



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO

ESTRATEGIAS DE ENRIQUECIMIENTO
DE METANÓTROFOS ACUMULADORES
DE BIOPOLÍMEROS A PARTIR DE
BIOGÁS

Autor: D. José Luis López Herreros
Tutor 1: D. Raúl Muñoz Torre
Tutor 2: Dña Yadira Rodríguez Muñoz

Valladolid, septiembre 2020



Resumen:

En el presente trabajo se estudió la influencia de diversos factores (fuente de nitrógeno, concentración de elementos traza (Cu^{2+}) y configuración (ciclos alimentación:hambriuna)) sobre la selección de metanótrofos acumuladores de polihidroxialcanoatos a partir de lodos activos en un biorreactor de columna de burbujeo (BCB) con recirculación interna utilizando biogás ($\text{CO}_2:\text{CH}_4$ 30:70% v/v) como fuente de carbono y la capacidad de eliminación de metano del sistema. Se operó con un tiempo de retención de 60 minutos y tasa de recirculación de la corriente de salida de 30 en sala termostatzada a 25°C. Se realizaron tres experimentos con diferentes composiciones del medio mineral empleado ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) y diferentes ciclos de alimentación:hambriuna de nitrógeno. Los valores máximos obtenidos fueron una capacidad de eliminación de $34.4 \pm 5.7 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (NH_4^+ como fuente de nitrógeno) y una concentración de PHB de 2.1 % w/ (NO_3^- como fuente de nitrógeno, concentración reducida de iones Cu^{2+}).

Palabras clave:

Biorreactor columna de burbujeo, metanótrofos, biopolímeros, eliminación gases efecto invernadero, biogás.

Abstract:

In the present study, the influence of several environmental and operational conditions (nitrogen source, trace elements concentration (Cu^{2+}) and feast:famine cycles strategy) on the selection and enrichment of PHB-accumulating bacteria from activated sludge was assessed in a bubble column bioreactor with internal recirculation (BCB) using biogas ($\text{CO}_2:\text{CH}_4$ 30:70% v/v) as a carbon source. The reactor was operated at an empty bed residence time of 60 min and at a gas recirculation rate of 30 in a thermostated room at 25°C. Three tests were conducted using different mineral medium compositions ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$) and nitrogen feast:famine strategies. The maximum methane elimination capacity and removal efficiency obtained were $34.4 \pm 5.7 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ and 56.1 ± 9.3 %, respectively, using NH_4^+ as nitrogen source. The maximum PHB content was of 2.1 % w/w using NO_3^- as the nitrogen source and a low concentration of Cu^{2+} .

Keywords:

Bubble column bioreactor, methanotrophs, biopolymers, greenhouse gas abatement, biogas.



Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Biogás. Composición, producción y aplicaciones.....	4
1.1.1. Digestión anaerobia	5
1.1.2. Etapas de la fermentación metanogénica.....	6
1.1.3. Factores del proceso de digestión anaerobia de biogás	10
1.1.4. Usos del biogás.....	11
1.1.5. Valorización del biogás.....	12
1.2. Metanótrofos y clasificación	13
1.3. Degradación de metano	15
1.4. Factores a considerar en la selección de metanótrofos	18
1.5. Biopolímeros: polihidroxialcanoatos (PHAs).....	20
1.5.1. Descripción y tipos de PHAs	20
1.5.2. Rutas de síntesis de PHA	21
1.5.3. Aplicaciones.....	22
1.6. Eliminación de metano y biorreactores	25
1.6.1. Eliminación de metano.....	25
1.6.2. Configuración de biorreactores.....	26
1.7. Justificación	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Configuración del sistema	35
3.2. Test 1. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NH_4^+ como fuente de nitrógeno... 37	
3.2.1 Medio mineral e inóculo	37
3.2.2 Modo de operación.....	37
3.3. Test 2. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno... 38	
3.3.1 Medio mineral e inóculo	38
3.3.2 Modo de operación.....	38
3.4. Test 3. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno y baja concentración de Cu^{2+} (0.16 μM)	38
3.4.1 Medio mineral e inóculo	38
3.4.2 Modo de operación.....	39
3.5. Métodos analíticos	39



