hasta valores insignificantes al final de la Etapa IV ($1,1 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$), mientras que las concentraciones de N-NO_3^- alcanzaron valores máximos de $\sim 40 \text{ mg L}^{-1}$ en BF1 durante la Etapa II y en torno a 60 mg L^{-1} en BF2 y BF3 durante la etapa III (Figuras 14 y 15). Sin embargo, la concentración de N-NO_3^- disminuyó inesperadamente al final de la Etapa IV a valores promedio de $1,9 \pm 1,8 \text{ mg L}^{-1}$ independientemente de la unidad evaluada (Figura 15). Estos hallazgos podrían atribuirse a una asimilación más eficiente de N dentro de la biopelícula debido a la creciente concentración de biomasa con el tiempo en todas las unidades.

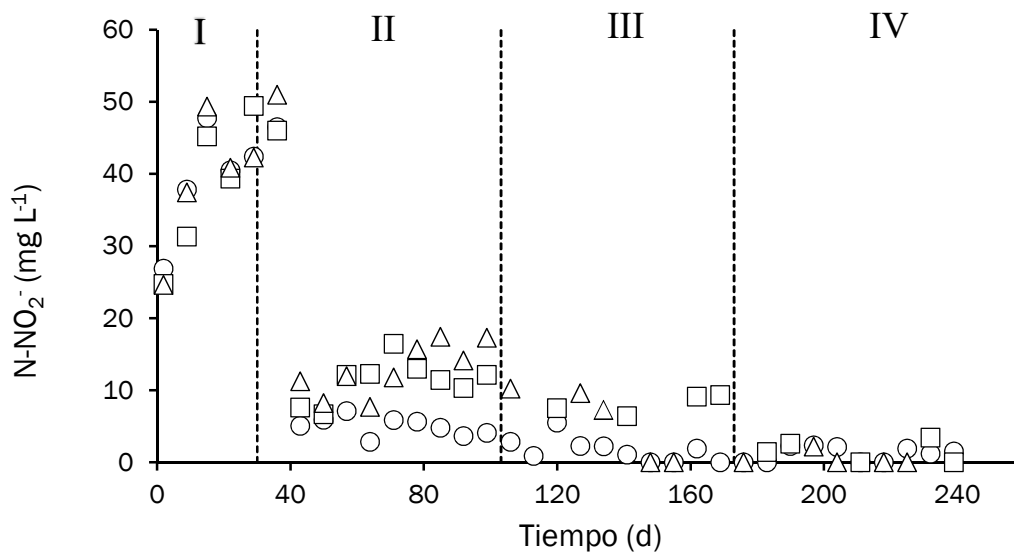


Figura 14. Evolución temporal de la concentración de $N-NO_2^-$ en BF1 (o), BF2 (□) y BF3 (Δ) a lo largo del experimento.

