



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería en Tecnologías Industriales

Valorización biológica de emisiones de  
CH<sub>4</sub> para la producción de bioplásticos

Autor:

Casal Martínez, Jesús

Tutor 1:

Lebrero Fernández, Raquel

Tutor 2:

Pérez Fernández, Rebeca



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES



## RESUMEN

La investigación aquí planteada se enfocó en buscar las condiciones de operación en las cuales se optimice la eliminación de metano (CH<sub>4</sub>) y la co-producción de bioplásticos PHAs a través del tratamiento biológico de CH<sub>4</sub> con bacterias metanotróficas. Se han empleado los inóculos de *Sphagnum* y *Sphagnum+lodo* a las temperaturas de 25 °C, 30 °C y 37 °C. El enriquecimiento se dio en un medio rico en nitrógeno y fósforo (la cantidad de PHAs acumulado en este proceso fue inferior al 1 % en masa), y posteriormente se limitó el fósforo en el medio. Los resultados mostraron que la limitación de fósforo es determinante para acumular PHAs, observándose la acumulación máxima con el inóculo de *Sphagnum* a 25 °C (13,6 ± 5,6 %), aunque es en esta condición en la que se observó la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> más baja (8,8 ± 1,3 mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h). Se ha observado una proporcionalidad inversa en la relación entre la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> y la acumulación de PHAs. En la condición de inóculo de *Sphagnum+lodo* a 37 °C, la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> ha sido la más alta (15,4 ± 0,5 mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h), mientras la acumulación de PHAs ha sido la más baja (5,7 ± 1,8 %). Además, se observó que la limitación de fósforo favorece la acumulación de PHBs frente a la acumulación de PHVs.

PALABRAS CLAVE: Eliminación de CH<sub>4</sub>, metanótrofos, PHA, *Sphagnum*.



## ABSTRACT

The research here presented was focused on the biological treatment of methane (CH<sub>4</sub>) coupled with biopolymers production (PHAs). The optimum operating conditions (temperature and phosphorous limitation) to optimize the biological treatment of CH<sub>4</sub> and PHA production were determined. *Sphagnum* and *Sphagnum+sludge* inocula were enriched at temperatures of 25 °C, 30 °C and 37 °C. The enrichment occurred in a medium rich in nitrogen and phosphorus (the amount of PHAs accumulated in this process was less than 1%), and then phosphorus was limited in the medium. The results showed that phosphorus limitation is determinant to accumulate PHA, observing the maximum accumulation with the *Sphagnum* inoculum at 25 °C (13.6 ± 5.6%). Nevertheless, the lowest CH<sub>4</sub> specific rate of elimination as recorded under this condition (8.8 ± 1.3 mg CH<sub>4</sub> / g biomass · h). Thus, an opposite behaviour has been observed between the specific rate of elimination of CH<sub>4</sub> and the accumulation of PHA. In this sense, the highest specific rate of elimination of CH<sub>4</sub> (15.4 ± 0.5 mg CH<sub>4</sub> / g biomass · h) was obtained with *Sphagnum+sludge* at 37 °C, while the accumulation of PHA was the lowest (5.7 ± 1.8%). In addition, it was also observed that the phosphorus limitation favours the accumulation of PHB against the accumulation of PHV.

KEYWORDS: CH<sub>4</sub> abatement, methanotrophs, PHA, *Sphagnum*.



# ÍNDICE





<b>Índice</b>	1
<b>Introducción</b>	1
1.1. Problemática ambiental del metano	3
1.2. Biología del tratamiento del metano	6
1.3. Biopolímeros polihidroxialcanoatos (PHAs)	8
1.3.1. Tipos de PHAs	9
1.3.2. Obtención de PHAs	10
1.3.3. Industrialización del tratamiento biológico de PHAs	10
1.4. Perspectiva	12
<b>Objetivos</b>	13
<b>Materiales y métodos</b>	17
3.1. Medio mineral salino (MMS)	19
3.2. Inóculos y enriquecimiento a diferentes temperaturas	20
3.3. Influencia de la temperatura en la biodegradación de CH <sub>4</sub> (en presencia de fósforo y sin fósforo)	21
3.4. Influencia de la temperatura en la acumulación de PHAs (en presencia de fósforo y sin fósforo)	22
3.5. Métodos analíticos	22
3.5.1. Curva de calibrado de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub>	22
3.5.2. Monitorización de CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub>	22
3.5.3. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST)	23
3.5.4. Análisis de PHAs	24
3.5.5. Análisis CHNS (Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno, Azufre)	24
3.5.6. Análisis de biología molecular	25
<b>Resultados y discusión</b>	27
4.1. Curva de calibrado	29
4.1.1. CH <sub>4</sub>	29
4.1.2. CO <sub>2</sub>	29
4.2. Influencia de la temperatura en la degradación de CH <sub>4</sub> en MMS	30
4.2.1. Inóculo de <i>Sphagnum</i>	30
4.2.2. Inóculo de <i>Sphagnum</i> + <i>Iodo</i>	30
4.2.3. Velocidad de eliminación de CH <sub>4</sub>	30
4.2.4. Velocidad de producción de CO <sub>2</sub>	31
4.3. Influencia de la temperatura en la degradación de CH <sub>4</sub> en MMS-P (limitación de fósforo)	32
4.3.1. Velocidad de eliminación de CH <sub>4</sub>	34



4.3.2. Velocidad de producción de CO <sub>2</sub>	35
4.3.3. Comparativa entre condiciones de MMS y MMS-P	36
4.4. Análisis CHNS	37
4.5. Acumulación de PHAs	38
4.6. Condiciones óptimas de operación	40
4.7. Análisis de biología molecular	41
4.7.1. Informe de datos por muestra	41
4.7.2. Análisis taxonómico	41
4.7.3. Análisis de diversidad	45
<b>Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>51</b>

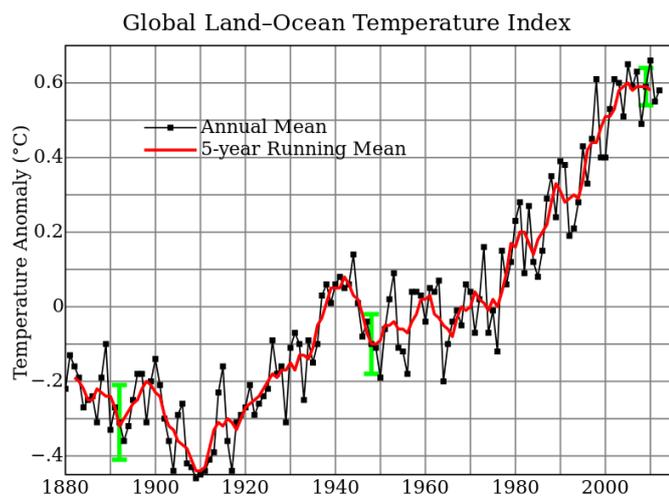


# INTRODUCCIÓN



## 1.1. Problemática ambiental del metano

El cambio climático es un fenómeno que se manifiesta como una variación temporal de las condiciones meteorológicas promedio durante un periodo de tiempo prolongado. Puede estar causado por diversos factores, pero se han identificado ciertas actividades humanas como la causa principal del cambio climático reciente, conocido como *calentamiento global* <sup>1</sup>. El aumento de la concentración de gases de efecto invernadero (GEIs) en la atmósfera está vinculado con el aumento de la temperatura promedio del planeta (**Fig. 1**). De entre estos gases destacan el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el metano ( $\text{CH}_4$ ) <sup>2</sup>.



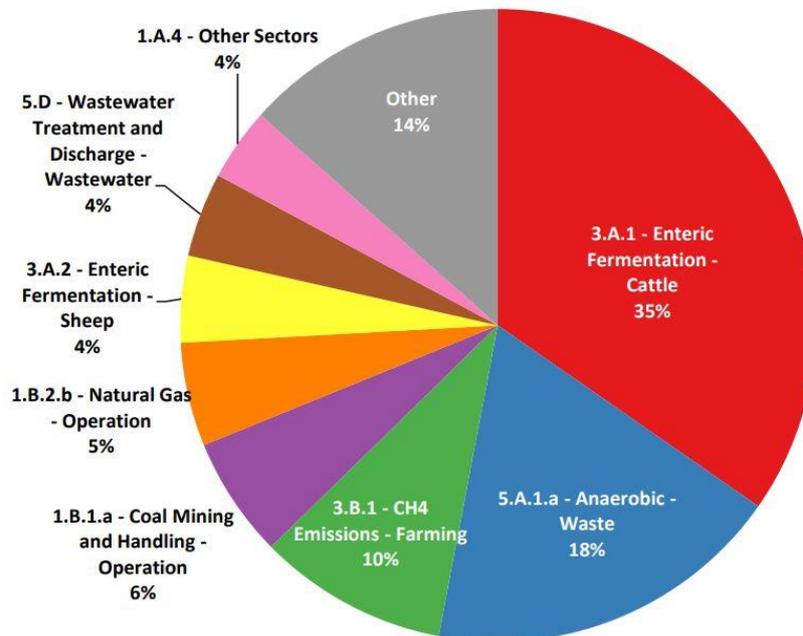
**Fig. 1:** Índice global de temperatura tierra-océano. En negro, la media anual. En rojo, la línea de tendencia media de 5 años consecutivos <sup>3</sup>.

Aunque la cantidad de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera sea mucho mayor que la de  $\text{CH}_4$ , cada uno de los gases de efecto invernadero tiene un tiempo de vida en la atmósfera diferente y distintos efectos ambientales. El grado en el que un determinado GEI contribuye al calentamiento global se define como su Potencial de Calentamiento Global, y el del  $\text{CH}_4$  es 23 veces superior al del  $\text{CO}_2$  <sup>4</sup>.

La concentración de  $\text{CH}_4$  en la atmósfera ha aumentado un 59% desde la era preindustrial, y esto está ligado directamente al aumento en las emisiones ocasionadas por fuentes de carácter antropogénico <sup>5</sup> <sup>6</sup>. De entre estas emisiones, las que tienen una concentración de  $\text{CH}_4$  superiores al 30% (v/v) pueden ser utilizadas como recurso energético. Sin embargo, el 56% de las emisiones tienen una concentración de este gas inferior al 5% (v/v), lo que las hace poco eficientes para la recuperación de energía y se liberan directamente a la atmósfera <sup>7</sup> <sup>8</sup> (**Fig. 2**).

El  $\text{CH}_4$  es el componente principal de combustibles como el gas natural. Cuando éste se quema, se emite menos  $\text{CO}_2$  a la atmósfera que con otros combustibles fósiles, pero cuando se libera a la atmósfera sin ser utilizado, el  $\text{CH}_4$  que lo compone potencia el efecto invernadero, contribuye a la generación de *smog* (niebla contaminante), y afecta a la calidad del aire pudiendo incluso ocasionar problemas de salud <sup>9</sup>.

Como consecuencia de los daños generados por las emisiones de  $\text{CH}_4$ , que repercuten tanto a la economía como a la salud humana, se han desarrollado diferentes estrategias para su reducción.

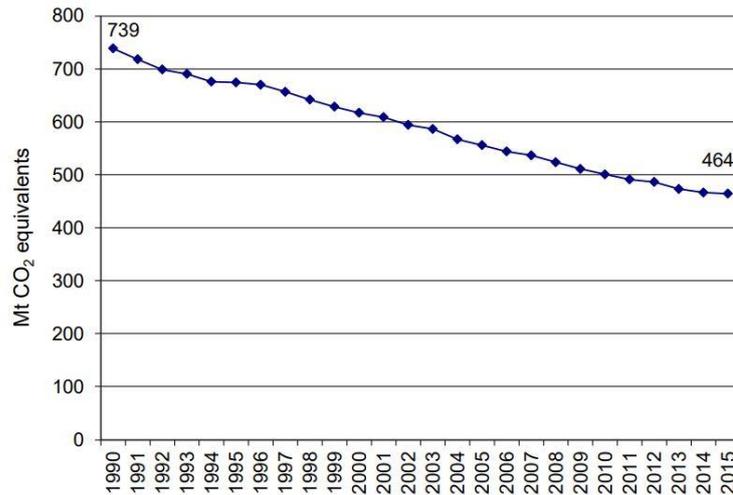


**Fig. 2:** Categorías de principales fuentes de emisión de  $\text{CH}_4$  en 2015 para en la Unión Europea e Islandia <sup>10</sup>.

A nivel mundial, los estados de las Naciones Unidas han fijado su objetivo en controlar las emisiones de GEIs, con el fin de mantener la temperatura media global  $2^\circ\text{C}$  por encima de los niveles preindustriales <sup>7 11</sup>. La agencia Internacional de Energía refleja en un análisis que, con las tecnologías actuales, se pueden reducir las emisiones de  $\text{CH}_4$  en un 75% a nivel mundial, y que es posible realizar dos tercios de esas reducciones a coste cero <sup>12</sup>.

A nivel continental, la Unión Europea (a través de la Agencia Europea de Medio Ambiente, EEA) ha adquirido el compromiso de reducir dichas emisiones un 40% con respecto a los niveles de 1990 (estrategia 'Europa 2030'). Las emisiones de  $\text{CH}_4$  representan un 11% de las emisiones totales de la Unión Europea en 2015, y se han visto reducidas un 37% desde 1990. Las principales razones de la disminución han sido las reducciones en la extracción de carbón y los desechos anaeróbicos (**Fig. 3**).

A nivel nacional, en España se ha desarrollado la Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia 2007-2012-2020, que establece un plan de actuaciones con el fin de mitigar el cambio climático y sus consecuencias, aportando diferentes medidas que contribuyen a la lucha coordinada hacia un desarrollo sostenible <sup>13</sup>.



**Fig. 3:** Emisiones de CH<sub>4</sub> de la Unión Europea desde 1990 a 2015 en Megatoneladas equivalentes de CO<sub>2</sub> <sup>10</sup>.

A pesar de la importancia a nivel ambiental del problema que plantean las emisiones de CH<sub>4</sub> (especialmente las que lo contienen en bajas concentraciones), el desarrollo e implementación de tecnologías para su tratamiento que sean respetuosas con el medio ambiente y económicamente viables es aún muy reducido.

En la actualidad, los métodos de tratamiento directo utilizados con otros contaminantes gaseosos, como la incineración o la adsorción con carbón activo, no son rentables y pueden generar compuestos secundarios nocivos, además de presentar un elevado uso de energía <sup>14</sup>. Una alternativa a estas tecnologías físico-químicas de bajo coste e impacto ambiental reducido, lo constituye el uso de biotecnologías. Entre otros, se ha probado que su uso es eficiente en el tratamiento biológico de Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) mediante la acción biocatalítica de algunos microorganismos <sup>15 16</sup>.

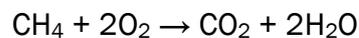
No obstante, la viabilidad técnico-económica que poseen los sistemas biológicos para eliminar CH<sub>4</sub>, se encuentra aún limitada como consecuencia del escaso conocimiento de las cinéticas de biodegradación de este gas a las bajas concentraciones encontradas habitualmente en las emisiones, y de los pocos estudios existentes acerca del crecimiento, estabilidad y afinidad microbiana por el CH<sub>4</sub> en biorreactores <sup>5 14 15</sup>.

Debido a esto, se hace necesario realizar estudios que busquen la aplicación de técnicas biotecnológicas para el tratamiento de corrientes gaseosas, que constituyan una alternativa de coste bajo y reducido impacto ambiental, y que maximicen la capacidad de eliminación de CH<sub>4</sub>. Además, para aumentar la rentabilidad del proceso, los estudios recientes se centran en combinar el proceso de biodegradación con la producción de compuestos de alto valor añadido, como biopolímeros.

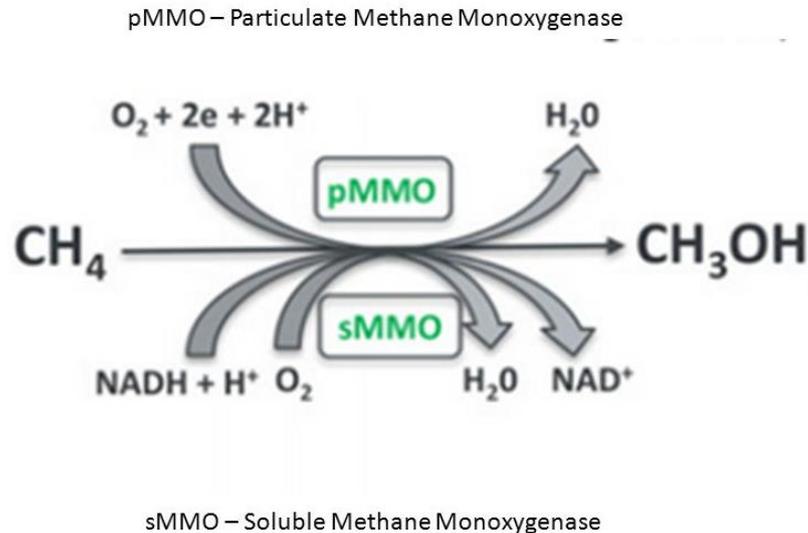
## 1.2. Biología del tratamiento del metano

Los microorganismos capaces de utilizar como fuente de energía los compuestos de un solo átomo de carbono son denominados **metilótrofos**. Este grupo incluye a aquellos que asimilan compuestos con múltiples carbonos que no contienen enlaces carbono-carbono<sup>17</sup>. Un caso particular de los metilótrofos lo constituyen los microorganismos que pueden degradar CH<sub>4</sub> y convertirlo en su única fuente de carbono, crecimiento y energía. Estos reciben el nombre de **metanótrofos**.