3.6.	Cálculos	41
4.	RESULTADOS	43
4.1.	Test 1. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NH_4^+ como fuente de nitrógeno..	43
4.1.1.	Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2	43
4.1.2.	Nitrógeno total, Sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB	44
4.2.	Test 2. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno...	45
4.2.1.	Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2	45
4.2.2.	Nitrógeno total, sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB.....	46
4.3.	Test 3. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno y baja concentración de Cu^{2+} (0.16 μM)	47
4.3.1.	Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2	47
4.3.2.	Nitrógeno total, Sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB	48
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
5.1.	Capacidad de eliminación de CH_4 (EC)	51
5.1.1.	Influencia de la fuente de nitrógeno.....	52
5.1.2.	Influencia de la concentración de iones Cu^{2+}	52
5.1.3.	Influencia de la velocidad de dilución (D)	52
5.2.	Acumulación de polihidroxibutirato (PHB)	53
5.2.1.	Influencia de la fuente de nitrógeno.....	54
5.2.2.	Influencia de la concentración de iones Cu^{2+}	54
5.2.3.	Influencia de la velocidad de dilución (D)	54
6.	CONCLUSIONES	57
7.	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXOS	65
	ANEXO A1: TABLAS DE DATOS	65
	ANEXO A2: PARÁMETROS DEL SISTEMA	77
	ANEXO A3: IMÁGENES DEL SISTEMA	78



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Biogás. Composición, producción y aplicaciones

El biogás es una mezcla de gases compuesta en su mayor parte por metano y dióxido de carbono, además de varias impurezas como H₂S y siloxanos. Su composición depende del tipo de material empleado en la digestión y del digestor anaerobio utilizado. Sus propiedades generales se detallan a continuación (Tabla 01).

Tabla 01: Propiedades del biogás (Deublein y Steinhauser, 2008).

Composición	55-70% CH ₄ 30-45% CO ₂ 1-10% H ₂ 0.5-3% N ₂ 0.1% H ₂ S
Contenido energético	6.0-6.5 kWh m ⁻³
Equivalente de combustible	0.60-0.65 L petróleo m ⁻³ biogás
Límite de explosión	6-12% de biogás en aire
Temperatura de ignición	650-750°C (con el contenido de metano mencionado)
Presión crítica	74-88 atm
Temperatura crítica	-82.5°C
Densidad normal	1.2 kg m ⁻³
Olor	Huevo podrido (el olor del biogás desulfurado es imperceptible)
Masa molar	16.043 kg kmol ⁻¹

El biogás es generado por reacciones de degradación de la materia orgánica mediante acción de microorganismos en condiciones anaerobias (ausencia de oxígeno, nitrato, nitrito). Esta digestión anaerobia es un método útil para el tratamiento de residuos biodegradables, ya que además de biogás (empleado como combustible para producir energía eléctrica o calorífica) se produce un efluente líquido que puede ser usado como abono de suelos.