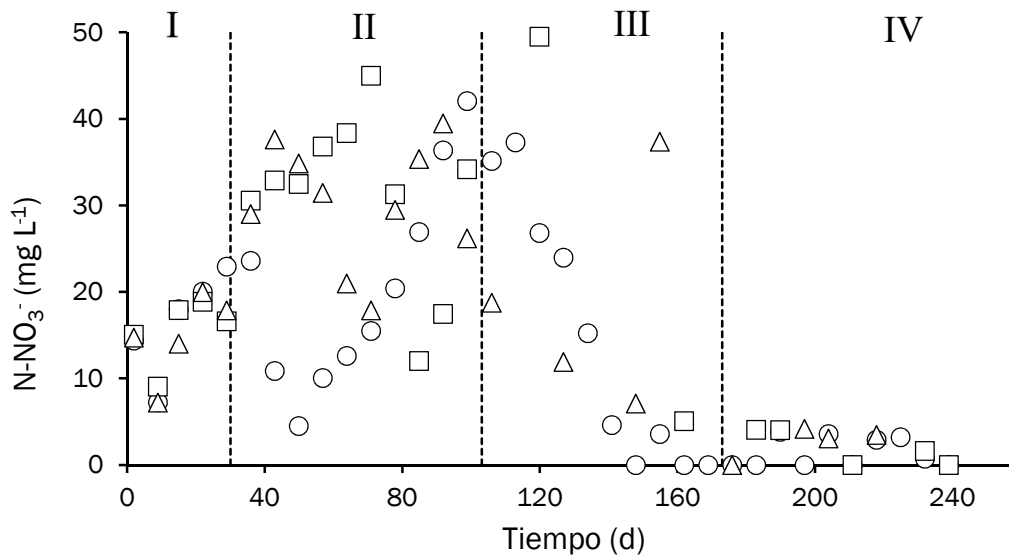


Figura 15. Evolución temporal de la concentración de $N-NO_3^-$ en BF1 (o), BF2 (□) y BF3 (Δ) a lo largo del experimento.

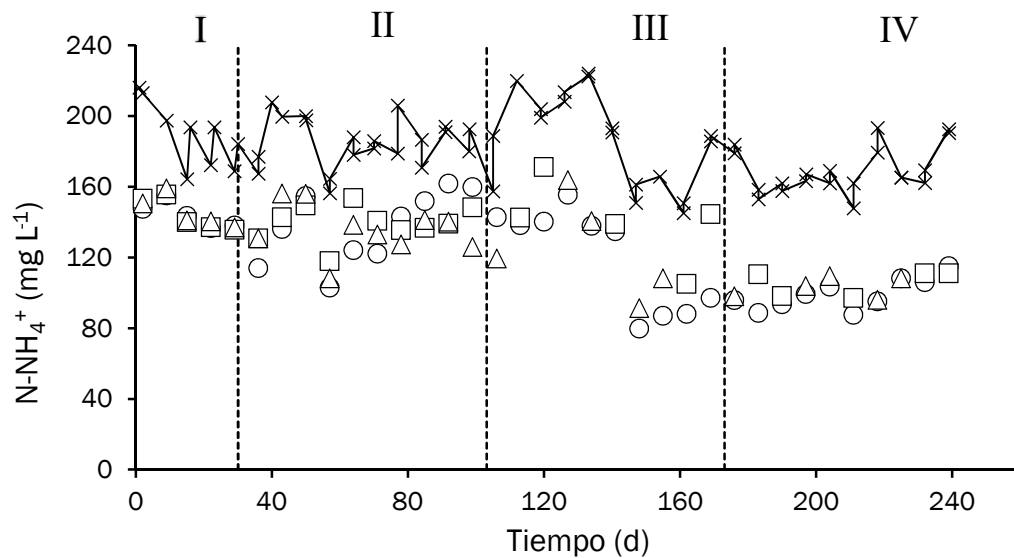


Figura 16. Evolución temporal de la concentración de N-NH_4^+ en la alimentación (línea continua), y en BF1 (o), BF2 (\square) y BF3 (Δ) a lo largo del experimento.

Tabla 8. Concentración media de N-NO_2^- y N-NO_3^- en los lixiviados, y eficacias de eliminación medias de N-NH_4^+ a lo largo de las etapas I-IV del experimento.

Etap	Biofiltro	$[\text{N-NO}_2^-]_{\text{media}}$ (mg L^{-1})	$[\text{N-NO}_3^-]_{\text{media}}$ (mg L^{-1})	EE N-NH_4^+ media (%)
I	1	$39,1 \pm 7,7$	$16,5 \pm 6,1$	$20,7 \pm 6,6$
	2	$38,0 \pm 10,1$	$15,5 \pm 3,9$	$20,7 \pm 4,8$
	3	$38,9 \pm 9,1$	$14,7 \pm 4,9$	$20,0 \pm 5,6$
II	1	$8,6 \pm 12,6$	$21,6 \pm 12,3$	$23,9 \pm 9,9$
	2	$14,8 \pm 11,3$	$31,1 \pm 9,7$	$23,9 \pm 3,7$
	3	$16,1 \pm 12,1$	$29,2 \pm 7,5$	$25,9 \pm 4,0$
III	1	$1,6 \pm 1,8$	$12,4 \pm 14,0$	$36,9 \pm 9,0$
	2	$8,1 \pm 1,4$	$43,6 \pm 26,1$	$23,4 \pm 5,6$
	3	$4,2 \pm 5,0$	$28,6 \pm 23,8$	$33,0 \pm 8,1$
IV	1	$1,2 \pm 1,1$	$1,4 \pm 1,7$	$40,4 \pm 4,5$
	2	$1,5 \pm 1,5$	$1,9 \pm 2,0$	$35,4 \pm 5,2$
	3	$0,4 \pm 1,0$	$2,9 \pm 1,7$	$38,9 \pm 6,4$