Los metanótrofos son, generalmente, bacterias aerobias que asimilan el CH<sub>4</sub> produciendo CO<sub>2</sub> y agua, a través de diversos productos intermedios (CH<sub>4</sub>, formaldehído, ácido fórmico), según la siguiente reacción de oxidación<sup>18</sup>:



A los metanótrofos les distingue del resto de metilótrofos su capacidad para sintetizar la enzima metanomonooxigenasa (MMO). La enzima MMO participa en el primer paso de la ruta de degradación de CH<sub>4</sub> a metanol (**Fig. 4**). De ella, se conocen dos formas: la MMO particulada (pMMO), que se encuentra en la membrana citoplasmática de la célula, y MMO soluble (sMMO), que está en el citoplasma<sup>20 21</sup>.



**Fig. 4:** Primer paso de la ruta de degradación de CH<sub>4</sub>. La enzima MMO participa en la degradación de CH<sub>4</sub> a metanol<sup>22</sup>.

Las bacterias metanotróficas se dividen en tres grupos, de acuerdo a su fisiología y su morfología: las de tipo I, tipo II y tipo X (de más reciente descubrimiento, que reúne características de las tipo I y tipo II). La primera disimilitud que encontramos entre ellas es que la enzima pMMO es parte constituyente de todos los metanótrofos, mientras que la enzima sMMO solo se encuentra en los metanótrofos tipo II.

El segundo paso de la ruta metabólica, donde se asimila el formaldehído generado, supone la principal diferencia entre estos tipos. Las bacterias metanotróficas de tipo I lo hacen por la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP), las tipo II utilizan la ruta de la serina y las tipo X son capaces de asimilar formaldehído a través de ambas (Fig. 5, Fig. 6) <sup>23 24 25</sup>.

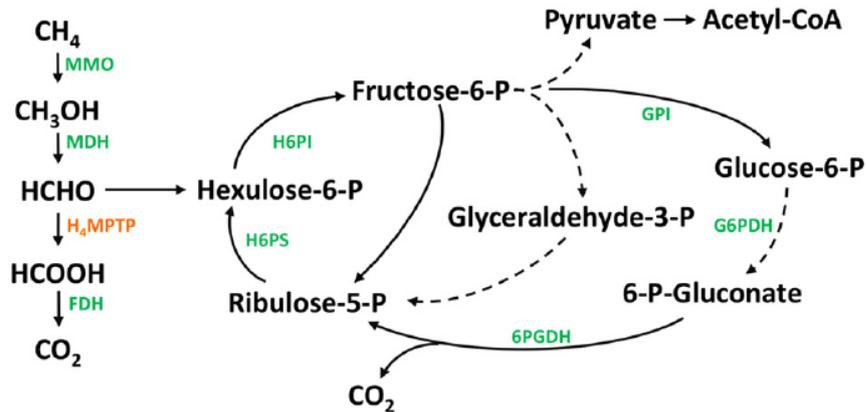


Fig. 5 Ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) para la asimilación de formaldehído <sup>26</sup>.

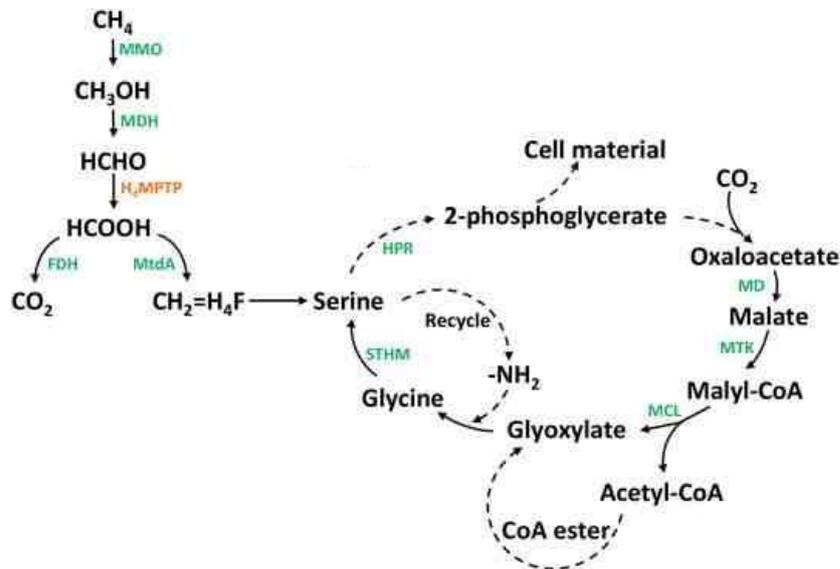


Fig. 6: Ruta de la serina para la asimilación de formaldehído <sup>26</sup>.

Gracias a estudios del gen 16S rARN, se puede realizar una clasificación filogenética de las bacterias metanotróficas. Hasta hace poco, todas las especies conocidas de metanótrofos pertenecían al filo *Proteobacteria*, en las clases *Gammaproteobacteria* (destacan los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylococcus*) y *Alphaproteobacteria* (*Methylocapsa*, *Methylocella*, *Methylosinus* y *Methylocystis*). Sin embargo, en 2007-2008, se descubrió un nuevo género, el género *Methylacidiphilum* dentro del filo *Verrucomicrobia* <sup>27</sup>.

Para favorecer el crecimiento de metanótrofos en un medio, se deben presentar condiciones adecuadas. Se ha de tener en cuenta tanto factores ambientales (temperatura, pH) como macronutrientes y elementos traza presentes en el medio <sup>28 18</sup>. Para acelerar la oxidación de CH<sub>4</sub> a metanol, la presencia del catión del cobre Cu<sup>2+</sup> favorece la actividad catalítica de la enzima MMO, y una alta concentración de amonio la dificultaría, pues compite con la MMO por el lugar de unión al CH<sub>4</sub> <sup>29 19</sup>.

Las condiciones óptimas para la biodegradación la oxidación de CH<sub>4</sub> varían dependiendo de si los metanótrofos son tipo I o tipo II. No obstante, ambos tipos de bacterias necesitan crecer en un medio que cumpla las siguientes condiciones:

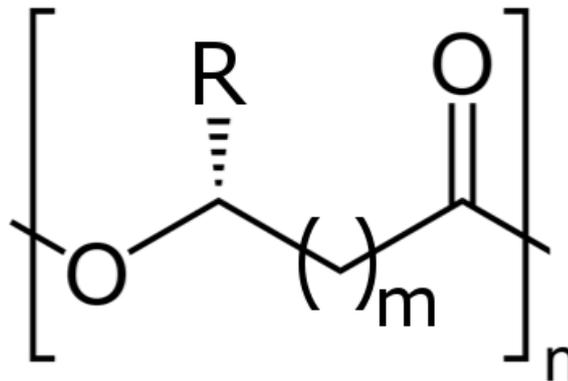
- Temperatura: entre 25°C y 37°C <sup>30</sup>.
- pH: entre 7 y 7,65 <sup>31</sup>.
- Concentración de Cu<sup>2+</sup>: >0,86 μmol / g biomasa <sup>32</sup>. Los metanótrofos tipo I necesitan una concentración de Cu<sup>2+</sup> más alta que los tipo II.
- Concentración de amonio: 12 – 61 μM <sup>33</sup>.
- Contenido de agua: 20% – 25% <sup>18</sup>.

Se conoce que los metanótrofos tipo I y los tipo II no tienen el mismo nivel de adaptación ante la fluctuación de las condiciones del medio. La principal diferencia se aprecia en que las bacterias metanotróficas tipo I no se adaptan ante las fluctuaciones de CH<sub>4</sub> como lo hacen las de tipo II. A pesar de que esta variable se vea limitada porque concentraciones altas de CH<sub>4</sub> lo convierten en explosivo, los metanótrofos tipo II se convierten en un reclamo para estudios e investigaciones <sup>34</sup>.

Unido a esto, se ha probado que bajo condiciones específicas, los metanótrofos tipo II, al asimilar CH<sub>4</sub> por la ruta de la serina, son capaces de desviar el flujo de carbono que se aporta a la producción de unos biopolímeros conocidos como **polihidroxicanoatos (PHAs)** <sup>35</sup> (**Apartado 1.3**). Esta ventaja competitiva puede ser aprovechada en los sistemas de tratamiento biológico de CH<sub>4</sub> para aumentar la viabilidad económica del proceso, ya que la comunidad metanotrófica no sólo elimina el CH<sub>4</sub> si no que se obtiene este producto de alto valor añadido.

### 1.3. Biopolímeros polihidroxicanoatos (PHAs)

Los PHAs son biopoliésteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo (**Fig. 7**). En las últimas décadas, su estudio se ha intensificado debido a que, además de servir como sustitutos de plásticos de origen petroquímico, son completamente biodegradables y se producen a partir de fuentes de carbono renovables. Además, tienen una aplicación importante como materiales biocompatibles <sup>36</sup>.



**Fig. 7:** Estructura general de un polihidroxicanoato (PHA). Cada molécula de un PHA está formada por 600-35.000 monómeros <sup>37</sup>.

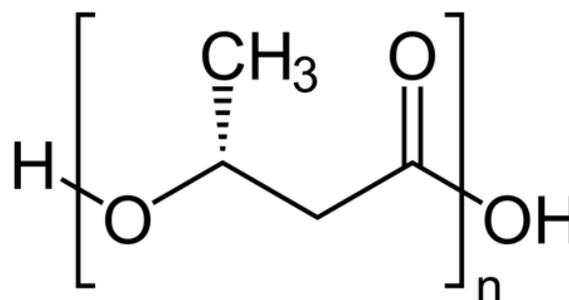
A pesar de que su extracción y procesado todavía limita su competitividad, su biocompatibilidad y biodegradabilidad los ha convertido en candidatos idóneos para aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria, agraria, y especialmente biomédica <sup>38</sup>.

### 1.3.1. Tipos de PHAs

Los PHAs se pueden clasificar en varios tipos según la longitud de su estructura monomérica, y de esta dependen las propiedades mecánicas y térmicas de estos biopoliésteres:

- PHA-SCL: De cadena corta, aquellos polímeros compuestos por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono.
- PHA-MCL: De cadena media. De 6 a 14 átomos de carbono.
- PHA-LCL: De cadena larga. Más de 14 átomos de carbono.
- PHA-SCL-MCL: Polímeros compuestos por monómeros de ambos tipos <sup>39</sup>.

Entre los PHAs de mayor aplicación industrial encontramos el polihidroxiacetato (PHA), el polihidroxiacetato (PHB) (**Fig. 8**), el polihidroxiacetato (PHV), el heterocopolímero de PHB y PHV (PHBV), el polihidroxiacetato (PHH), el polihidroxiacetato (PHO), el polihidroxiacetato (PHD) y el polihidroxiacetato (PHDD). El PHV, PHBV, y principalmente el PHB, ocupan mayoritariamente el mercado en la actualidad <sup>40 41</sup>.

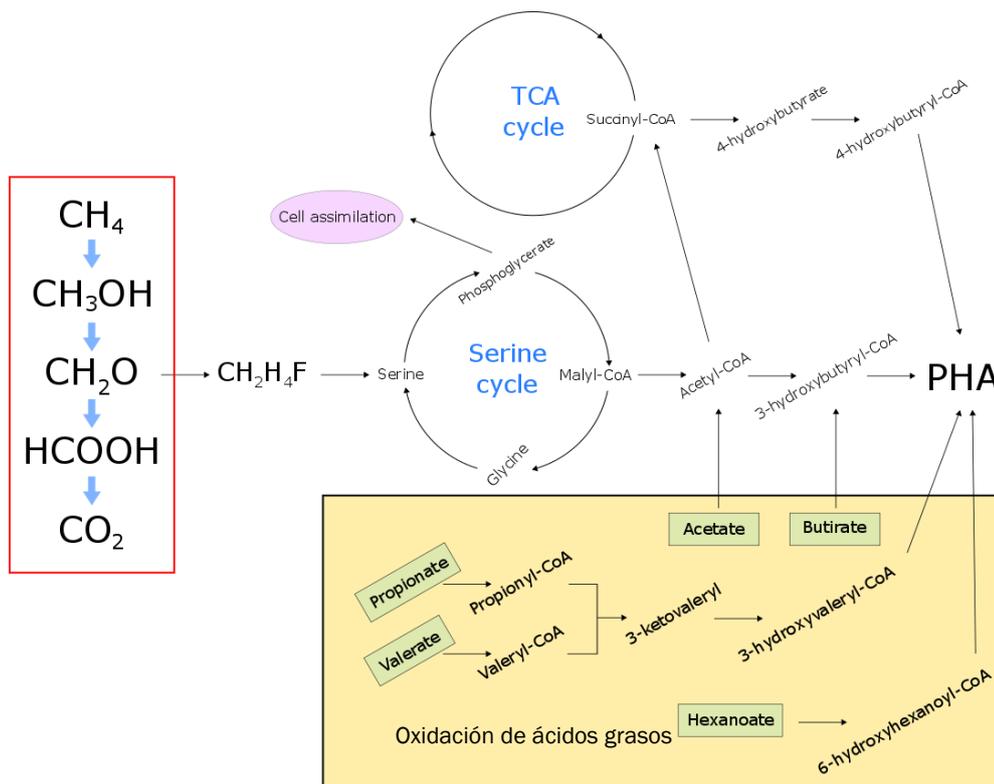


**Fig. 8:** Estructura de un polihidroxiacetato (PHB).

### 1.3.2. Obtención de PHAs

Los PHAs son los únicos bioplásticos totalmente producidos por microorganismos. La ruta de producción de PHAs por metanótrofos se ha estudiado, y sigue los siguientes pasos secuencialmente (Fig.9):

1. El CH<sub>4</sub> se introduce en el interior de la célula.
2. El CH<sub>4</sub> introducido es transformado a hidroxialcil-coA tioéster.
3. El biopolímero PHA se forma a partir de monómeros HA por polimerización con enlaces éster<sup>37 42 43</sup>.



**Fig. 9:** Ruta metabólica de producción de PHAs en los metanótrofos tipo II. Las flechas indican la existencia de intermedios no mencionados<sup>44 45</sup>.

### 1.3.3. Industrialización del tratamiento biológico de PHAs

El interés industrial en la producción ha ido en aumento durante los últimos 40 años. Distintas empresas dedicadas al desarrollo y comercialización de tecnología de bioplásticos han investigado la producción a escala industrial de PHAs (principalmente PHBs), consiguiendo acumulaciones de 3%-34% del peso seco celular en cultivos mixtos<sup>46</sup>, y de 10%-88% en cultivos puros<sup>47</sup>.

Sin embargo, la rentabilidad del proceso de PHAs puede ser mejorada de forma sustancial. Por ejemplo, conseguir una fuente de carbono y energía de bajo coste, podría suponer un ahorro de un 30% en los costes de producción<sup>42 48</sup>. En este sentido, las emisiones de CH<sub>4</sub> podría suponer

un sustrato a coste cero, y convertirse en una opción viable para revalorizar estos bioplásticos, reducir el impacto medioambiental de las emisiones del GEI CH<sub>4</sub> y mejorar la sostenibilidad económica del proceso de degradación de dicho gas <sup>49 47 50</sup> .

Sin embargo, el 80% de los estudios que se han realizado en esta área se han realizado en condiciones muy diferentes a las que podrían implementarse a escala industrial, por lo que la cantidad de información relevante y fiable es escasa <sup>51</sup>.

A esto hay que añadir que, a pesar de la gran versatilidad metabólica de las bacterias metanotróficas de tipo II, no se han encontrado producciones significativas de otros biopolímeros distintos a los PHBs <sup>52</sup>.

Se han llevado a cabo distintas investigaciones para encontrar algunas de las condiciones que favorecen el crecimiento de metanótrofos y la acumulación de PHBs. Las pruebas con bacterias metanotróficas tipo II han confirmado que estos productores de PHBs se ven favorecidos cuando el CH<sub>4</sub> se suministra intermitentemente y en niveles bajos, así como el uso de diversas formas de nitrógeno (amonio o N<sub>2</sub> gas) favorecen la acumulación de estos bioplásticos porque se reduce el gasto de energía. La producción de PHBs también se favorece a niveles de pH entre 4 y 5, y a bajos niveles de cobre <sup>53</sup>. Sin embargo, tanto el efecto del fosfato como el de la temperatura han sido poco estudiados hasta el momento.

En base a lo expuesto, aparece la necesidad de realizar estudios de las condiciones óptimas de eliminación de CH<sub>4</sub> y producción de PHAs en sistemas que permitan su escalado a nivel industrial. No obstante, la viabilidad de dicha aplicación se ve limitada debido a varios factores, que se pueden resumir en:

- Reducido número de estudios sobre el crecimiento, estabilidad y afinidad microbiana por el CH<sub>4</sub> en reactores biológicos.
- Conocimiento limitado de las cinéticas de biodegradación del CH<sub>4</sub> en concentraciones similares a las que se encuentran en las emisiones reales.
- Pocos estudios que abarquen conocimientos sobre el uso de cepas de metanótrofos tipo II, y la influencia de las condiciones de cultivo y los micronutrientes en la eliminación de CH<sub>4</sub> y producción de PHAs.
- Falta de estudios en las cinéticas de crecimiento de los PHAs en cultivos de metanótrofos tipo II, así como de los tipos de PHAs obtenidos en diferentes condiciones y para distintos tipos de cepas.
- Escaso número de aplicaciones en reactores que operen a condiciones similares a las de escala industrial <sup>51</sup>.