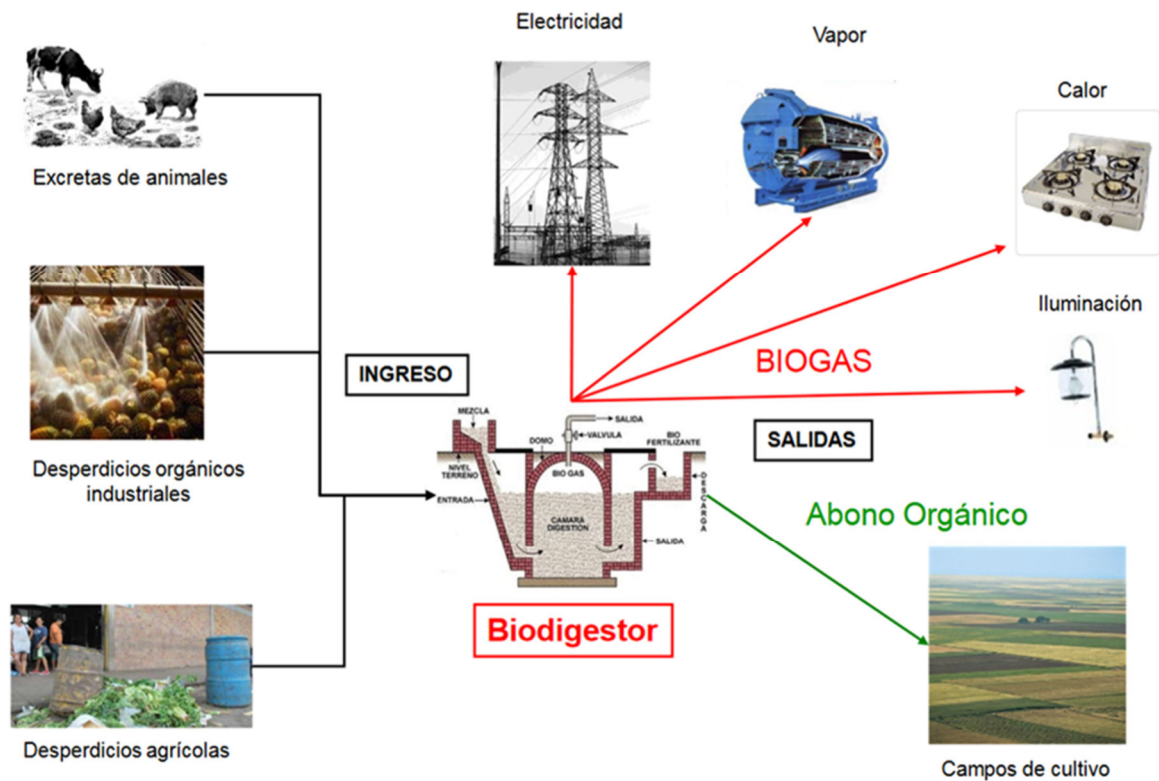


Figura 01: Producción biogás.

1.1.1. Digestión anaerobia

El biogás se puede producir a partir de la biomasa mediante gasificación térmica o biológica. Esta gasificación biológica es también conocida como digestión anaerobia. Es un proceso llevado a cabo por un conjunto de diferentes bacterias anaerobias (Tabla 02) en un rango de temperaturas comprendido entre los 10°C y temperaturas superiores a 55°C con una humedad de entre el 50% y el 100%. En ausencia de oxígeno las bacterias anaerobias fermentan la materia orgánica biodegradable en biogás (Jingura y Matengaifa, 2007).

Consiste en un proceso biológico degradativo en el que una parte de los materiales orgánicos de un sustrato (residuos vegetales y animales, Tabla 04) son transformados en biogás mediante la acción de bacterias sensibles o totalmente inhibidas en presencia de oxígeno. Utilizando este tipo de procesos es posible transformar una gran cantidad de residuos vegetales y animales en productos de valor. Aproximadamente el 90% de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano. Comparando con procesos de digestión aerobia, sólo un 10% de la energía se consume en crecimiento bacteriano, frente al 50% que se consume en estos últimos (Varnero, 2011).

Los microorganismos generadores de metano actúan como enzimas respiratorios y junto a las bacterias no metanogénicas constituyen una cadena alimentaria similar a las cadenas enzimáticas de las células aeróbicas, transformando en biogás los residuos orgánicos.



1.1.2. Etapas de la fermentación metanogénica

El proceso de descomposición anaeróbica de la materia orgánica se puede dividir en cuatro etapas: hidrólisis, etapa fermentativa o acidogénica, etapa acetogénica y etapa metanogénica. En la primera etapa se hidrolizan moléculas complejas como pueden ser carbohidratos, proteínas o lípidos mediante la acción de enzimas extracelulares generadas por microorganismos fermentativos o acidogénicos, dando lugar a compuestos más sencillos y solubles (ácidos grasos de cadena larga, azúcares, aminoácidos). Estos compuestos son metabolizados por bacterias acidogénicas dando lugar a ácidos grasos de cadena corta, hidrógeno, dióxido de carbono, alcoholes y otros productos intermedios. Estos ácidos grasos de cadena corta son convertidos en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono por la acción de los microorganismos acetogénicos. Finalmente, los microorganismos metanogénicos producen metano partiendo del ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno molecular (Varnero, 2011).