De forma análoga, las EE N-NH_4^+ aumentaron de forma constante desde la etapa I hasta alcanzarse el $38,8 \pm 5,3$ % de eliminación al final de la operación, independientemente de la unidad evaluada (Figura 17). Estos resultados fueron acordes con las EE TN de $34,3 \pm 7,8$ % registradas durante la Etapa IV en las tres unidades (Figura 18). Estudios previos han registrado eliminaciones

de $N-NH_4^+$ del 30 % para biofiltros de eliminación de CH_4 sujetos a tasas de alimentación de NH_4^+ similares (Veillette *et al.*, 2011). Además, durante la operación se registraron EE $P-PO_4^{3-}$ máximas de 30-35 % dentro de los BF3 independientemente de la unidad y de la etapa evaluada. Por lo tanto, quedó demostrado en el presente trabajo la viabilidad del centrado diluido como solución de irrigación de biofiltros inorgánicos dirigidos al tratamiento de CH_4 en las EDAR, siendo así una alternativa factible para mitigar parcialmente el potencial de eutrofización de estos efluentes.

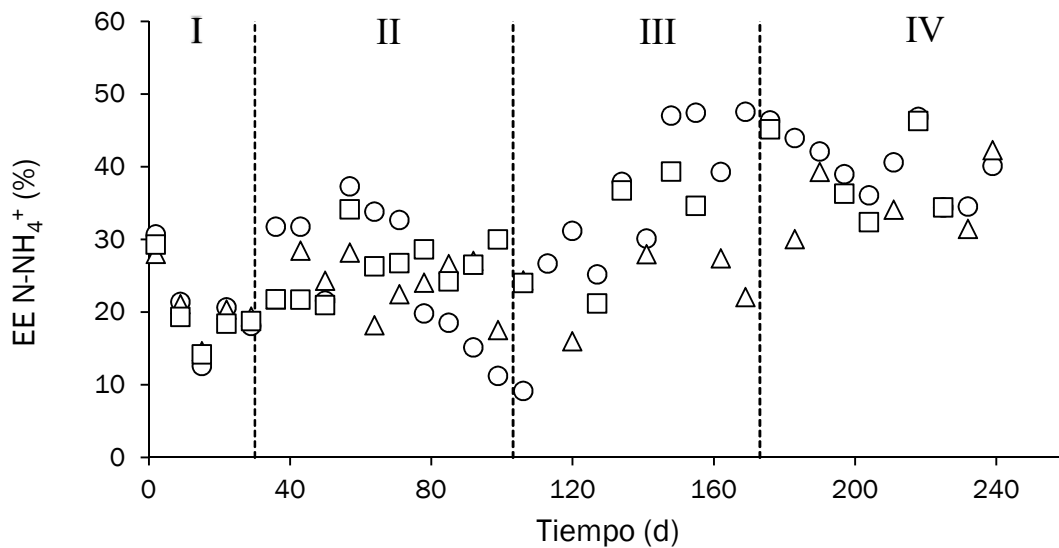


Figura 17. Evolución temporal de las EE de $N-NH_4^+$ en BF1 (o), BF2 (□) y BF3 (Δ) a lo largo del experimento.