Hoy en día, comprender el comportamiento de los microorganismos en un proceso bioquímico es muy accesible, ya que se dispone de técnicas avanzadas en biología molecular que nos permiten conocer la estructura



de las comunidades microbianas y la interacción que establecen con su entorno.

Principalmente, los métodos con base en la información obtenida del ADN tienen un alto grado de fiabilidad, por lo que análisis de funcionalidad génica y metagenómicos se convierten en técnicas clave para observar el comportamiento de los microorganismos en un sistema y prever su actuación ante cambios en las condiciones operacionales.

#### 1.4. Perspectiva

A pesar de los avances en las últimas décadas en el tratamiento biológico de emisiones de  $\text{CH}_4$ , los estudios realizados hasta la fecha no han aportado resultados concluyentes que respalden que esta solución sea ni técnica ni económicamente rentable.

No obstante, se ha demostrado en diferentes investigaciones que, bajo ciertas condiciones, los metanótrofos son capaces de producir sustancias de alto valor, como los PHAs, a partir de concentraciones reducidas de  $\text{CH}_4$ , en la fase gas, lo que permitiría mejorar la rentabilidad del proceso.

Por ello, es fundamental encontrar los parámetros idóneos que permitan obtener tasas altas de crecimiento de estos cultivos junto con elevadas eficacias de degradación de  $\text{CH}_4$  y de acumulación de PHAs. Esto permitiría reducir el impacto del  $\text{CH}_4$  como gas de efecto invernadero y obtener un sustrato a coste cero para la co-producción de compuestos que tendrían un alto valor añadido.

La presente investigación se centra en el estudio de la valorización biológica de emisiones de  $\text{CH}_4$ . Para ello, el objetivo será encontrar algunas de las condiciones óptimas para tratar biológicamente el  $\text{CH}_4$  a través de bacterias metanotróficas, optimizando a su vez las condiciones de cultivo que maximicen la co-producción de bioplásticos PHAs. Se hará uso de diferentes inóculos con presencia de metanótrofos tipo II, que se harán crecer en diferentes condiciones estudiando la eliminación de  $\text{CH}_4$  y la acumulación de PHAs. Finalmente, se realizará un estudio microbiológico de los cultivos utilizados.



# OBJETIVOS

---





La investigación aquí planteada tiene como principal objetivo encontrar los parámetros de operación óptimos que permitan maximizar la co-producción de bioplásticos (PHAs) a partir del tratamiento biológico de emisiones de CH<sub>4</sub>. Los objetivos específicos son:

- i. Observar la adaptación de metanótrofos de inóculos de *Sphagnum* y *Sphagnum+lodo* en un medio rico en nitrógeno y fósforo.
- ii. Encontrar las condiciones de temperatura más favorables para su cultivo.
- iii. Evaluar la respuesta de las bacterias metanotróficas cuando son sometidas al estrés de ser inoculadas en un medio carente de fósforo.





# MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1. Medio mineral salino (MMS)

El medio mineral salino (MMS) que se utilizó fue el medio modificado de Whittenbury et al. (1970) <sup>54</sup>. Las disoluciones utilizadas en la preparación del medio mineral son las siguientes (**Fig. 10**):

	Masa	Soluto	Disolvente
Disolución 1	27,2 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	
Disolución 2	35,6 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Se enrasa a 1 L con agua Milli-Q
Disolución 3A	80 g	$\text{KNO}_3$	
	16 g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
Disolución 3B	11 g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
Disolución TES (elementos traza)	27,663 mg	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Se enrasa a 100 mL con agua Milli-Q
	100 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	
	50 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
	1,5 mg	$\text{H}_3\text{BO}_4$	
	2,7285 mg	$\text{CoCl}_2$	
	2 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
	1 mg	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
Vitaminas	20 mg	Biotina	Se enrasa a 318 mL con agua Milli-Q
	200 mg	Nicotinamida	
	100 mg	Ácido 4-aminobenzoico	
	100 mg	ácido pantoténico	

La cantidad presente de cada una de las disoluciones en cada uno de los medios se detalla a continuación:

- Medio inicial (MMS)
  - Disolución 1: 15 mL
  - Disolución 2: 15 mL
  - Disolución 3A: 10,11 mL
  - Disolución TES: 10 mL
  - Disolución 3B: 10 mL
  - Vitaminas: 1 mL (filtradas en filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ )
  - Agua *milli-Q*: hasta 1000 mL
- Medio con limitación de fósforo (MMS-P)
  - Disolución 3A: 10,11 mL
  - Disolución TES: 10 mL
  - Disolución 3B: 10 mL
  - Vitaminas: 1 mL (filtradas en filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ )
  - Agua *milli-Q*: hasta 1000 mL



Fig. 10: Disoluciones utilizadas para la preparación de MMS y MMS-P.

Todos los productos químicos necesarios para la preparación de los medios se compraron en PANREAC (Barcelona, España), mientras que el CH<sub>4</sub> ( $\geq 99,5\%$ ) y el O<sub>2</sub> ( $\geq 99,0\%$ ) se obtuvieron de Abelló Linde S.A. (Barcelona, España).

### 3.2. Inóculos y enriquecimiento a diferentes temperaturas

Para el enriquecimiento de microorganismos capaces de degradar CH<sub>4</sub> en diferentes condiciones se ha utilizado como inóculo el lodo secundario fresco de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Valladolid (Valladolid, España) y la turba de *Sphagnum mixta* (entre 150 – 350 especies) (Plantas Carnívoras, España). Se han utilizado dos inóculos: uno compuesto sólo de *Sphagnum* y otro compuesto de *Sphagnum*+lodo.

El crecimiento bacteriano se llevó a cabo a lo largo de 19 días, por lotes en botellas de suero de 1200 mL que contenían 200 mL de MMS y 10 g de *Sphagnum* (50 g/L) o 180 mL de MMS y 20 mL del inóculo mixto (50 g/L). Las botellas se cerraron con septum de butilo y tapones de plástico, y el espacio de cabeza se limpió con O<sub>2</sub> durante 15 minutos para eliminar el N<sub>2</sub>. Luego se suministró CH<sub>4</sub> a una concentración inicial de espacio de cabeza de  $195 \pm 6,8$  g/m<sup>3</sup> y las botellas se incubaron en un incubador (MaxQ 4000, Thermo Scientific, EE. UU.) a 25 °C y 200 rpm. Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza se midieron periódicamente.

Se hizo un enriquecimiento a tres temperaturas (25 °C, 30 °C y 37 °C) partiendo de 10 mL del preinóculo anterior y se hizo por duplicado para cada una de las temperaturas. Para dicho enriquecimiento se hicieron 5 ciclos de degradación de metano (en cada ciclo se introduce  $195 \pm 6,8$  g/m<sup>3</sup>).

El enriquecimiento completo tardó entre 27 y 45 días; todos los ciclos fueron monitoreados periódicamente hasta el consumo completo de CH<sub>4</sub>, sin sustitución del medio mineral entre ciclos.

### 3.3. Influencia de la temperatura en la biodegradación de CH<sub>4</sub> (en presencia de fósforo y sin fósforo)

Para evaluar la influencia de la temperatura en la degradación de metano en presencia de medio completo (MMS), En la preparación de los cultivos se usaron botellas de 1200 mL estériles cerradas con septum de butilo estanco para gases y tapas de rosca. Se añadió MMS hasta un volumen de 180 mL + 20 mL de inóculo del enriquecimiento previo a cada botella. El aire del espacio de cabezas de cada botella fue reemplazado por oxígeno durante 15 min y, posteriormente, parte de ese oxígeno reemplazado por CH<sub>4</sub> (para alcanzar 70% v/v de O<sub>2</sub> y 30% v/v de CH<sub>4</sub>). El crecimiento se ha realizado en incubadores a 25 °C, 30 °C y 37 °C, con una agitación de 200 rpm hasta que el CH<sub>4</sub> del espacio de cabezas se elimina por completo. Se realiza un primer ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> en botellas con MMS y con una concentración de CH<sub>4</sub> de 196,8 ± 9,8 g/m<sup>3</sup>, permitiendo acumular una cantidad de biomasa suficiente para arrancar el experimento.

Se hace un ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> en MMS con 36,75 g/L de concentración de biomasa y 196,8 ± 9,8 g/m<sup>3</sup> (30% v/v) de concentración de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabezas, para controlar la eliminación de CH<sub>4</sub> con las bacterias metanotróficas dispersas en un medio rico en fósforo.

Para estudiar la influencia de la temperatura en la degradación de metano en ausencia de fósforo, una vez se ha eliminado el CH<sub>4</sub> se centrifuga la biomasa durante 10 min a 10.000 rpm y se divide en dos botellas con 196,8 ± 9,8 g/m<sup>3</sup> (30% v/v) de concentración de CH<sub>4</sub> y 200 mL de MMS-P, y se realiza otro ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub>, esta vez, en ausencia de fósforo (Fig. 11).

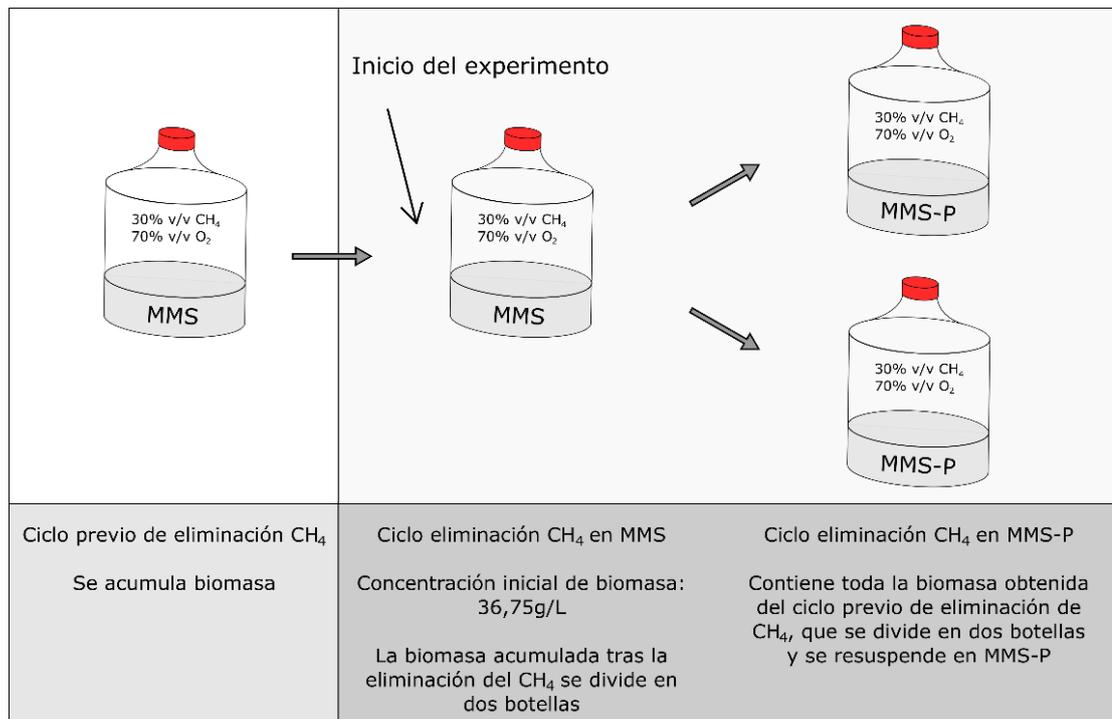


Fig. 11: Esquema de trabajo.

### 3.4. Influencia de la temperatura en la acumulación de PHAs (en presencia de fósforo y sin fósforo)

Para evaluar la influencia de la temperatura en la acumulación de PHAs en presencia de medio completo (MMS), se cogen muestras durante el ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> en MMS (**Fig. 11**) para el posterior análisis.

Para evaluar la influencia de la temperatura en la acumulación de PHAs en ausencia de fósforo, se cogen muestras durante el ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> en MMS-P (**Fig.11**) para su posterior análisis.

### 3.5. Métodos analíticos

#### 3.5.1. Curva de calibrado de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>

Se prepararon dos curvas de calibrado para conocer las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Se emplearon bulbos de 250 mL y 500 mL de capacidad. Las concentraciones utilizadas de CH<sub>4</sub> fueron:  $2,8 \pm 0,14$  g/m<sup>3</sup>,  $18,69 \pm 0,93$  g/m<sup>3</sup>,  $37,39 \pm 1,87$  g/m<sup>3</sup>,  $130,85 \pm 6,54$  g/m<sup>3</sup>,  $186,93 \pm 9,34$  g/m<sup>3</sup> y  $467,32 \pm 23,37$  g/m<sup>3</sup>.

Las concentraciones utilizadas de CO<sub>2</sub> fueron:  $3,31 \pm 0,17$  g/m<sup>3</sup>,  $22,34 \pm 1,12$  g/m<sup>3</sup>,  $43,96 \pm 2,20$  g/m<sup>3</sup>,  $151,85 \pm 7,59$  g/m<sup>3</sup>,  $216,42 \pm 10,82$  g/m<sup>3</sup>,  $540,37 \pm 27,02$  g/m<sup>3</sup>,  $1645,41 \pm 82,27$  g/m<sup>3</sup> y  $1831,77 \pm 91,59$  g/m<sup>3</sup>.

La concentración de gases se ha medido en un cromatógrafo de gases **Bruker 430 GC-TCD** (Palo Alto, EE.UU.) equipado con un 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) de columna. El resultado de las concentraciones de los gases se da en forma de área (**Fig. 12**).

#### 3.5.2. Monitorización de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>

La concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, se determina por medio de la inyección de la fase gas de la cabeza de la botella con una jeringa de gases a un cromatógrafo de gases **Bruker 430 GC-TCD** (Palo Alto, EE.UU.) equipado con un CP-Molsieve 5A (15m x 0.53 μm x 15 μm) y un CP-PoraBOND Q (25 m x 0,53 μm x 10 μm) de columna. 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 (**Fig. 12**).

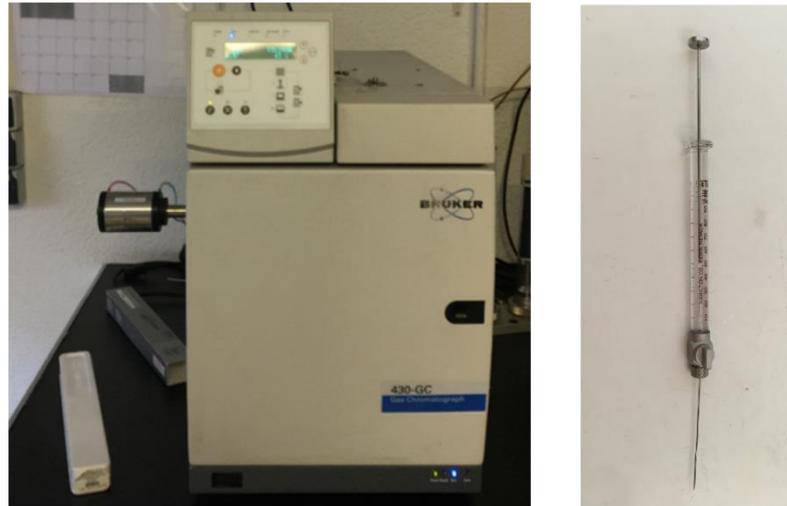
El algoritmo del programa del TCD devuelve los resultados en forma de área. El resultado de las concentraciones de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> se obtienen a través de la curva de calibrado.

Estos datos fueron utilizados en el experimento para estudiar la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> (mg CH<sub>4</sub>/g biomasa · h) y la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub>/g biomasa · h), La

manera de determinar estos parámetros es la representada en las siguientes fórmulas.

$$\text{Velocidad de producción CO}_2 = \frac{\left[ \frac{\text{CO}_2(\text{mg})}{\text{Biomasa (g)}} \right]_{\text{final}} - \left[ \frac{\text{CO}_2(\text{mg})}{\text{Biomasa (g)}} \right]_{\text{inicial}}}{\text{tiempo (h)}}$$

$$\text{Velocidad de eliminación CH}_4 = \frac{\left[ \frac{\text{CH}_4(\text{mg})}{\text{Biomasa (g)}} \right]_{\text{inicial}} - \left[ \frac{\text{CH}_4(\text{mg})}{\text{Biomasa (g)}} \right]_{\text{final}}}{\text{tiempo (h)}}$$



**Fig. 12:** Cromatógrafo de gases Bruker 430-GC, y jeringa utilizada.

### 3.5.3. Concentración de sólidos suspendidos totales (SST)

La concentración de biomasa se determinó como sólidos suspendidos totales (SST) de acuerdo con los métodos estándar <sup>55</sup>. A modo resumen:

Los sólidos se han separado de la fase líquida a través de filtros de membrana y utilizando una bomba de vacío que se conecta a un matraz kitasato (**Fig. 13**). Los filtros se han secado a 101 °C durante 24 h antes de ser pesados. La medida de SST se ha hecho por triplicado.



**Fig. 13:** Material utilizado en la extracción de SST.

Como el peso de los filtros que indica el fabricante es orientativo, se ha pesado cada filtro individualmente antes de ser utilizado para el cálculo de SST. Se ha tenido en cuenta la humedad relativa de cada filtro.

La balanza utilizada tiene una precisión de  $10^{-4}$  mg.

#### 3.5.4. Análisis de PHAs

Para el análisis de PHAs intracelulares se toman 2 mL de muestra de caldo de cultivo, las cuales se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm, procesándose posteriormente según López y col. (2016).