Etapas de hidrólisis:

Los microorganismos pueden actuar en la materia orgánica únicamente después de que ésta se haya hidrolizado en compuestos solubles que son capaces de atravesar la pared celular de dichos microorganismos. La etapa de hidrólisis proporciona los sustratos orgánicos adecuados para la digestión anaeróbica. Las moléculas complejas se hidrolizan debido a la acción de enzimas extracelulares generadas por microorganismos hidrolíticos.

Esta etapa puede ser limitante en la velocidad global del proceso si se tratan residuos con contenido en sólidos elevado. Depende de la temperatura a la que se desarrolla el proceso, del tiempo de retención hidráulico, del tamaño de partículas, pH, concentración de productos de hidrólisis y de la composición del sustrato.

Las proteínas constituyen un sustrato muy importante en el proceso de digestión, ya que además de proporcionar una fuente de carbono se hidrolizan en aminoácidos de alto valor por acción de enzimas proteasas. Una parte de estos aminoácidos es empleada en sintetizar nuevo material celular y otra parte se degrada a ácidos volátiles, dióxido de carbono, sulfuro, amonio e hidrógeno en las sucesivas etapas de la digestión.

Los lípidos son degradados mediante la acción de enzimas hidrolíticas (lipasas) dando lugar a ácidos grasos de cadena larga y glicerol.

La etapa limitante del proceso suele ser la degradación de los materiales lignocelulósicos, compuestos de la lignina, celulosa y hemicelulosa, ya que su velocidad de degradación es muy lenta. La velocidad de esta etapa depende también del tamaño de partículas, por lo que tratamientos fisicoquímicos destinados a la reducción del tamaño de partícula consiguen un



aumento en la tasa de hidrólisis y de la velocidad del proceso de digestión total, ya que la etapa de hidrólisis suele ser la etapa controlante del proceso global, lo que implica menores tiempos de retención y menor tamaño de los equipos (reactores).

Etapa fermentativa o acidogénica:

En esta fase se produce la fermentación de las moléculas solubles dando lugar a compuestos que son utilizados por las bacterias metanogénicas (ácido acético, ácido fórmico, hidrógeno) y otros compuestos orgánicos (ácido butírico, ácido acético, ácido láctico y etanol) que son oxidados por bacterias acetogénicas en la siguiente fase de la digestión. Estas bacterias (denominadas bacterias formadoras de ácidos) producen las moléculas que utilizarán las bacterias en la siguiente fase del proceso y eliminan toda presencia de oxígeno que hubiera podido haber quedado disuelto.

Etapa acetogénica:

En esta etapa se convierten los compuestos sobre los que no pueden actuar directamente los microorganismos metanogénicos (etanol, ácidos grasos volátiles). Estos compuestos han de ser degradados en otros más simples (acetatos, hidrógeno) por bacterias acetogénicas para que puedan ser metabolizados en la siguiente etapa de la digestión.

En esta fase de la digestión las bacterias anaerobias han extraído todo el sustrato biodisponible de la biomasa y eliminan sus propios productos de deshecho, productos que serán utilizados por las bacterias metanogénicas en la siguiente fase de la digestión.

Etapa metanogénica:

En esta fase los productos resultantes de las etapas anteriores son metabolizados por bacterias anaerobias. Estos microorganismos son los responsables de sintetizar el metano y de la eliminación de los productos procedentes de fases previas.

Estos microorganismos metanogénicos son los responsables de la formación de metano a partir de sustratos con uno o dos átomos de carbono unidos mediante enlace covalente (acetato, formato, metanol, H_2/CO_2).

Se puede diferenciar entre dos grupos de microorganismos atendiendo al sustrato que son capaces de metabolizar:

- Hidrogenotróficos: Consumen H_2/CO_2 , y ácido fórmico.
- Acetoclásticos: Consumen acetato y metanol.

Tabla 02: Microorganismos participantes en el proceso de fermentación (Insam et al., 2009).