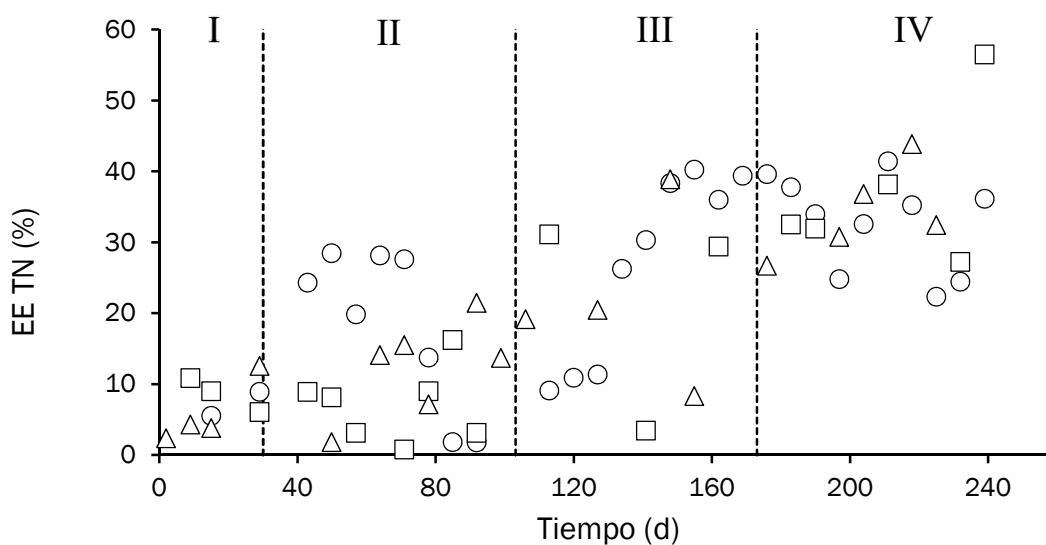


Figura 18. Evolución temporal de las EE de TN en BF1 (o), BF2 (□) y BF3 (Δ) a lo largo del experimento.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la robustez y el desempeño de estrategias de alimentación/hambruna para el tratamiento de CH₄ en dos BFs alternos mediante una comparación sistemática con un BF alimentado de forma continua durante operación a largo plazo. Las principales conclusiones del presente trabajo se citan a continuación:

- La CE de CH₄ de las unidades alternas fue, en promedio, un 17,4 % más alta que la registrada en el BF control.
- Los BFs operados bajo regímenes de alimentación/hambruna mostraron una rápida recuperación (< 1,5 h) en la CE de CH₄ cuando fueron sometidos a periodos de inanición de CH₄ de 3 y 5 días, bajo tasas de irrigación bajas (78 mL L⁻¹ d⁻¹) y privación de aire. Sorprendentemente, las inaniciones de corto plazo consecutivas aumentaron las CEs de CH₄ durante las primeras etapas de operación, mientras que las condiciones más severas de hambruna (privación de aire y suministro limitado de nutrientes) condujeron a valores máximos de CE de CH₄ (23,9 g m⁻³ h⁻¹) y de mineralización (191,0 %) durante el régimen de alimentación. Esto probablemente se deba a una mayor estimulación del metabolismo endógeno de las comunidades microbianas bajo las severas condiciones de hambruna aquí empleadas.
- La aclimatación gradual de las comunidades a estos ciclos de alimentación y hambruna dio como resultado la disminución de los periodos de recuperación de la máxima actividad microbiana (1,5 h al final del experimento).

BIBLIOGRAFÍA

Acton, S.D., Baggs, E.M., 2011. Interactions between N application rate, CH₄ oxidation and N₂O production in soil. *Biogeochemistry* 103, 15–26. doi:10.1007/s10533-010-9442-5.

Álvarez-Hornos, F. J., Gabaldón, C., Martínez-Soria, V., Marzal, P., Peña-Roja, J.M., 2008. Biofiltration of toluene in the absence and the presence of ethyl acetate under continuous and intermittent loading. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (5), 643–653. doi:10.1002/jctb.1843.

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

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

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

BOCyL, 2009. Estrategia Regional contra el Cambio Climático en Castilla y León 2009-2012-2020:
http://www.medioambiente.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1259064156693/_/_/_ (consultado en mayo 2017).

Bosse, U., Frenzel, P., Conrad, R., 1993. Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 13(2), 123-134. doi:10.1111/j.1574-6941.1993.tb00058.x.

Bowman, J. P., 2006. The methanotrophs—the families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. Ch. 3.1.14. *Prokaryotes* 5: 266–289. doi:10.1007/0-387-30745-1_15.