El análisis de muestras se realiza a través de un **GC-7820A** unido a un **MSD-5977E** (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.), equipado con una columna de DB-WAX (30 m × 250  $\mu$ m × 0.25  $\mu$ m). Las temperaturas del detector y del inyector se mantuvieron a 250 °C (Fig. 14). La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 40 °C durante 5 minutos, posteriormente se aumentó a razón de 10 °C/min hasta alcanzar 200 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 2 min. Finalmente, la temperatura del horno se incrementó hasta 24 °C a una velocidad de 5 °C/min.

El contenido de PHA (% en masa, gPHA / gSST) de las muestras son referidos a la concentración inicial de biomasa de la muestra.



Fig. 14: GC-7820A unido a MSD-5977E

#### 3.5.5. Análisis CHNS (Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno, Azufre)

El análisis CHNS se ha realizado sobre la biomasa resultante cuando termina la oxidación de CH<sub>4</sub> al final de cada experimento. Este análisis se realiza en la Unidad de Microanálisis Elemental (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid.

Previamente al envío de muestras a los laboratorios de CAI, hemos centrifugado la biomasa a 5.500 rpm durante 5 min, se ha secado el *pellet* en estufa a 46 °C y se ha triturado en mortero.

La técnica de microanálisis elemental por combustión determina el contenido en peso de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. El laboratorio realiza los ensayos con microanalizadores elementales LECO CHNS-932, siguiendo el procedimiento normalizado de trabajo interno PNT01. El procedimiento es aplicable a muestras homogéneas, sólidas, líquidas no volátiles y viscosas, que experimenten combustión a 970 °C o a menor temperatura.

El resultado obtenido, se da en % en masa de cada uno de los elementos en la biomasa final.

### 3.5.6. Análisis de biología molecular

Para el análisis de las muestras para biología molecular, se congelan 10 mL del caldo de cultivos a -80°C. El análisis de biología molecular se va a realizar en las muestras correspondientes a los ciclos de eliminación de CH<sub>4</sub> con MMS y MMS-P.

Para la extracción de RNA se ha utilizado el kit *Mini kit RNeasy Plus* (QIAGEN). Se parte de la biomasa acumulada en 8 mL de la muestra y se siguen las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se realiza la síntesis del cDNA con el kit *iScript™ Adv cDNA Kit for RT-qPCR* (BIO-RAD), siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración de DNA se estima con un espectrofotómetro *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). El cDNA extraído se mantiene hasta su posterior análisis de pirosecuenciación.

Este análisis de pirosecuenciación fue realizado por la Fundación para la Promoción de la Salud e Investigación Biomédica de la Comunidad Valenciana, FISABIO (España).

A modo resumen de como se ha realizado la pirosecuenciación:

La secuenciación se hace sobre las regiones V3 y V4 del gen 16S con los primers SD-Bact-0341-bS-17 y SD-Bact-0785-a-A-21, de acuerdo con Klindworth et al., 2013<sup>56</sup>. Se añade a estas secuencias un adaptador para el secuenciador Illumina, dando como resultado los siguientes primers para el análisis:

- Forward:  
5´TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWG  
CAG
- Reverse:  
5´GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTAT  
CTAATCC

Para preparar las librerías se usa el Kit ADN Nextera XT (Illumina, San Diego, CA). La librería PhiX (Illumina, San Diego, CA) se usó como control de rendimiento. Se hace una secuenciación MiSeq con una lectura de 2x300 bp.

Sólo se tienen en cuenta aquellas lecturas con valores de calidad de  $\geq 20$ . Todas las secuencias que tienen bases ambiguas fueron descartadas. La evaluación de la calidad se realizó con el programa prinseq-lite <sup>57</sup>. Las secuencias se unieron con el programa fastq-join <sup>58</sup>. Se descartan aquellas secuencias que puedan ser quimeras con el programa usearch <sup>59</sup>. Para el análisis taxonómico se utiliza la clasificación RDP (Ribosomal DataBase Project) <sup>60</sup> <sup>61</sup> que está disponible en el sitio web <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/>.

Para calcular el índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) se utilizó la versión 2.3e1 de la librería Vegan <sup>62</sup>, a partir de la siguiente expresión <sup>63</sup>:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2(p_i)$$

S - N° de especies  
 $p_i$  - abundancia relativa de la especie i:  $\frac{n_i}{N}$   
 $n_i$  - N° de individuos de la especie i  
N - N° total de individuos de todas las especies

Para representar abundancias relativas se trabaja con la herramienta de Krona <sup>64</sup>.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

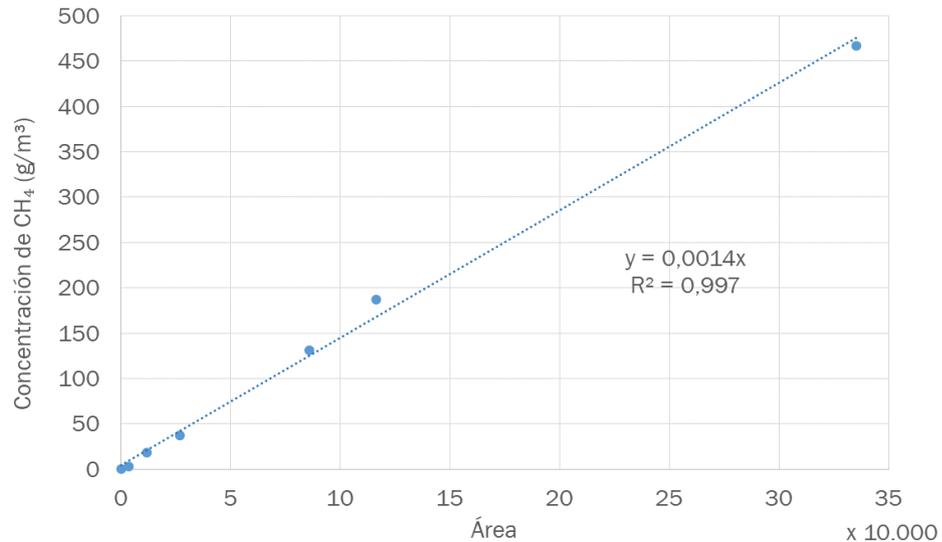


#### 4.1. Curva de calibrado

En esta parte de la investigación se determinó la curva que relaciona la concentración de los gases  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  en función del área obtenida en el cromatógrafo de gases TCD, según la expresión:

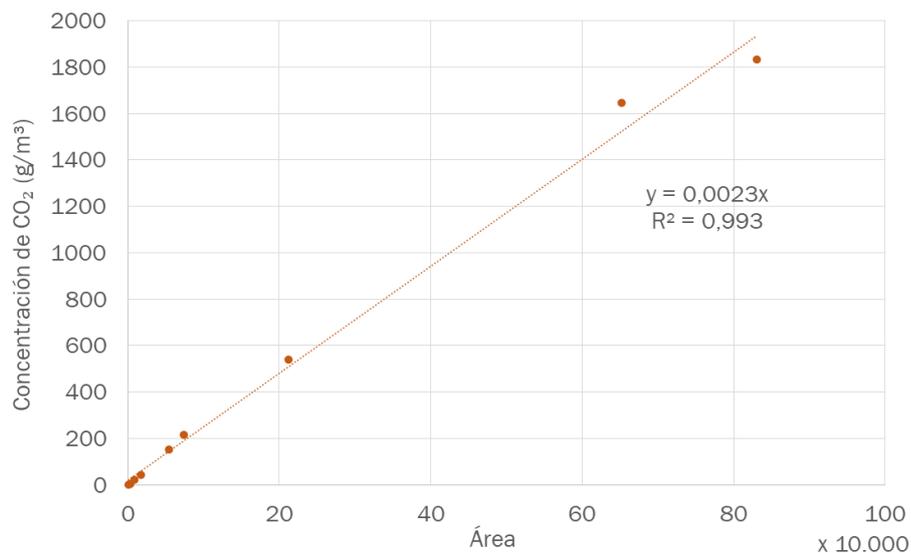
$$\text{Concentración (g/m}^3\text{)} = \text{Pendiente} \cdot \text{Área} \quad \rightarrow \quad y = \text{PTE} \cdot x$$

##### 4.1.1. $\text{CH}_4$



**Fig. 15:** Concentración de  $\text{CH}_4$  frente al área en el TCD.

##### 4.1.2. $\text{CO}_2$



**Fig. 16:** Concentración de  $\text{CO}_2$  frente al área en el TCD.

## 4.2. Influencia de la temperatura en la degradación de CH<sub>4</sub> en MMS

### 4.2.1. Inóculo de *Sphagnum*

En las botellas con MMS con el inóculo de *Sphagnum* se completó el ciclo completo de eliminación de CH<sub>4</sub> en un plazo de 72h - 120h. Las concentraciones de partida y finales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en las botellas fueron las siguientes (**Tabla 1**):

	CH <sub>4</sub> (g/m <sup>3</sup> )		CO <sub>2</sub> (g/m <sup>3</sup> )	
	Inicial	Final	Inicial	Final
25 °C	190,29	4,1	5,93	221,93
30 °C	174,72	2,13	2,5	260,88
37 °C	173,78	9,29	7,22	257,6

**Tabla 1:** Concentraciones iniciales y finales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en los ensayos con *Sphagnum* en MMS.

### 4.2.2. Inóculo de *Sphagnum*+Iodo

En las botellas con MMS con el inóculo de *Sphagnum*+Iodo se completó el ciclo completo de eliminación de CH<sub>4</sub> en un plazo de 48h - 120h. Las concentraciones de partida y finales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en las botellas fueron las siguientes (**Tabla 2**):

	CH <sub>4</sub> (g/m <sup>3</sup> )		CO <sub>2</sub> (g/m <sup>3</sup> )	
	Inicial	Final	Inicial	Final
25 °C	172,93	0,17	10,36	232,55
30 °C	174,15	1,19	2,86	233,58
37 °C	169,3	2,14	6,82	268,83

**Tabla 2:** Concentraciones iniciales y finales de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en los ciclos con *Sp.*+Iodo en MMS.

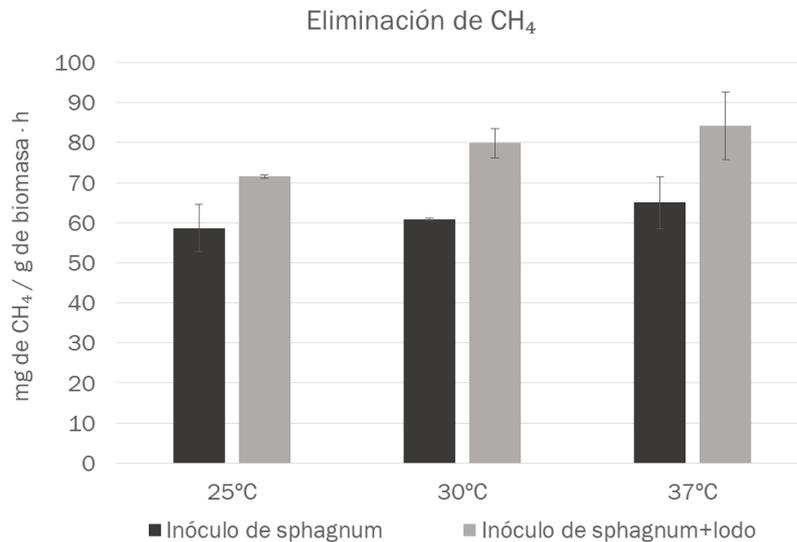
### 4.2.3. Velocidad de eliminación de CH<sub>4</sub>

En cada uno de los inóculos las velocidades de eliminación de CH<sub>4</sub> en función de la biomasa acumulada y el tiempo fueron similares, no observándose un efecto significativo de la temperatura en ninguno de los parámetros.

Es importante destacar que la evolución de la concentración de gases en el espacio de cabezas se presenta en unidades de eliminación específica porque se partió de una cantidad diferente de biomasa en cada ciclo.

Así, con el inóculo de *Sp.* a una temperatura de 25 °C se obtuvo una velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> de  $58,7 \pm 5,9$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h; a 30 °C de  $60,8 \pm 0,3$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h y a 37 °C de  $65,1 \pm 6,5$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h.

Mientras, las velocidades obtenidas con el inóculo de *Sp.+lodo* fueron de  $71,6 \pm 0,4$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h a 25 °C,  $79,9 \pm 3,6$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h a 30 °C y de  $84,3 \pm 8,4$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h a 37 °C (**Fig. 17**).



**Fig. 17:** Comparativa de la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> con inóculos de *Sp.* y *Sp.+lodo*.

Tanto el inóculo de *Sp.* como el inóculo de *Sp.+lodo* presentan velocidades similares de eliminación específica de CH<sub>4</sub> a las tres temperaturas, aunque se aprecia un aumento de la velocidad de eliminación específica cuanto mayor es la temperatura. Sin embargo, el inóculo empleado tiene un mayor efecto sobre este parámetro, aumentando la capacidad de eliminación de CH<sub>4</sub> en aproximadamente un 27,7 % cuando el inóculo es el de *Sp.+lodo* con respecto al inóculo de *Sp.*

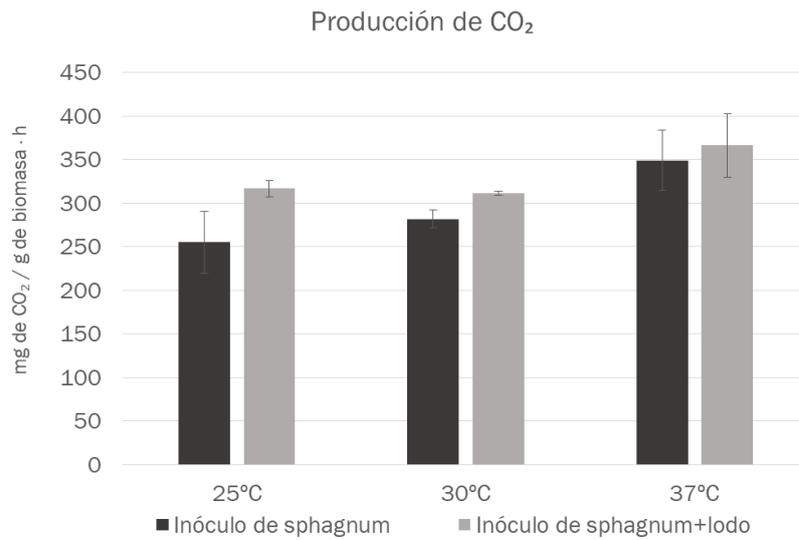
Estos resultados concuerdan con las investigaciones de Mohanty et al. (2007) <sup>65</sup> donde la temperatura óptima de degradación de CH<sub>4</sub> se encuentra entre 25 °C – 35 °C, y la velocidad de degradación no presenta diferencias significativas en dicho intervalo.

#### 4.2.4. Velocidad de producción de CO<sub>2</sub>

La velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> en función de la biomasa acumulada y el tiempo también fue similar para cada inóculo, aunque se observan diferencias significativas en este parámetro con el inóculo de *Sp.*

Así, con el inóculo de *Sp.* los valores obtenidos fueron de  $255,2 \pm 25,5$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 25 °C;  $281,6 \pm 10,2$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 30 °C y  $349,1 \pm 34,9$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 37 °C.

Con el inóculo de *Sp.+lodo* se obtuvieron valores de  $316,6 \pm 9,4$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 25 °C,  $311,3 \pm 2,1$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 30 °C y de  $366,2 \pm 36,6$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 37 °C (**Fig. 18**).