Taxonomía	Especies	Descripción	Metabolismo
Género: <i>Acetobacterium</i>	<i>A. woodii</i> <i>A. paludosum</i>	El género <i>acetobacter</i> comprende un número de bacilos Gram negativos, móviles que realizan una oxidación incompleta de alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales.	Reducen autotróficamente compuestos poliméricos, oligómeros y dióxido de carbono utilizando el hidrógeno como fuente de electrones. Estos microorganismos hacen posible la descomposición de ácidos grasos y compuestos aromáticos.
Género: <i>Eubacterium</i>	<i>E. rectale</i> <i>E. siraeum</i> <i>E. plautii</i> <i>E. cylindroides</i> <i>E. brachy</i> <i>E. desmolans</i> <i>E. callandrel</i> <i>E. limosum</i>	El género <i>Eubacterium</i> consiste en un grupo de bacterias anaeróbicas obligadas Gram-positivas	La mayoría de las eubacterias sacarolíticas producen butirato como principal producto de su metabolismo. Muchas especies son capaces de descomponer sustratos complejos a través de mecanismos especiales. Algunas especies se desarrollan autotróficamente, por lo que son capaces de cumplir funciones específicas en la descomposición anaeróbica.



Tabla 03: Orígenes residuos orgánicos (Varnero y Arellano, 1991).

Residuos de origen animal	Estiércol, orina, guano, residuos de mataderos
Residuos de origen vegetal	Malezas, rastrojos de cosechas, pajas, forraje en mal estado
Residuos de origen humano	Heces, basura orgánica, orina
Residuos agroindustriales	Salvado de arroz, orujos, cosetas, melazas, residuos de semillas
Residuos forestales	Hojas, vástagos, ramas y cortezas
Residuos de cultivos acuáticos	Algas marinas, jacintos y malezas acuáticas

Tabla 04: Clasificación de sustratos para digestión anaerobia (Esguerra, 1989).

Características	Clase	Tipo de sustrato	Características cuantitativas
Sólido	1	Basura doméstica Estiércol sólido Restos de cosecha	ST mayores al 20% 40-70% Fracción Orgánica
Lodo altamente contaminado, alta viscosidad	2	Heces animales	100-150 g L ⁻¹ DQO 5-10% ST 4-8% SV
Fluidos con alto contenido de sólidos suspendidos	3	Heces animales de cría y levante diluido con agua de lavado Aguas residuales de mataderos	3-17 g L ⁻¹ DQO 1-2 g L ⁻¹ SS
Fluidos muy contaminados, sólidos en suspensión	4	Aguas residuales de agroindustrias Aguas negras	5-18 g L ⁻¹ DQO 4-500 g L ⁻¹ DQO

Los residuos orgánicos (Tabla 03) que se someten a digestión aerobia generan compuestos de escaso poder energético (CO₂, H₂O), donde gran parte de la energía se libera a la atmósfera y se pierde. En una digestión anaerobia se generan productos de metabolismo de alto poder energético que pueden ser utilizados como fuente de alimentación para otros organismos o también pueden ser utilizados con fines energéticos (biogás).



1.1.3. Factores del proceso de digestión anaerobia de biogás

Se pueden considerar los siguientes factores para optimizar el proceso de producción anaerobia para la producción de biogás (Mao et al., 2015).

Rango de temperaturas: La digestión anaerobia termófila (entre 55 y 70°C) tiene una tasa de producción superior respecto a la digestión mesófila (37°C) debido a sus mayores velocidades de reacción y capacidad de carga más elevada. Por el contrario, se puede producir un proceso de acidificación durante la digestión termófila, el cual puede llegar a inhibir la producción de biogás. Otras desventajas de la digestión termófila son una menor estabilidad, efluentes de menor calidad, mayor toxicidad, mayor susceptibilidad a las condiciones ambientales, mayores inversiones iniciales, metanogénesis más pobre y un mayor consumo de energía.

pH: El rango de pH afecta al proceso de digestión y a los productos obtenidos. El rango óptimo para la digestión anaerobia es de entre 6.8-7.4.