Brunner, C. R., 1996. *Incineration System Handbook*. Incinerator Consultants Incorporated (ICI). ISBN 0-9621774-0-7.

Bu'lock, J., Kristiansen, B., 1991. *Biotecnología Básica*. Editorial ACRIBIA S.A. ISBN 84-200-0704-8.

Cáceres, M., Dorado, A. D., Gentina, J. C., Aroca, G., 2016. Oxidation of methane in biotrickling filters inoculated with methanotrophic bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-016-7133-z.

Cheng, Z., Lu, L., Kennes, C., Yu, J., Chen, J., 2016. Treatment of gaseous toluene in three biofilters inoculated with fungi/bacteria: Microbial analysis, performance and starvation response. *Journal of Hazardous Materials* 303, 83–93. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.10.017.

Chidambarampadmavathy, K., Karthikeyan, O. P., Huerlimann, R., Maes, G. E., Heimann, K., 2016. Response of mixed methanotrophic consortia to different methane to oxygen ratios. *Waste Management* 61, 220–228. Doi:10.1016/j.wasman.2016.11.007.

Corsi, R. L., Seed, L., 1995. Biofiltration of BTEX: Media, substrate, and loadings effects. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 14(3), 151–158. doi: 10.1002/ep.670140313.

Cox, H. H., Deshusses, M. A., 2002. Effect of Starvation on the Performance and Re-acclimation of Biotrickling Filters for Air Pollution Control. *Environmental Science & Technology*, 36(14), 3069–3073. doi:10.1021/es015693d.

Dalton, H., Prior, S. D., Leak, D. J., Stanley, S. H., 1984. Regulation and control of methane monooxygenase. In: Crawford RL, Hanson RS (eds) *Microbial growth on C1 compounds*. American Society for Microbiology, Washington, 75–82.

Devinny, J. S., Ramesh, J., 2005. A phenomenological review of biofilter models. *Chemical Engineering Journal*, 113(2-3), 187–196. doi:10.1016/j.cej.2005.03.005.

Dorado, A. D., Baeza, J. A., Lafuente, J., Gabriel, D., Gamisans, X., 2012. Biomass accumulation in a biofilter treating toluene at high loads – Part 1: Experimental performance from inoculation to clogging. *Chemical Engineering Journal* 209, 661–669. doi:10.1016/j.cej.2012.08.018.

Dunfield, P., Knowles, R., 1995. Kinetics of inhibition of methane oxidation by nitrate, nitrite, and ammonium in a humisol. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8), 3129–3135.

EEA, European Environment Agency. Annual European Union greenhouse gas inventory 1990 - 2014 and inventory report 2016. .

<http://www.eea.europa.eu/publications/european-union-greenhouse-gas-inventory-2016> (consultado en mayo 2017).

EECCCL: Estrategia española de Cambio Climático y energía limpia 2007-2012-2020, 2007. http://www.mapama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/est_cc_energ_limp_tcm7-12479.pdf (consultado en mayo 2017).

EEDS: Estrategia española de desarrollo sostenible 2007. http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/estrategia-espanola-desarrollo-sostenible/EEDSnov07_editdic_tcm7-14887.pdf (consultado en mayo 2017).

Enebo, L., 1967. A methane-consuming green algae. *Acta Chemica Scandinavica (1947-1999)* 21, 625–632. doi:10.3891/acta.chem.scand.21-0625.

EPA, Environmental Protection Agency US. Inventory of US greenhouse gas emissions and sinks: 1990 - 2014. <http://epa.gov/climatechange/ghgemissions/usinventoryreport.html> (consultado en mayo 2017).

Estrada, J. M., Kraakman, N. J. R., Lebrero, R., Muñoz, R., 2012. A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnology Advances* 30(6), 1354-1363.

Estrada, J. M., Quijano, G., Lebrero, R., Muñoz, R., 2013. Step-feed biofiltration: A low cost alternative configuration for off-gas treatment. *Water Research* 47, 4312-4321. doi:10.1016/j.watres.2013.05.007.