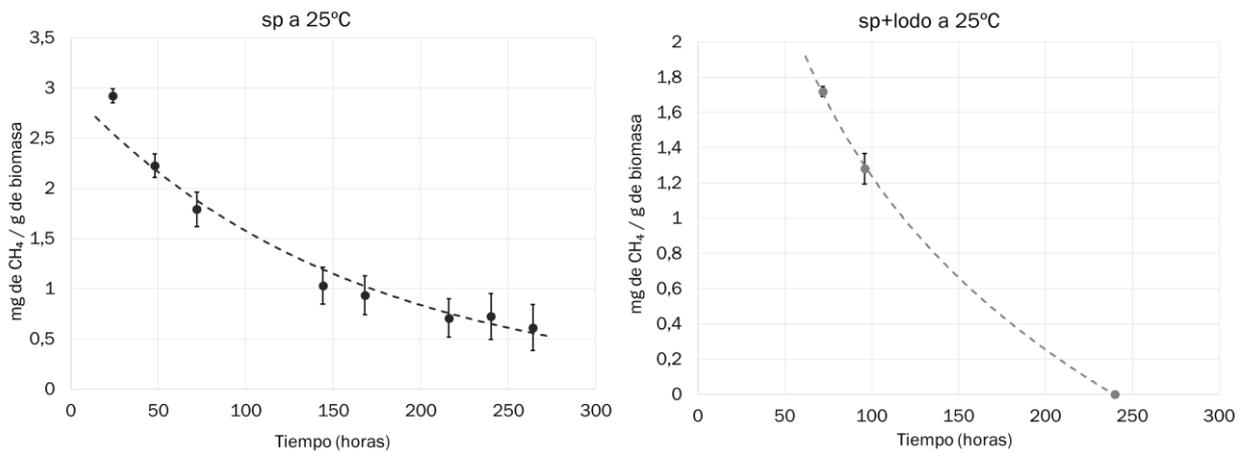


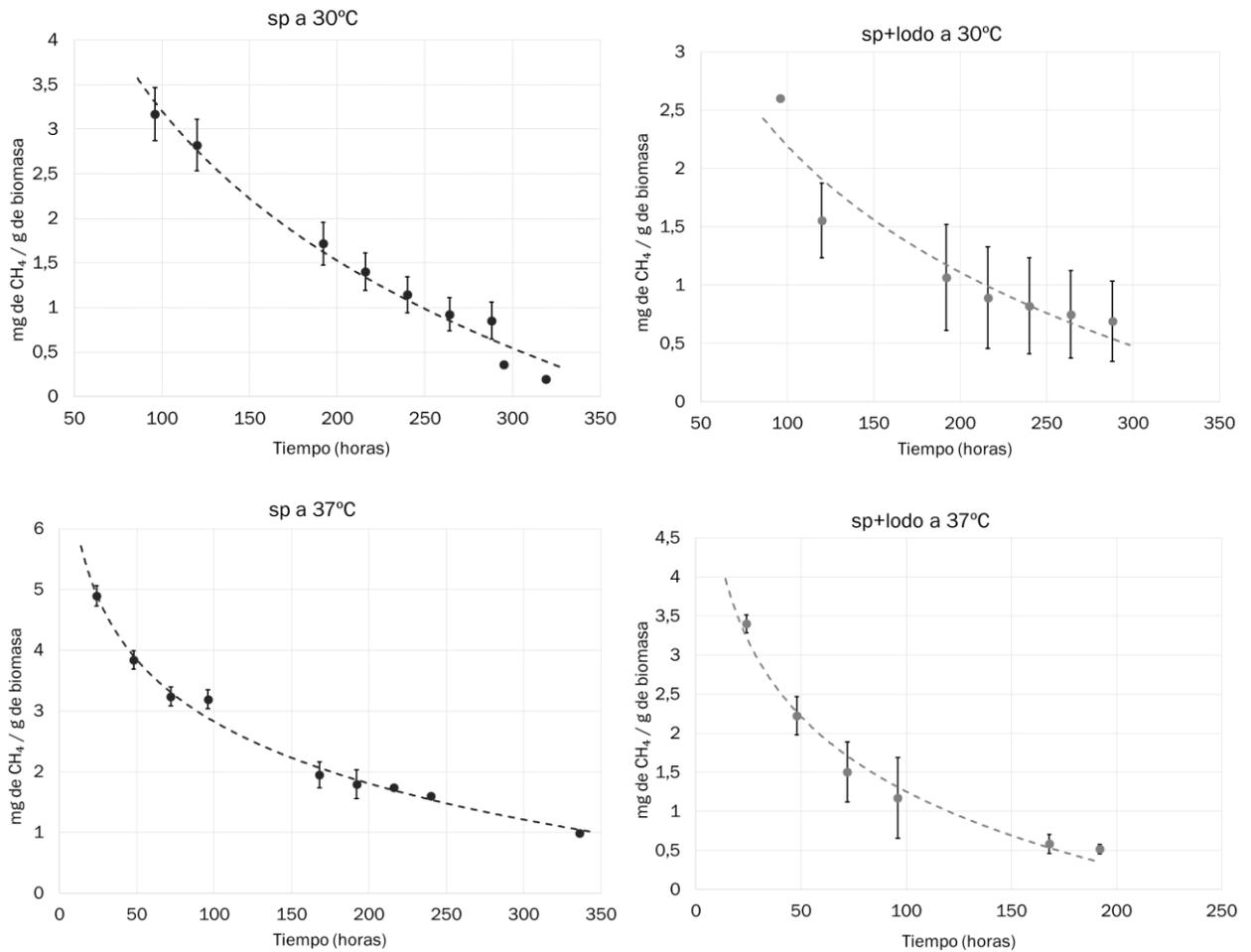
**Fig. 18:** Comparativa de la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> con inóculos de Sp. y Sp.+lodo.

Al igual que ocurriría con la eliminación de CH<sub>4</sub>, se aprecia una ligera tendencia ascendente en la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> con el aumento de temperatura, si bien no se observa una diferencia tan significativa entre los dos inóculos empleados. En este caso, la producción de CO<sub>2</sub> es aproximadamente un 12,2% superior en el inóculo de Sp.+lodo.

#### 4.3. Influencia de la temperatura en la degradación de CH<sub>4</sub> en MMS-P (limitación de fósforo)

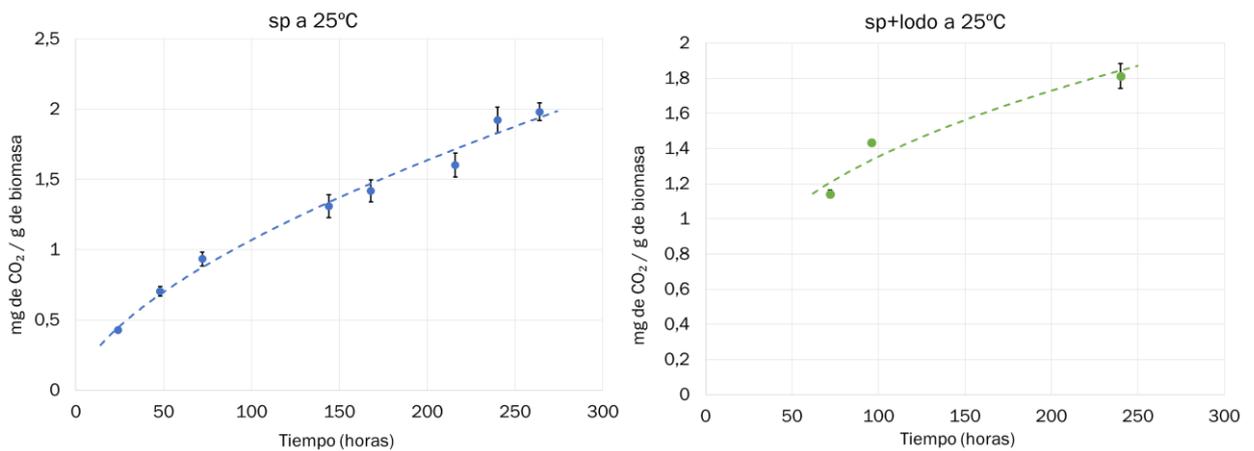
En este apartado se va a estudiar la influencia de la temperatura en la degradación de CH<sub>4</sub> en un medio con limitación de fósforo. La Fig. 19 representa las curvas de eliminación de CH<sub>4</sub> en función de la biomasa acumulada y la temperatura:

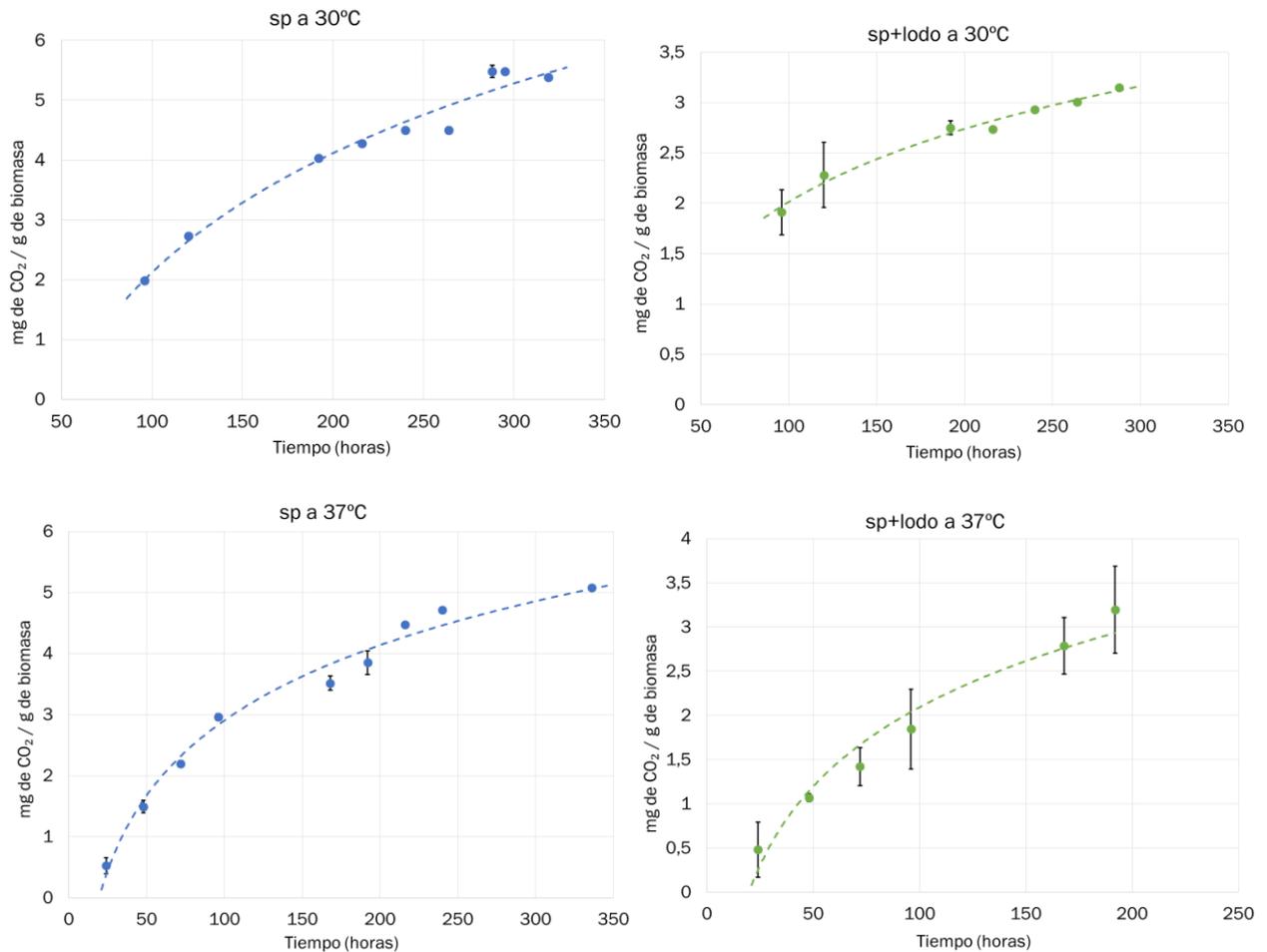




**Fig. 19:** Evolución temporal de la concentración de  $\text{CH}_4$  en el espacio de cabezas en ausencia de fósforo a diferentes temperaturas.

La Fig. 20 representa las curvas de producción de  $\text{CO}_2$  en función de la biomasa acumulada y la temperatura:





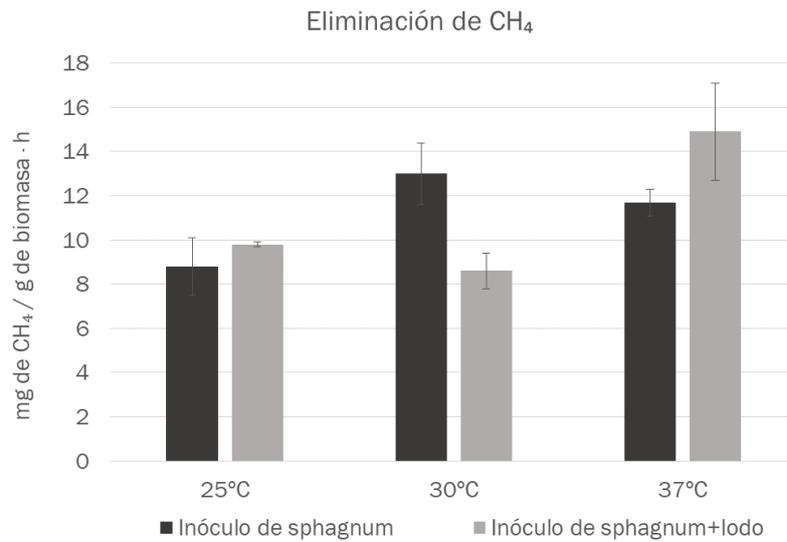
**Fig. 20:** Evolución temporal de la concentración de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabezas en ausencia de fósforo a diferentes temperaturas.

#### 4.3.1. Velocidad de eliminación de CH<sub>4</sub>

En condiciones de MMS-P y con el inóculo de *Sphagnum*, la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> ha sido de  $8,8 \pm 1,3$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h,  $13,0 \pm 1,4$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h y  $11,7 \pm 0,6$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h a 25 °C, 30 °C y 37 °C, respectivamente.

Con el inóculo de *Sp.+lodo* la velocidad obtenida fue de  $9,8 \pm 0,1$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h,  $8,6 \pm 0,8$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h y  $14,9 \pm 2,2$  mg CH<sub>4</sub> / g biomasa · h a 25 °C, 30 °C y 37 °C, respectivamente.

En el caso del inóculo de *Sphagnum* no se observa una tendencia clara de la velocidad en función de la temperatura. No obstante, en el caso del inóculo de *Sp.+lodo*, sí que se parece que la velocidad aumenta de forma significativa a 37 °C con respecto a las velocidades a 25 °C y 30 °C (Fig. 21).

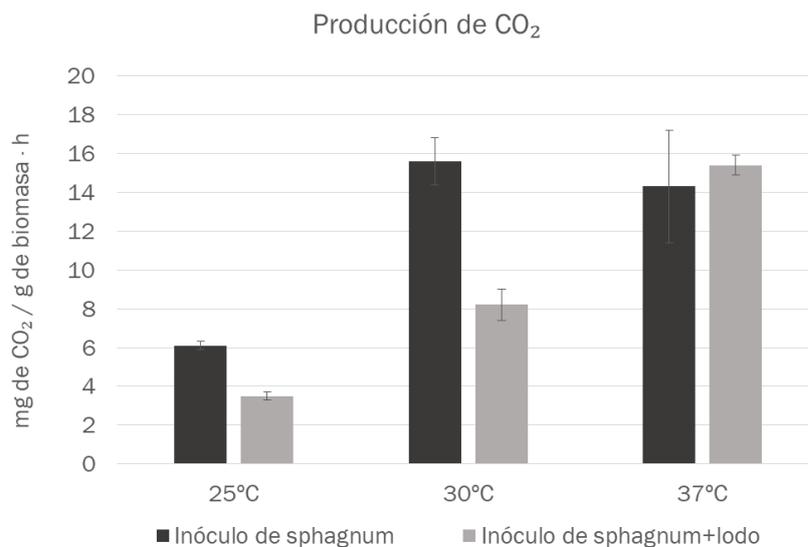


**Fig. 21:** Comparativa de la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> con inóculos de Sp. y Sp.+lodo a diferentes temperaturas

#### 4.3.2. Velocidad de producción de CO<sub>2</sub>

Con respecto a la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub>, con el inóculo de *Sphagnum* se obtuvieron valores de  $6,1 \pm 0,2$  mg CO<sub>2</sub> / mg biomasa · h,  $15,6 \pm 1,2$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h y  $14,3 \pm 2,9$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 25 °C, 30 °C y 37 °C, respectivamente.

Por otro lado, para el inóculo de *Sp.+lodo*, la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> a dichas temperaturas ha sido de  $3,5 \pm 0,2$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h,  $8,2 \pm 0,8$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h y  $15,4 \pm 0,5$  mg CO<sub>2</sub> / g biomasa · h a 25 °C, 30 °C y 37 °C, respectivamente (Fig. 22).

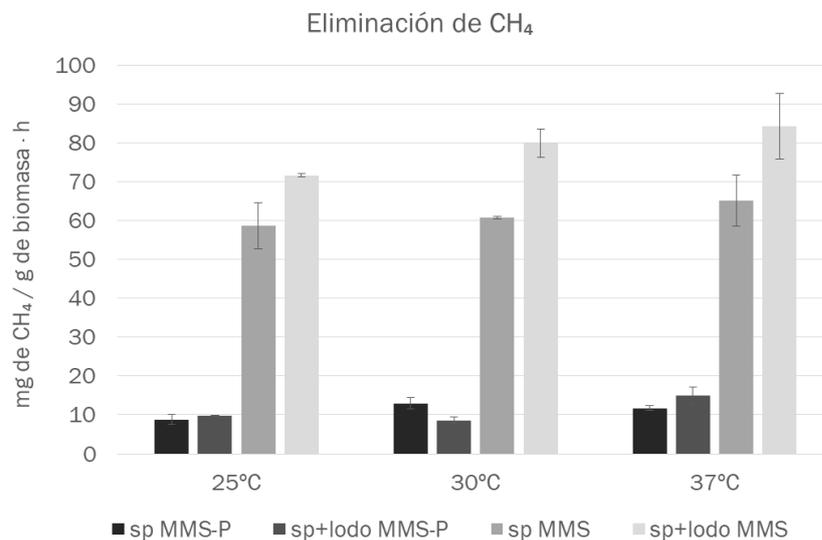


**Fig. 22:** Comparativa de velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> con inóculos de Sp. y Sp.+lodo a diferentes temperaturas

Mientras que la producción de  $\text{CO}_2$  aumenta de 25 a 30 °C en un 256 % para el inóculo de *Sp.*, no se observa diferencia significativa entre 30 °C y 37 °C. En el caso del inóculo de *Sp.+lodo*, la producción de  $\text{CO}_2$  aumenta gradualmente con la temperatura en todo el intervalo.