Relación C/N: La relación C/N refleja los niveles de nutrientes del sustrato de la digestión anaerobia. Una relación C/N elevada induce una baja solubilización de las proteínas y conduce a baja concentración de nitrógeno en forma de amonio, por lo que se puede inhibir la producción de amonio controlando la relación C/N, aunque si esta es muy elevada, el nitrógeno puede ser insuficiente para mantener la biomasa celular, que conduce a una rápida degradación del nitrógeno por los microbios y a una reducción de la producción de biogás. En sustratos con una relación C/N muy baja aumenta el riesgo de inhibición por amonio. El rango óptimo para la relación C/N es de 20-30 o 20-35, siendo una relación C/N de 25 la más comúnmente usada.

Tiempo de retención: El tiempo de retención es el tiempo requerido para completar el proceso de degradación de la materia orgánica. Influye en la tasa de crecimiento microbiano y depende de la temperatura y composición del sustrato. Se definen dos tiempos de retención, SRT (tiempo de retención de sólidos) y HRT (tiempo de retención hidráulico).

El SRT se define como el tiempo que las bacterias permanecen en el digestor y el HRT viene definido por la siguiente ecuación:

$$HRT = \frac{V}{Q}$$

Siendo V el volumen del reactor y Q el caudal de entrada de sustrato a degradar.

Un tiempo de retención medio de 15-30 días es necesario para el tratamiento de residuos en condiciones mesófilas. El HRT óptimo depende de la composición del sustrato. Reducir el HRT puede conducir a una mayor producción y acumulación de ácidos grasos volátiles, mientras que un aumento del HRT por encima del valor óptimo puede llevar a un uso insuficiente de los componentes del digestor.

1.1.4. Usos del biogás

Dentro de las opciones de utilización del biogás se puede destacar su uso en la producción de vapor, generación de vapor y electricidad y combustible (Tabla 05).

Tabla 05: Valor energético del biogás con respecto a otras fuentes de energía (Varnero, 2011).

Valores	Biogás	Gas natural	Gas propano	Gas metano	Hidrógeno
Valor calorífico (KWh m ⁻³)	7	10	26	10	3
Densidad (t m ⁻³)	1.08	0.7	2.01	0.72	0.09
Densidad respecto al aire	0.81	0.54	1.51	0.55	0.07
Límite explosión (% gas en aire)	6-12	5-15	2-10	5-15	4-80
Temperatura de encendido	687	650	470	650	585
Máxima velocidad de encendido en aire (m s ⁻¹)	0.31	0.39	0.42	0.47	0.43
Requerimiento teórico de aire (m ³ m ⁻³)	6.6	9.5	23.9	9.5	2.4

El uso más básico del biogás es como fuente de energía térmica en lugares donde los combustibles son escasos y para sistemas pequeños, donde el biogás se puede emplear para el aporte de energía calorífica para sistemas básicos como calentamiento de agua y sistemas de iluminación a pequeña escala. Este modo de empleo no necesita de la eliminación del H₂S del biogás (Kapoor et al., 2020). Es una tecnología de bajo coste y requiere escaso mantenimiento.

El biogás se utiliza en sistemas combinados de generación de calor y electricidad, generando electricidad y utilizando el calor residual para calentar el agua necesaria para el proceso. Las turbinas de gas se pueden utilizar para la generación conjunta de calor y energía con un bajo coste de mantenimiento. El uso de biogás en estos sistemas requiere la eliminación de vapor de agua y H₂S del sistema (inferior a 200 ppm) (Varnero, 2011).

Es posible utilizar el biogás como combustible para vehículos. Para ello el vehículo ha de estar acondicionado de la misma manera que vehículos preparados para usarse con gas natural, equipados con un tanque de gas y un sistema de suministro de gas además del sistema normal de gasolina como combustible. Eso requiere contenidos de CH₄ superiores al 90 % y concentraciones inferiores a 15 ppmv de H₂S.

Para aumentar el campo de aplicación del biogás ha de ser previamente procesado para ser empleado de forma indirecta para diversas aplicaciones, siguiendo rutas físicas, químicas y biológicas para convertir el biogás en otras formas utilizables (Kapoor et al., 2020).



- Rutas físicas: Limpieza y upgrading de biogás, eliminando el CO₂ para la obtención de metano.
- Rutas químicas: Reformado para la obtención de gas de síntesis (reformado al vapor, reformado auto térmico, reformado en seco).
- Rutas biológicas: Incluyen la bioconversión de metano y bio-CO₂ para generar productos de valor añadido.