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

Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., De Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de PasSchoonen, K. T., Op den Camp, H. J., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M. S., Strous, M., 2010. Nitrite-driven anaerobic

methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543–548. doi:10.1038/nature08883.

Ferdowsi, M., Veillette, M., Avalos-Ramírez, A., Jones, J. P., Heitz, M., 2016. Performance evaluation of a methane biofilter under steady state, transient state and starvation conditions. *Water, Air, & Soil Pollution* 227, 168. doi:10.1007/s11270-016-2838-7.

Gebert, J., Gröngroft, A., Miehl, G., 2003. Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Management* 23(7), 609–619. doi:10.1016/S0956-053X(03)00105-3.

Gebert, J., Gröngroft, A., 2006. Performance of a passively vented fieldscale biofilter for the microbial oxidation of landfill methane. *Waste Management* 26(4), 399–407. doi:10.1016/j.wasman.2005.11.007.

Girard, M., Avalos Ramirez, A., Buelna, G., Heitz, M., 2011. Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry - influence of the methane and nitrogen concentrations. *Chemical Engineering Journal* 168, 151–158. doi:10.1016/j.cej.2010.12.054.

Gómez-Cuervo, S., Alfonsín, C., Hernández, J., Feijoo, G., Moreira, M. T., Omil, F., 2016. Diffuse methane emissions abatement by organic and inorganic packed biofilters: Assessment of operational and environmental indicators. *Journal of Cleaner Production* 143, 1191–1202. doi:10.1016/j.jclepro.2016.11.185.

Hanson, R. S., Hanson, T. E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* 60, 439–471.

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

IPCC, 2013: Summary for Policymakers. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*

Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T. J., Murrell, J. C., Xing, X. H., 2010. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 277–288. doi:10.1016/j.bej.2010.01.003.

Knittel, K., Boetius, A., 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review Microbiology* 63, 311–334. doi:10.1007/s00253-013-4734-z.

Konopka, A., Zakharova, T., Nakatsu, C., 2002. Effect of starvation length upon microbial activity in a biomass recycle reactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 286–291. doi:10.1038/sj.jim.7000322.

Lebrero, R., Hernández, L., Pérez, R., Estrada, J. M., Muñoz, R., 2015. Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: Exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *Journal of Environmental Management*, 151, 124–131. doi:10.1016/j.jenvman.2014.12.016.

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

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

Lipscomb, J. D., 1994. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annual Review of Microbiology* 48, 371–399. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.002103.

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

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

Morgan-Sagastume, F., Sleep, B. E., Allen, D. G., 2001. Effects of biomass growth on gas pressure drop in biofilters. *Journal of Environmental Engineering* 127(5). doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2001)127:5(388).

Nikiema, J., Heitz, M., 2007. Control of methane emissions issuing from landfills: the canadian case. *Biotechniques for Air Pollution Control II*, 2007: 193–200. ISBN: 978-84-9749-258-4.

Nikiema, J., Heitz, M., 2009. The influence of the gas flow rate during methane biofiltration on an inorganic packing material. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 87(1), 136–142. doi:10.1002/CJCE.20131.

Op den Camp, H. J. M., Islam, T., Sttot, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M. S. M., Birkeland, N. K., Pol, A., Dunfield, P. F., 2009. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environmental Microbiology Reports* 1(5), 293–306. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x.

Patt, T. E., Hanson, R. S., 1978. Intracytoplasmatic membrane, phospholipid, and sterol content of *Methylobacterium organophilum* cells grown under different conditions. *Journal of Bacteriology* 134(2), 636–644. PMID: PMC222297.

Posadas, E., Serejo, M. L., Blanco, S., Pérez, R., García-Encina, P. A., Muñoz, R., 2015. Minimization of biomethane oxygen concentration during biogas upgrading in algal–bacterial photobioreactors. *Algal Research* 12, 221–229. doi:10.1016/j.algal.2015.09.002.

Ramirez, A. A., Garcia-Aguilar, B. P., Jones, J. P., Heitz, M., 2012. Improvement of methane biofiltration by the addition of non-ionic surfactants to biofilters packed with inert materials. *Process Process Biochemistry* 47, 76–82. doi:/10.1016/j.procbio.2011.10.007.