#### 4.3.3. Comparativa entre condiciones de MMS y MMS-P

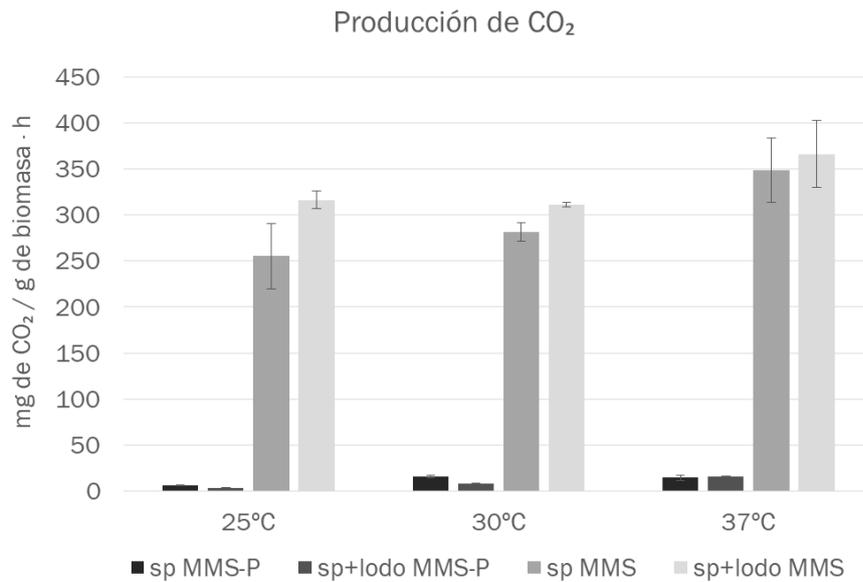
Si ahora comparamos la eliminación de  $\text{CH}_4$  en presencia y ausencia de fósforo a diferentes temperaturas y para ambos inóculos se observan que, en promedio, la velocidad de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  de los inóculos en MMS-P se reduce un 84,11% con respecto a la eliminación en MMS (Fig. 23).



**Fig. 23:** Comparativa de las velocidades de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  en MMS y MMS-P para ambos inóculos a diferentes temperaturas.

Análogamente, la comparación entre velocidades de producción específica de  $\text{CO}_2$  en presencia y ausencia de fósforo presenta diferencias aún más amplias, reduciéndose hasta un 96,64% con dicha limitación (Fig. 24).

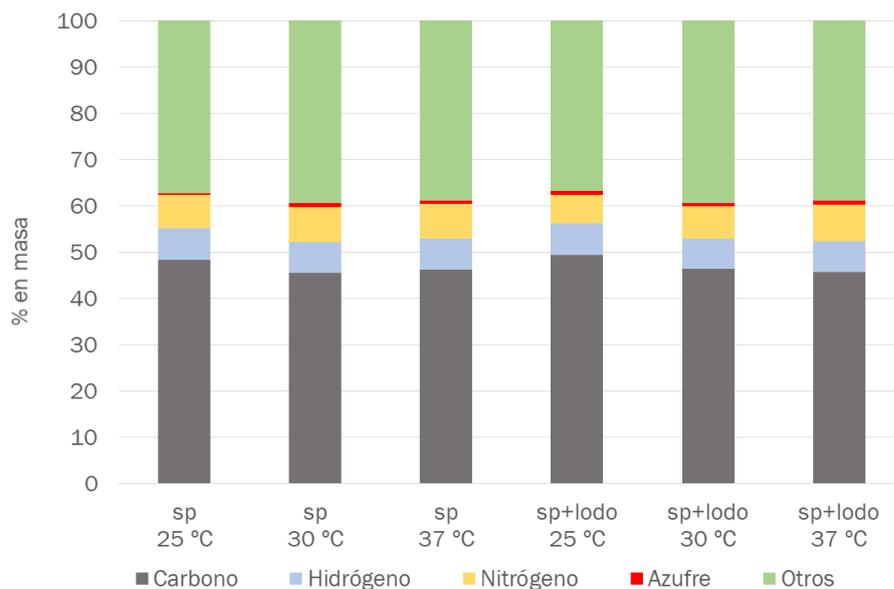
La información bibliográfica sobre la influencia de la limitación de fósforo en MMS para eliminar metano es escasa, pero la limitación de nutrientes afecta al crecimiento de organismos y a la actividad microbológica, reduciéndose significativamente. Por ello, se puede concluir que la diferencia existente entre la velocidad de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  y la velocidad de producción específica de  $\text{CO}_2$  con el medio rico en fósforo y con dicha limitación es significativa.



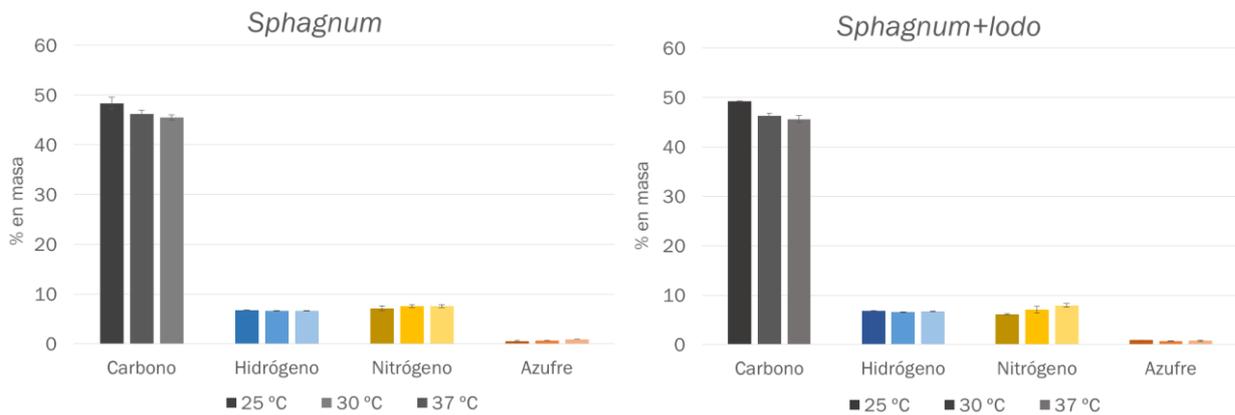
**Fig. 24:** Comparativa de la velocidad de producción específica de CO<sub>2</sub> en MMS y MMS-P para ambos inóculos y a diferentes temperaturas.

#### 4.4. Análisis CHNS

En este apartado se analiza la cantidad de Carbono (C), Hidrógeno (H), Nitrógeno (N) y Azufre (S) en la composición de la biomasa acumulada en los ciclos de eliminación de CH<sub>4</sub>, para ver si existe alguna diferencia significativa entre las diferentes condiciones cuando el medio carece de fósforo. La composición (% masa) se muestra en las **Fig. 25 y 26**:



**Fig. 25:** Composición de la biomasa acumulada en MMS-P para los inóculos de Sp. y Sp.+lodo a diferentes temperaturas.



**Fig. 26:** Comparativa de la composición de C, H, N y S por temperatura en cada inóculo en MMS-P

La biomasa acumulada no presenta diferencias significativas en la composición comparando los diferentes inóculos, pero si se aprecian variaciones en función de la temperatura.

En condiciones de inóculo de *Sp.+Iodo*, se aprecia que la concentración de C disminuye cuando aumenta la temperatura, mientras ocurre lo contrario con la concentración de N. a 25 °C, 30 °C y 37 °C, la fracción másica de C es de  $49,27 \pm 0,89$  %,  $46,28 \pm 0,71$  % y  $45,63 \pm 0,78$  %, respectivamente, siendo la de N es de  $6,14 \pm 0,07$  %,  $7,07 \pm 0,10$  % y  $7,9 \pm 0,03$  % a 25, 30 y 37 °C, respectivamente.

En condiciones de inóculo de *Sp.*, la tendencia es similar en la fracción másica de C, que es de  $48,33 \pm 1,18$  %,  $46,21 \pm 0,54$  % y  $45,45 \pm 0,89$  % a 25 °C, 30 °C y 37 °C. Sin embargo, no se aprecia una diferencia significativa en la concentración de N:  $7,145 \pm 0,03$  % a 25 °C,  $7,56 \pm 0,05$  % a 30 °C y  $7,58 \pm 0,03$  % a 37 °C.

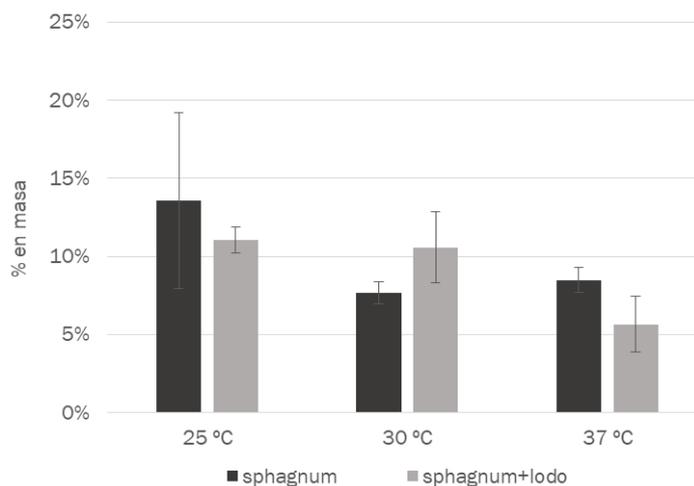
#### 4.5. Acumulación de PHAs

Durante los ciclos de eliminación de CH<sub>4</sub> en MMS con los inóculos de *Sp.* y *Sp.+Iodo*, la cantidad de bioplástico acumulado ha sido despreciable (<1%). Por el contrario, se han detectado acumulaciones de PHAs en los ensayos realizados con MMS-P. En estos casos, prácticamente la totalidad de PHAs acumulados durante la eliminación de CH<sub>4</sub> y el crecimiento de metanótrofos corresponden a PHBs. La acumulación de PHBs durante el crecimiento de los metanótrofos aumenta progresivamente durante el ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> hasta estabilizarse en los siguientes valores (**Tabla 3**):

	Muestra 1	Muestra 2	Media
25 °C - Sp	6,8% ± 0,4%	17,0% ± 0,6%	13,6% ± 5,6%
30 °C - Sp	7,5% ± 1,0%	7,9% ± 0,0%	7,7% ± 0,7%
37 °C - Sp	8,5% ± 0,1%	8,5% ± 1,4%	8,5% ± 0,8%
25 °C - Sp+lodo	10,7% ± 0,0%	11,9% ± 0,0%	11,0% ± 0,8%
30 °C - Sp+lodo	11,4% ± 2,0%	8,1% ± 0,3%	10,6% ± 2,3%
37 °C - Sp+lodo	6,7% ± 0,4%	3,6% ± 0,0%	5,7% ± 1,8%

**Tabla 3:** Acumulación de PHBs durante el ciclo de eliminación de CH<sub>4</sub> en MMS-P.

Las mayores acumulaciones de PHAs se obtuvieron con el inóculo de *Sphagnum* y a una temperatura de 25 °C, alcanzando valores de 13,56 %. La comparativa entre los valores obtenidos se muestra en la Fig. 27.



**Gráfica 27:** Acumulación de PHBs por inóculo y temperatura.

También se ha cuantificado la cantidad de PHV presente en la biomasa, siendo la mayor acumulación del 0,032 % en las mismas condiciones que la mayor acumulación de PHBs (Sp. a 25 °C). Esta cantidad se ha considerado despreciable, ya que el ratio PHVs / PHBs supone un valor inferior a 0,0005.

En el estudio previo de acumulación de biopolímeros de Wen et al. (2010)<sup>66</sup> que utilizó como inóculo el lodo seco obtenido del tanque de sedimentación secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales de cervecería en Harbin, China. se redujo progresivamente la cantidad de fósforo, llegando a acumular un 34,7 % de PHBs en las condiciones de 750 g carbono/g fósforo (condiciones de mayor limitación), en comparación con un 5 % de acumulación sin limitación de nutrientes. Dicho estudio también muestra que el ratio PHBs/PHAs es más alto cuanto mayor es la limitación de fósforo (alcanzando un valor de 0,99), siendo esta condición especialmente crítica en la acumulación de PHBs distintos de PHAs (en condiciones de limitación de Nitrógeno, el máximo ratio observado es de 0,92).

De forma similar, Chinwetkitvanich et al. (2004) <sup>67</sup>, utilizaron cultivos puros adaptados para lodos (caracterizados en Du et al., 2001 <sup>68</sup>), partiendo de un inóculo a partir del lodo activado recogido de los sistemas de planta piloto de Lodo Activado de Película Fija Integrada (IFAS) operado por Sriwiriyarat (2002) <sup>69</sup>. En reactores por lotes, en condiciones aerobias y con limitación de fósforo, se alcanzó una acumulación máxima de PHAs del 52 % a 10 °C, por encima de la acumulación observada a 20 °C y 30 °C. Esta cantidad de bioplásticos fue obtenida en un proceso lento, donde los picos de acumulación se encuentran a los 22, 48 y 35 días (para las temperaturas de 10 °C, 20 °C y 30 °C, respectivamente) de degradación de CH<sub>4</sub> en condiciones de limitación de fósforo.

En este caso, el MMS que se ha utilizado (medio modificado de Whittenbury <sup>54</sup>) es especialmente rico en nitrato y fosfato. Mientras que los estudios con limitación de fósforo son reducidos, existen multitud de experimentos de acumulación de biopolímeros con limitación de otros nutrientes en condiciones similares.

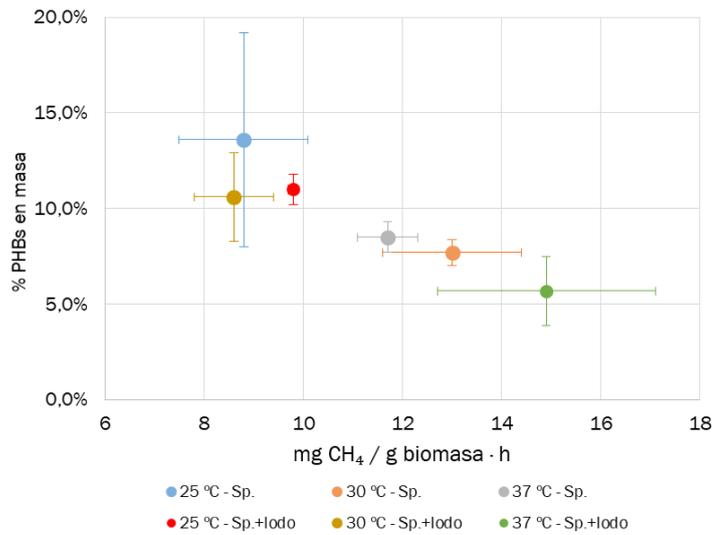
Mokhtari-Hosseni et al. (2009) <sup>70</sup> utilizaron un medio rico en manganeso (Mn), potasio (K), y nitrógeno (N). Este MMS fue utilizado por García-Pérez y col. (2017) <sup>71</sup>. Se utilizó un inóculo de *Methylocystis hirsuta* y una emisión de aire contaminada con un 4 % en volumen de CH<sub>4</sub> como fuente de carbono, alcanzando una acumulación de PHBs del 7,8 ± 1,0 %. La limitación de Mn exhibió un contenido similar al inicial (8,1 ± 1,1 %), la limitación de K indujo a un pequeño aumento (12,5 ± 1,1 %) y la limitación de N conllevó la acumulación más alta (28,0 ± 1,2 %).

Con el medio de Wendland et al. (2001) <sup>72</sup>, Helm et al., (2008) <sup>46</sup>, a partir de la comunidad microbiana caracterizada por Wendtland et al. (1996) <sup>73</sup> y utilizando metano (25 % v/v) como fuente de carbono, obtuvieron una acumulación del 32,6 ± 2,0 % con limitación de azufre y del 33,6 ± 0,3 % con limitación de potasio.

#### 4.6. Condiciones óptimas de operación

En este apartado se estudia qué condición/es favorecen simultáneamente la eliminación de CH<sub>4</sub>, el crecimiento de las bacterias metanotróficas y la acumulación de bioplásticos PHBs en condiciones de limitación de fósforo.

En la **Fig. 28** se compara la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> con la acumulación de PHBs, en la cual se observa que existe una relación inversa entre estos parámetros. A partir de estos resultados, no se puede establecer una condición que favorezca simultáneamente la eliminación de CH<sub>4</sub> y la acumulación de bioplásticos. La condición de inóculo de *Sphagnum* a 25 °C será la óptima para acumular PHBs y la condición de inóculo de *Sphagnum+lodo* será la más adecuada si se desea acelerar la eliminación de CH<sub>4</sub>.

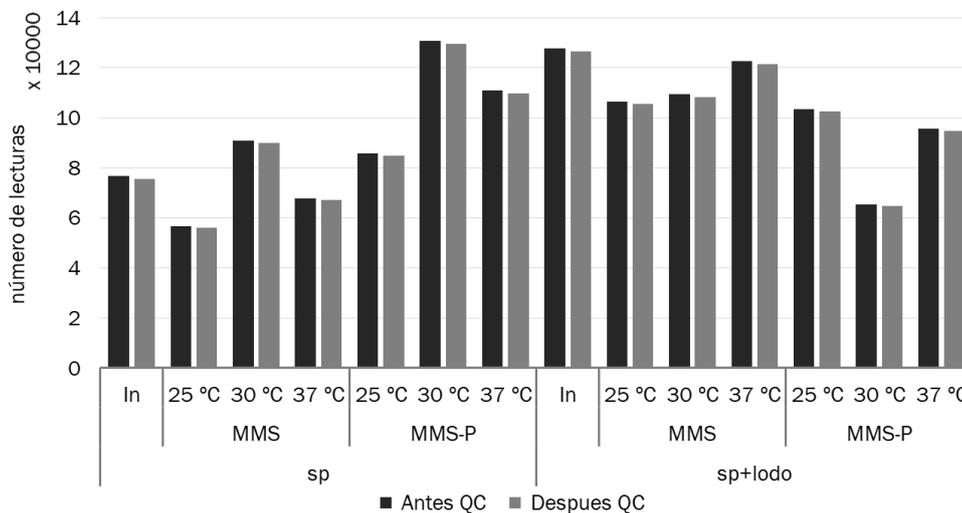


**Gráfica 28:** Fracción másica de PHBs frente a la velocidad de eliminación específica de CH<sub>4</sub> por cada inóculo y temperatura.

#### 4.7. Análisis de biología molecular

##### 4.7.1. Informe de datos por muestra

El número de lecturas que se realizaron por muestra, así como las que superaron el control de calidad se representan en la Fig. 29. En promedio, un 98,94 % de las muestras pasaron el control de calidad (QC).

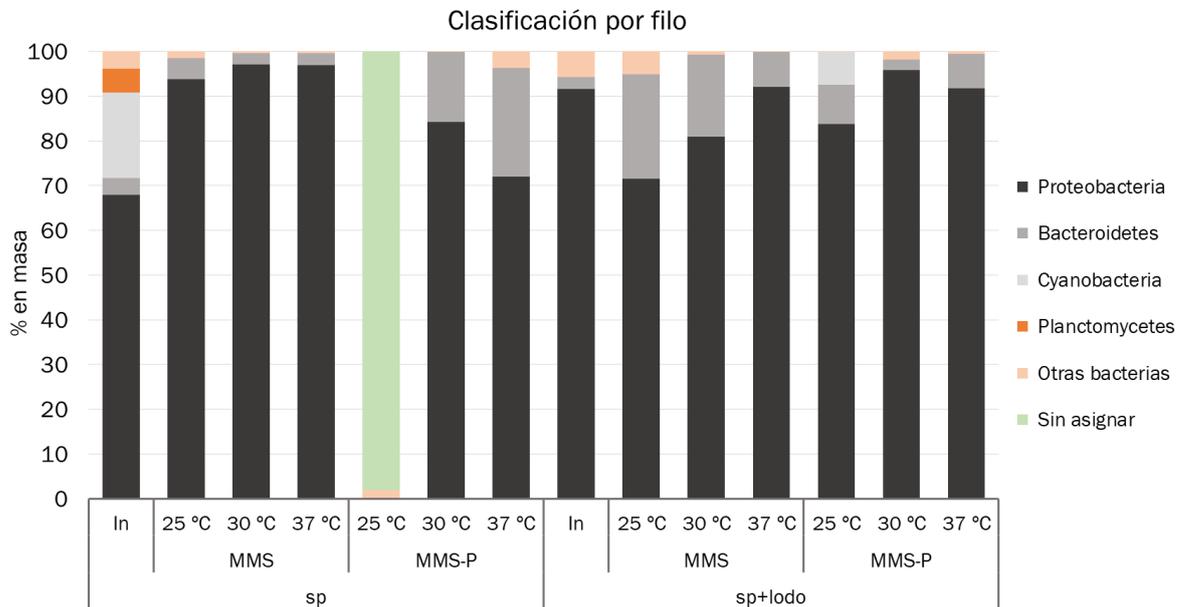


**Gráfica 29:** Número de lecturas antes y después del control de calidad. In corresponde a la muestra de inóculo simple.

##### 4.7.2. Análisis taxonómico

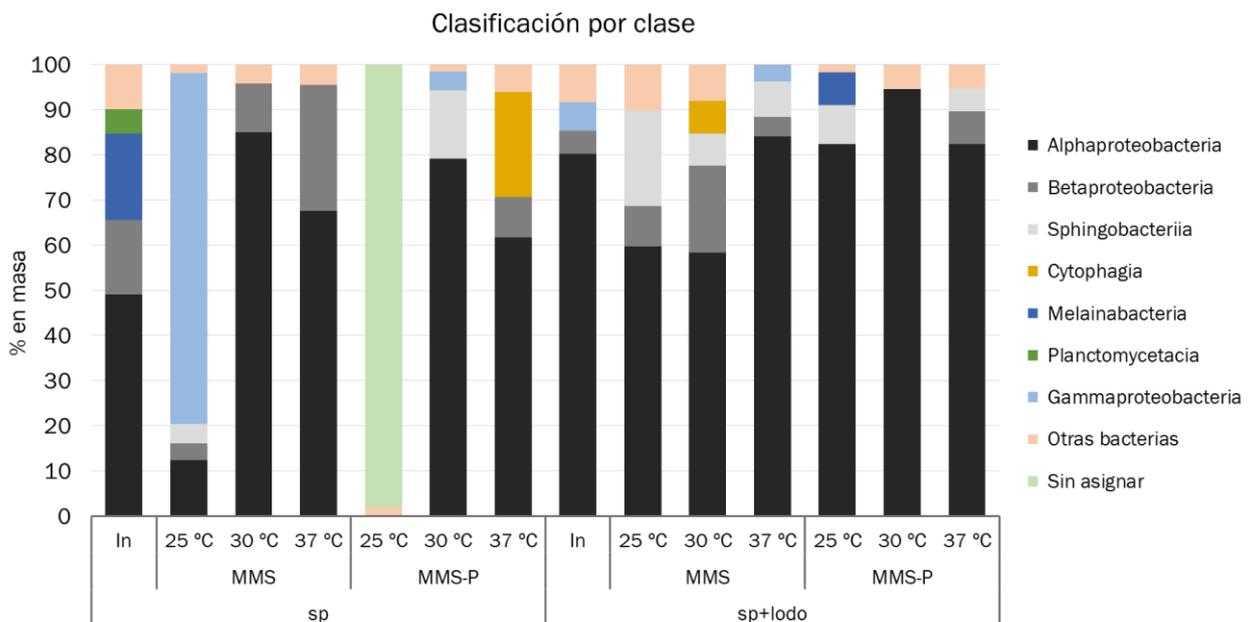
Se realiza un análisis taxonómico por filo (Fig. 30), clase (Fig. 31) y género (Fig. 32) sobre las bacterias presentes en la biomasa acumulada tras los ciclos de eliminación de CH<sub>4</sub>. Se observa un error de medida en la muestra de *Sphagnum* en MMS-P a 25 °C, que se está volviendo a analizar.

Se han observado 4 filos, de los cuales el predominante ha sido el *Proteobacteria*, presente en todas las muestras por encima del 67 % de concentración en masa (Fig 30).



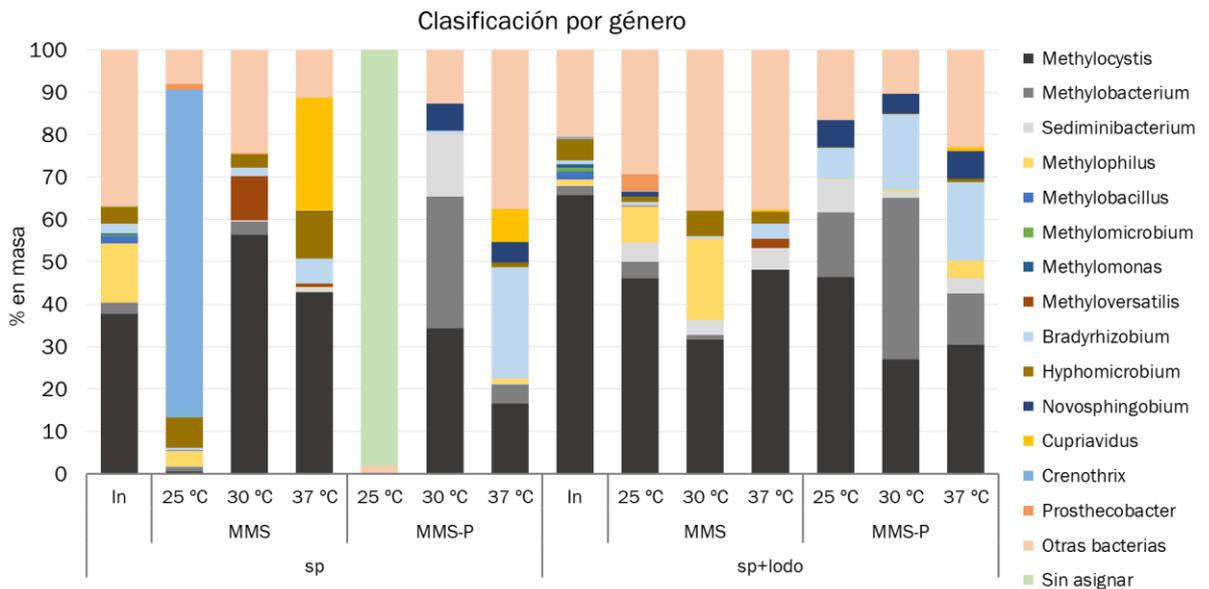
Gráfica 30: Clasificación por filo.

Se han observado 7 clases presentes de forma notable en la composición de las muestras. Entre ellas, destacan *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, y *Gammaproteobacteria* (pertenecientes al filo *Proteobacteria*). No se han tenido en cuenta aquellas clases que se encontraban presentes en una fracción másica inferior al 1 % en ninguna de las muestras (Fig. 31).



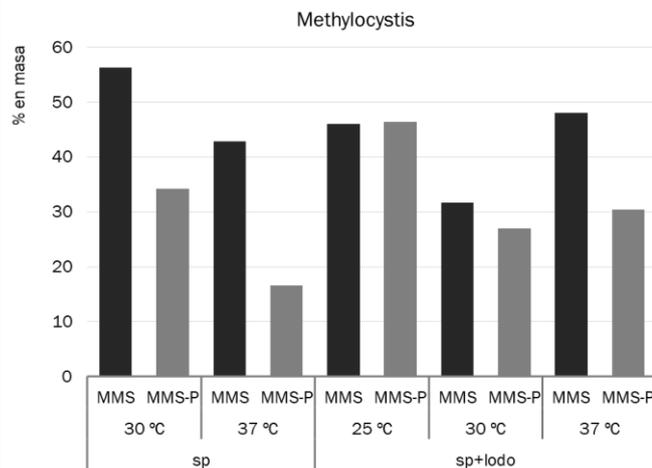
Gráfica 31: Clasificación por clase.

Todas las especies de metanótrofos encontrados pertenecen al filo de *Proteobacterias*. Se observan los géneros de *Methylobacterium* y *Methylocystis* (de la clase *Alphaproteobacteria*); *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methyloversatilis* (de la clase *Betaproteobacteria*); y *Methylomicrobium* y *Methylomonas* (de la clase *Gammaproteobacteria*). Se aprecian diferentes tendencias en la acumulación entre los ciclos en los que se no acumulan bioplásticos (en MMS) y cuando sí (en MMS-P). En la **Fig. 32** se muestran la composición por género de cada muestra. No se ha tenido en cuenta aquellas clases con una presencia inferior al 1 % en todas las muestras.



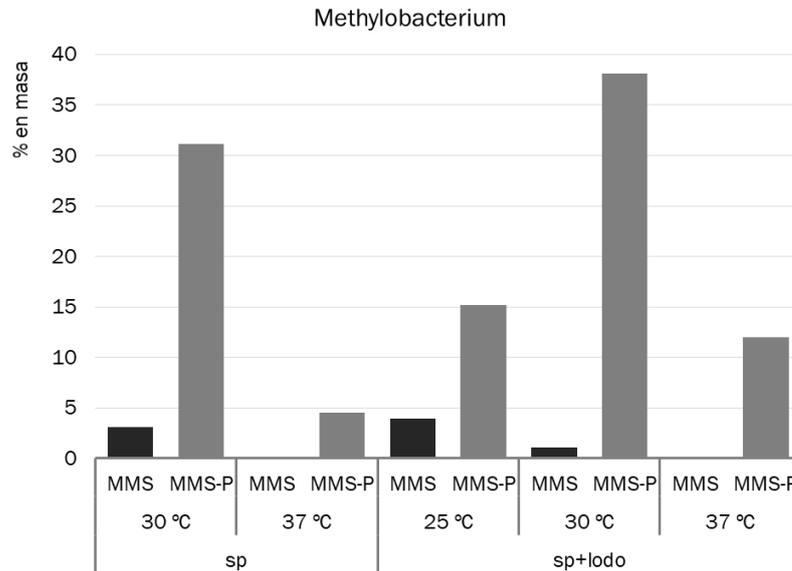
**Gráfica 32:** Clasificación por género.

El crecimiento de *Methylocystis* representa una fracción másica importante en todas las muestras, observándose que, a excepción de las muestras a 25 °C, el crecimiento es menor con la limitación de fósforo (**Fig. 33**).



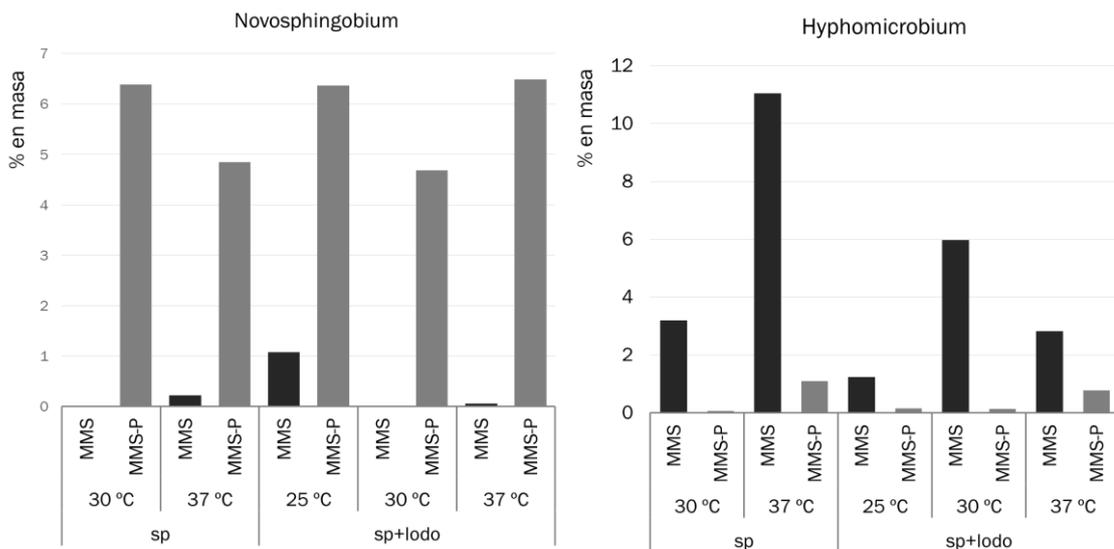
**Gráfica 33:** Fracción másica del género *Methylocystis* por muestra.

La diferencia es significativamente superior en el crecimiento de *Methylobacterium*, que apenas aparece en las muestras con presencia de fósforo (alcanza un máximo de 3,89 % con el inóculo de *Sp.+lodo* a 25 °C), mientras que con limitación de fósforo alcanza el 39,19 % de la biomasa con el inóculo de *Sp.+lodo* a 30 °C (Fig. 34).



Gráfica 34: Fracción másica del género *Methylobacterium* por muestra.

También existen diferencias significativas en la presencia de las bacterias de género *Novosphingobium*, que solo crece en ausencia de fósforo, y en el género *Hyphomicrobium*, que desaparece con dicha limitación; ambas pertenecientes a la clase de *Alphaproteobacteria* (Fig. 35).



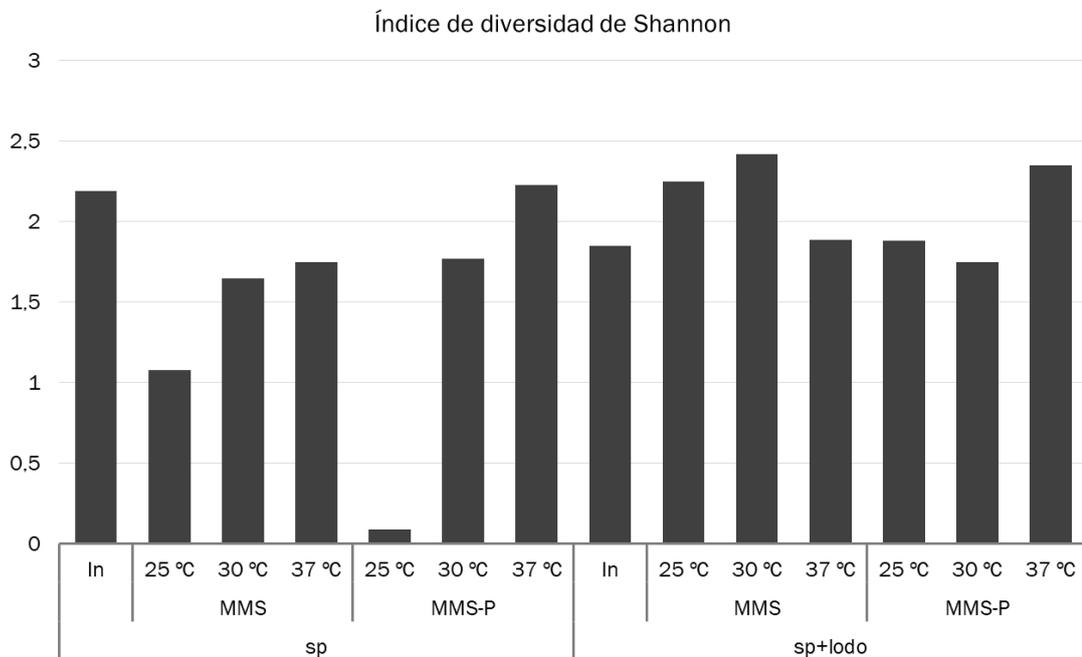
Gráfica 35: Fracción másica los géneros *Novosphingobium* e *Hyphomicrobium* por muestra.

El género *Novosphingobium* crece con frecuencia en la degradación de compuestos aromáticos. Algunas especies de este género se ha comprobado que son productores potenciales de bioplásticos PHAs <sup>74</sup>.