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

Scott, D., Brannan, J., Higgins, I. J., 1981. The effect of growth conditions on intracytoplasmic membranes and methane monooxygenase activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology* 125, 63–72. doi:10.1099/00221287-125-1-63.

Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and cooper. *FEMS Microbiolgy Reviews* 34(4), 496–531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x.

Semrau, J. D., 2011. Bioremediation via methanotrophy: overview of recent findings and suggestions for future research. *Frontiers in Microbiology* 2, 209. doi:10.3389/fmicb.2011.00209.

Seoáñez Calvo, M., 1998. *Ecología Industrial: Ingeniería medioambiental aplicada a la industria y a la empresa. Manual para responsables medioambientales. Colección: Ingeniería medioambiental, 310-316. 2ª Edición. ISBN 84-714-714-9.*

Sorial, G. A., Smith, F. L., Suidan, M. T., Biswas, P., Brenner, R. C., 1995. Evaluation of Trickle Bed Biofilter Media for Toluene Removal. *Journal of the Air & Waste Management Association* 45(10), 801–810. doi:10.1080/10473289.1995.10467410.

Smith, F. L., Sorial, G. A., Suidan, M. T., Breen, A. W., Biswas, P., Brenner, R. C., 1996. Development of Two Biomass Control Strategies for Extended, Stable Operation of Highly Efficient Biofilters with High Toluene Loadings. *Environmental Science & Technology* 30(5), 1744–1751. doi:10.1021/es950743y.

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

Strong, P. J., Xie, S., Clarke, W. P., 2015. Methane as a Resource: Can the Methanotrophs add value?. *Environmental Science and Technology* 49(7), 4001–4018. doi:10.1021/es504242n

Suarez-Mendez, C., Sousa, A., Heijnen, J., Wahl, A., 2014. Fast “Feast/Famine” Cycles for Studying Microbial Physiology under Dynamic Conditions: A Case Study with *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites* 4(2), 347–372. doi:10.3390/metabo4020347.

Swanson, W. J., Loehr, R. C., 1997. Biofiltration: Fundamentals, design and operations principles, and applications of biological APC technology. *Journal of Environmental Engineering* 123(6), 538–546. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:6(538).

Veillette, M., Vienes, P., Ávalos-Ramírez, A., Brzezinski, R., Heitz, M, 2011. Effect of ammonium concentration on microbial population and performance of a biofilter treating air polluted with methane. *Chemical Engineering Journal* 171, 1114–1123. doi: 10.1016/j.cej.2011.05.008.

Wallar, B. J., Lipscomb, J. D., 2001. Methane monooxygenase component B mutants alter the kinetics of steps throughout the catalytic cycle. *Biochemistry* 40(7), 2220–2233. doi:10.1021/bi002298b

Weber, F. J., Hartmans, S., 1996. Prevention of clogging in a biological trickle-bed reactor removing toluene from contaminated air. *Biotechnology and Bioengineering* 50(1), 91–97. doi:10.1002/(sici)1097-0290(19960405)50:13.0.co;2-a.

Wolf, H. J., Hanson, R. S., 1979. Isolation and characterization of methane-utilizing yeasts. *Journal of General Microbiology* 114, 187–194. doi:10.1099/00221287-114-1-187.

Wright, W. F., Schroeder, E. D., Chang, D. P. Y., 2005. Regular transient loading response in a vapour-phase flow-direction-switching biofilter. *Journal of Environmental Engineering* 131, 1649–1658. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2005)131:12(1649).

Wübker, S. M., Laurenzis, A., Werner, U., Friedrich, C., 1997. Controlled biomass formation and kinetics of toluene degradation in a bioscrubber and in a reactor with a periodically moved trickle-bed. *Biotechnology and Bioengineering* 55(4), 686–692. doi:10.1002/(sici)1097-0290(19970820)55:43.0.co;2-a.

Xue, N., Wang, Q., Wang, J., Wang, J., Sun, X., 2013. Odorous composting gas abatement and microbial community diversity in a biotrickling filter. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 73–80. doi:10.1016/j.ibiod.2013.03.003.