Las bacterias del género *Hyphomicrobium* encuentran sus principales nutrientes en compuestos que contienen carbono, nitrógeno y fósforo. Son capaces de utilizar compuestos orgánicos como única fuente, alcanzando un alto nivel de degradación en condiciones óptimas. No obstante, en condiciones de limitación de fósforo, su crecimiento se ve dificultado <sup>75</sup>.

#### 4.7.3. Análisis de diversidad

Se realiza un análisis de la diversidad por género. Los resultados se dan por medio del índice de diversidad de Shannon (**Fig. 36**):



**Gráfica 36:** Índice de diversidad de Shannon por género.

A excepción de las muestras de Sp. a 25 °C, el índice de diversidad de todas las muestras se encuentra en el intervalo [1,5; 2,5]. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lee et al. (2015) <sup>76</sup>, en cuya investigación utilizaron CH<sub>4</sub> como fuente de carbono en un medio rico en nitrógeno y fósforo, tomando como inóculo muestras del suelo de humedales de Gongjusi (Corea del Sur). Se obtuvo, tras 17 días de eliminación de CH<sub>4</sub> en biorreactores, un índice de diversidad de Shannon de 2,0 ± 0,2 en diferentes comunidades metanotróficas compuestas, mayoritariamente, por metanótrofos tipo II.

Por su parte, Cantera y col. (2015) <sup>32</sup>, también utilizaron CH<sub>4</sub> utilizaron metano como fuente de carbono, se tomó como inóculo una mezcla de 50%/50% del lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales de



desnitrificación-nitrificación (Valladolid, España) y de estiércol fresco de una granja lechera (Cantabria, España) y el medio utilizado durante el crecimiento de las bacterias metanotróficas fue el medio modificado de Brunner. Los valores observados del índice de diversidad de Shannon oscilaron entre  $1,4 \pm 0,15$  y  $2,8 \pm 0,1$ .







# CONCLUSIONES





De los resultados obtenidos del estudio de la degradación de  $\text{CH}_4$  en presencia y ausencia de fósforo, utilizando los inóculos de *Sphagnum* y de *Sphagnum+lodo*, y a tres temperaturas diferentes, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La temperatura es una condición de operación que influye en el comportamiento de la reacción oxidación de  $\text{CH}_4$ , observándose a 37 °C las velocidades más altas de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  y de producción específica de  $\text{CO}_2$ .
- La velocidad de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  y la velocidad de producción específica de  $\text{CO}_2$  son significativamente menores que sin limitación de nutrientes, pero se ve favorecida la acumulación de bioplásticos PHAs.
- No se puede establecer una condición de operación entre las estudiadas que maximice simultáneamente la velocidad de eliminación de  $\text{CH}_4$  y la acumulación de bioplásticos PHBs en ausencia de fósforo. La velocidad de eliminación específica de  $\text{CH}_4$  es máxima a 37 °C con el inóculo de *Sphagnum+lodo* y la acumulación de PHAs es máxima a 25 °C con el inóculo de *Sphagnum*.





# BIBLIOGRAFÍA

---





1. Council NR. *Advancing the Science of Climate Change*. Washington, D.C.: National Academies Press; 2010. doi:10.17226/12782
2. Shuman EK. Global climate change and infectious diseases. *Int J Occup Environ Med.* 2011;2(1):11-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022814>. Accessed March 3, 2018.
3. Keeling CD and TPW. *Trends: A Compendium of Data on Global Change*. Oak Ridge, Tenn., U.S.A.: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy; 2004.
4. Benavides Ballesteros HO, León Aristazábal GE. INFORMACIÓN TÉCNICA SOBRE GASES DE EFECTO INVERNADERO Y EL CAMBIO CLIMÁTICO. 2007:26-35. <http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21138/Gases+de+Efecto+Invernadero+y+el+Cambio+Climatico.pdf/7fabbbd2-9300-4280-befec11cf15f06dd>. Accessed March 3, 2018.
5. Cantera S, Lebrero R, Sadornil L, García-Encina PA, Muñoz R. Valorization of CH<sub>4</sub> emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH<sub>4</sub> abatement. *J Environ Manage.* 2016;182:160-165. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.064
6. Pachauri RK, Meyer L, Van Ypersele J-P, et al. Climate Change 2014 Synthesis Report The Core Writing Team Core Writing Team Technical Support Unit for the Synthesis Report. *Russ Fed Hoesung Lee (Republic Korea) Scott B Power NH Ravindranath.* 2014. [http://epic.awi.de/37530/1/IPCC\\_AR5\\_SYR\\_Final.pdf](http://epic.awi.de/37530/1/IPCC_AR5_SYR_Final.pdf). Accessed March 3, 2018.
7. López JC, Quijano G, Souza TSO, Estrada JM, Lebrero R, Muñoz R. Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: state of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(6):2277-2303. doi:10.1007/s00253-013-4734-z
8. Estrada JM, Kraakman NJRB, Muñoz R, Lebrero R. A Comparative Analysis of Odour Treatment Technologies in Wastewater Treatment Plants. *Environ Sci Technol.* 2011;45(3):1100-1106. doi:10.1021/es103478j
9. Drew Nelson. Reducir metano, golazo económico y de medio ambiente. El Universal Mexico.
10. EEA. Annual European Union greenhouse gas inventory 1990–2012 and inventory report 2014 – European Environment Agency (EEA). *Annu Eur Union Greenh gas Invent 1990–2012 Invent Rep 2014 – Eur Environ Agency.* 2014:1-1294. <https://www.eea.europa.eu/publications/european-union-greenhouse-gas-inventory-2017>. Accessed March 4, 2018.
11. Nikiema J, Heitz M. The Use of Inorganic Packing Materials during Methane Biofiltration. *Int J Chem Eng.* 2010;2010:1-8. doi:10.1155/2010/573149
12. International Energy Agency. World Energy Outlook 2017. <https://www.iea.org/weo2017/>. Published 2017. Accessed March 8, 2018.

13. ESTRATEGIA ESPAÑOLA DE CAMBIO CLIMÁTICO Y ENERGÍA LIMPIA HORIZONTE 2007- 2012 -2020. 2007. [http://www.mapama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/est\\_cc\\_energ\\_limp\\_tcm7-12479.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/est_cc_energ_limp_tcm7-12479.pdf). Accessed March 4, 2018.
14. Melse RW, van der Werf AW. Biofiltration for Mitigation of Methane Emission from Animal Husbandry. *Environ Sci Technol*. 2005;39(14):5460-5468. doi:10.1021/ES048048Q
15. Teodoru CR, Nyoni FC, Borges A V, Darchambeau F, Nyambe I, Bouillon S. Dynamics of greenhouse gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O) along the Zambezi River and major tributaries, and their importance in the riverine carbon budget. *Biogeosciences*. 2015;12:2431-2453. doi:10.5194/bg-12-2431-2015
16. Semrau JD. Bioremediation via Methanotrophy: Overview of Recent Findings and Suggestions for Future Research. *Front Microbiol*. 2011;2:209. doi:10.3389/fmicb.2011.00209
17. Anthony C. *The Biochemistry of Methylootrophs*. Academic Press; 1982. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300411029>. Accessed March 6, 2018.
18. Hanson RS, Hanson TE. Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*. 1996;60(2):439-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8801441>. Accessed March 3, 2018.
19. Strong PJ, Xie S, Clarke WP. Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value? *Environ Sci Technol*. 2015;49(7):4001-4018. doi:10.1021/es504242n
20. Colin Murrell J, Radajewski S. Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res Microbiol*. 2000;151(10):807-814. doi:10.1016/S0923-2508(00)01146-3
21. Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(4):496-531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x
22. Fei Q, Guarnieri MT, Tao L, Laurens LML, Dowe N, Pienkos PT. Bioconversion of natural gas to liquid fuel: Opportunities and challenges. *Biotechnol Adv*. 2014;32(3):596-614. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.011
23. Trotsenko YA, Murrell JC. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy. *Adv Appl Microbiol*. 2008;63:183-229. doi:10.1016/S0065-2164(07)00005-6
24. Rostkowski KH, Pfluger AR, Criddle CS. Stoichiometry and kinetics of the PHB-producing Type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP. *Bioresour Technol*. 2013;132:71-77. doi:10.1016/J.BIORTECH.2012.12.129
25. Ward N, Larsen Ø, Sakwa J, et al. Genomic Insights into Methanotrophy: The Complete Genome Sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Nancy A. Moran, ed. *PLoS Biol*. 2004;2(10):e303. doi:10.1371/journal.pbio.0020303

26. Ge X, Yang L, Sheets JP, Yu Z, Li Y. Biological conversion of methane to liquid fuels: Status and opportunities. *Biotechnol Adv.* 2014;32(8):1460-1475. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.09.004
27. Op den Camp HJM, Islam T, Stott MB, et al. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environ Microbiol Rep.* 2009;1(5):293-306. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x
28. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.* 1990;54(4):450-472.
29. Balasubramanian R, Smith SM, Rawat S, Yatsunyk LA, Stemmler TL, Rosenzweig AC. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. *Nature.* 2010;465(7294):115-119. doi:10.1038/nature08992
30. Knief C. Diversity and Habitat Preferences of Cultivated and Uncultivated Aerobic Methanotrophic Bacteria Evaluated Based on pmoA as Molecular Marker. *Front Microbiol.* 2015;6:1346. doi:10.3389/fmicb.2015.01346
31. McDonald IR, Bodrossy L, Chen Y, Murrell JC. Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(5):1305-1315. doi:10.1128/AEM.02233-07
32. Cantera S, Lebrero R, García-Encina PA, Muñoz R. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. *J Environ Manage.* 2016;171:11-20. doi:10.1016/J.JENVMAN.2016.02.002
33. Carlsen H, Joergensen L, Degn H. Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Appl Microbiol Biotechnol.* 1991;35(1):124-127. doi:10.1007/BF00180649
34. Scheutz C, Kjeldsen P, Bogner JE, et al. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Manag Res.* 2009;27(5):409-455. doi:10.1177/0734242X09339325
35. Asenjo JA, Suk JS. Microbial Conversion of Methane into poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB): Growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph. *J Ferment Technol.* 1986;64(4):271-278. doi:10.1016/0385-6380(86)90118-4
36. Gonzalez García Y, Meza Contreras JC, González Reynoso O, Córdova López JA. Synthesis and biodegradation of polyhydroxyalkanoates: Bacterially produced plastics. *Rev Int Contam Ambient.* 2013;29(1):77-115. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992013000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007). Accessed March 7, 2018.
37. Steinbüchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;128(3):219-228. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x
38. Chen G-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem Soc Rev.* 2009;38(8):2434. doi:10.1039/b812677c



39. Babel W, Steinbüchel A. Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng Biotechnol. 2001;14. [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Babel+W%2C+Steinbüchel+A+%282001%29&btnG=&aq=babel](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Babel+W%2C+Steinbüchel+A+%282001%29&btnG=&aq=babel). Accessed March 8, 2018.
40. Patnaik PR. Perspectives in the Modeling and Optimization of PHB Production by Pure and Mixed Cultures. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25(3):153-171. doi:10.1080/07388550500301438
41. Zhang X, Luo R, Wang Z, Deng Y, Chen G-Q. Application of (R)-3-Hydroxyalkanoate Methyl Esters Derived from Microbial Polyhydroxyalkanoates as Novel Biofuels. *Biomacromolecules.* 2009;10(4):707-711. doi:10.1021/bm801424e
42. Nath A, Dixit M, Bandiya A, Chavda S, Desai AJ. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresour Technol.* 2008;99(13):5749-5755. doi:10.1016/J.BIORTECH.2007.10.017
43. Castilho LR, Mitchell DA, Freire DMG. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour Technol.* 2009;100(23):5996-6009. doi:10.1016/J.BIORTECH.2009.03.088
44. Chen G-Q. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. In: Springer, Berlin, Heidelberg; 2010:17-37. doi:10.1007/978-3-642-03287-5\_2
45. Pieja AJ, Sundstrom ER, Criddle CS. Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(17):6012-6019. doi:10.1128/AEM.00509-11
46. Helm J, Wendlandt K-D, Jechorek M, Stottmeister U. Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture. *J Appl Microbiol.* 2008;105(4):1054-1061. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03831.x
47. Zuñiga C, Morales M, Revah S. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. *Bioresour Technol.* 2013;129:686-689. doi:10.1016/J.BIORTECH.2012.11.120
48. Koller M, Salerno A, Muhr A, Reiterer A, Braunegg G. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers and plastics from renewable resources. 2013;47(5):5-12. doi:UDK 577.11:577.115
49. Rostkowski KH, Criddle CS, Lepech MD. Cradle-to-Gate Life Cycle Assessment for a Cradle-to-Cradle Cycle: Biogas-to-Bioplastic (and Back). *Environ Sci Technol.* September 2012;120906114531007. doi:10.1021/es204541w
50. Shah NN, Hanna ML, Taylor RT. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b: V. Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production under methane-dependent growth conditions. *Biotechnol Bioeng.* 1996;49(2):161-



171. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<161::AID-BIT5>3.0.CO;2-0
51. Karthikeyan OP, Chidambarampadmavathy K, Cirés S, Heimann K. Review of Sustainable Methane Mitigation and Biopolymer Production. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 2015;45(15):1579-1610. doi:10.1080/10643389.2014.966422
52. López JC, Quijano G, Pérez R, Muñoz R. Assessing the influence of CH4 concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure. *J Environ Manage.* 2014;146:116-123. doi:10.1016/J.JENVMAN.2014.06.026
53. Criddle CS, Billington SL, Frank CW, Director CM. Renewable Bioplastics and Biocomposites From Biogas Methane and Waste-Derived Feedstock: Development of Enabling Technology, Life Cycle Assessment, and Analysis of Costs. 2014. [www.calrecycle.ca.gov/Publications/](http://www.calrecycle.ca.gov/Publications/). Accessed June 14, 2018.
54. Whittenbury R, Phillips KC, Wilkinson JF. Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *J Gen Microbiol.* 1970;61(2):205-218. doi:10.1099/00221287-61-2-205
55. Eaton AD, Franson MAH, American Public Health Association., American Water Works Association., Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater.* American Public Health Association; 2005.
56. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1-e1. doi:10.1093/nar/gks808
57. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics.* 2011;27(6):863-864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
58. Aronesty E. *Command-Line Tools for Processing Biological Sequencing Data.* Expr. Anal Durham 2; 2011.
59. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2460-2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
60. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database):D141-D145. doi:10.1093/nar/gkn879
61. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07
62. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, et al. Vegan: community ecology package. R package *vegan*, vers. 2.3. 2015. <http://www.worldagroforestry.org/publication/vegan-community-ecology->



- package-r-package-vegan-vers-22-1. Accessed May 14, 2018.
63. Pla L. BIODIVERSIDAD: INFERENCIA BASADA EN EL ÍNDICE DE SHANNON Y LA RIQUEZA. *Interciencia*. 2006;31(8):583-590. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000800008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000800008&script=sci_arttext). Accessed June 25, 2018.
  64. Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):385. doi:10.1186/1471-2105-12-385
  65. Mohanty SR, Bodelier PLE, Conrad R. Effect of temperature on composition of the methanotrophic community in rice field and forest soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;62(1):24-31. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00370.x
  66. Wen Q, Chen Z, Tian T, Chen W. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *J Environ Sci*. 2010;22(10):1602-1607. doi:10.1016/S1001-0742(09)60295-3
  67. Chinwetkitvanich S, Randall CW, Panswad T. Effects of phosphorus limitation and temperature on PHA production in activated sludge. *Water Sci Technol*. 2004;50(8).
  68. Du G, Chen J, Yu J, Lun S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *J Biotechnol*. 2001;88(1):59-65. doi:10.1016/S0168-1656(01)00266-8
  69. Sriwiryarat T. Mathematical Modeling and Evaluation of Ifas Wastewater Treatment Processes for Biological Nitrogen and Phosphorus Removal. August 2002. <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/28733>. Accessed June 28, 2018.
  70. Mokhtari-Hosseini ZB, Vasheghani-Farahani E, Heidarzadeh-Vazifekhoran A, Shojaosadati SA, Karimzadeh R, Darani KK. Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotrophic bacterium. *Bioresour Technol*. 2009;100(8):2436-2443. doi:10.1016/J.BIORTECH.2008.11.024
  71. García-Pérez T, López JC, Passos F, Lebrero R, Revah S, Muñoz R. Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chem Eng J*. 2018;334:691-697. doi:10.1016/J.CEJ.2017.10.106
  72. Wendlandt K-D, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J Biotechnol*. 2001;86(2):127-133. doi:10.1016/S0168-1656(00)00408-9
  73. Wendlandt K-D, Jechorek M, Stottmeister U, Helm, J. R. G. and Knaak E. Verfahren zur Herstellung von Poly-b-hydroxybuttersäure und Copolymeren. 1996.
  74. Teeka J, Imai T, Reungsang A, et al. Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by isolated *Novosphingobium* sp. THA\_AIK7 using crude glycerol. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(5):749-758.



doi:10.1007/s10295-012-1084-2

75. Wang L, Wen Y, Guo X, Wang G, Li S, Jiang J. Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway. *Biodegradation*. 2010;21(4):513-523. doi:10.1007/s10532-009-9320-9
76. Lee E-H, Choi S-A, Yi T, Kim TG, Lee S-D, Cho K-S. Effects of granular activated carbon on methane removal performance and methanotrophic community of a lab-scale bioreactor. *J Environ Sci Heal Part A*. 2015;50(2):193-200. doi:10.1080/10934529.2014.975541