1.1.5. Valorización del biogás

En los últimos años ha pasado de considerarse la digestión anaeróbica como una técnica de reducción de volumen de residuos orgánicos a ser vista como una fuente de producción de energía renovable e incluso una biorrefinería para la obtención de productos de valor añadido a partir de residuos.

En menos de 10 años el número de plantas de biogás en Europa ha aumentado de poco más de 6000 a finales de 2009 a las casi 18000 contabilizadas en el año 2017. La producción de energía primaria a partir de biogás ha aumentado hasta los 16 millones de toneladas de petróleo equivalente en Europa a finales de 2016, aumentando la producción de biometano desde los 750 GWh en 2011 a más de 19000 GWh en 2017.

Una purificación completa de biogás a biometano requiere la eliminación integral de CO₂, H₂S, compuestos orgánicos volátiles y siloxanos. Se han desarrollado procesos biológicos para la eliminación del CO₂ del biogás que requieren un menor coste de operación que los procesos tradicionales y conllevando un menor impacto ambiental que éstos. Entre estos procesos biológicos se pueden destacar los procesos de purificación fotosintética del biogás mediante microalgas y bacterias, los procesos hidrogenotróficos mediante la acción de arqueas hidrogenotróficas capaces de reducir enzimáticamente CO₂ a CH₄ utilizando H₂ como donador de electrones y los procesos de electrometanogénesis, que usa la electricidad producida mediante fuentes renovables para generar hidrógeno en el cátodo de una pila electroquímica al que se le suministra el biogás que ha de ser purificado (Muñoz et al., 2019).

La reducción gradual de los incentivos fiscales para la producción de electricidad a partir de biogás hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de valorización, como la conversión de biogás por la acción de organismos metanótrofos en productos de alto valor añadido como exopolisacáridos, proteína, productos precursores de la industria química (ácido fórmico, ácido succínico), ectoína o bioplásticos (PHB).

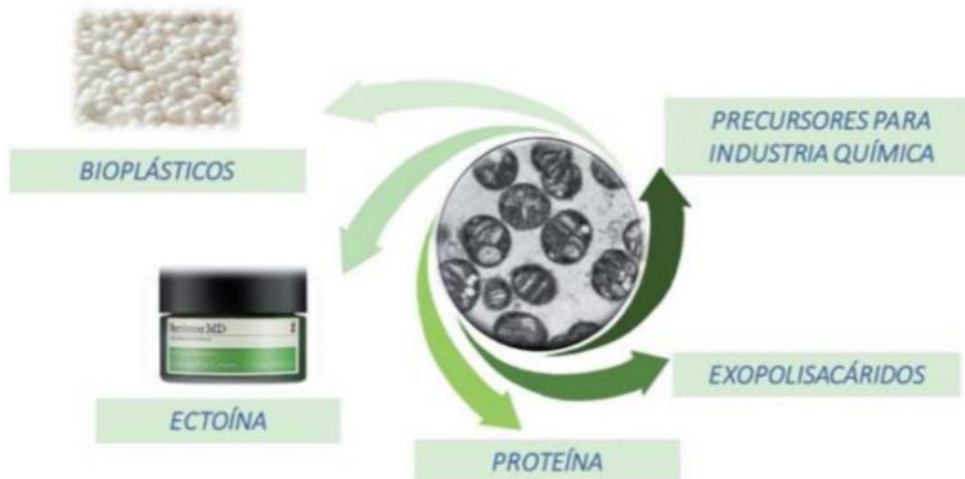


Figura 02: Alternativas de valorización de biogás (Muñoz et al., 2019).

La síntesis de PHAs ha demostrado ser una alternativa económicamente viable para la valorización del biogás. En un reciente estudio se ha demostrado que la valorización de biogás en PHAs en una planta de tratamiento de residuos es una alternativa competitiva a su principal uso actual como combustible para sistemas de producción de electricidad y calor (CHP) (Pérez et al., 2020). La producción de PHAs produce menor acidificación atmosférica y emisiones de olores, pero por el contrario presenta una mayor toxicidad para la vida acuática y necesita de más terreno, agua, energía y reactivos químicos que el CHP. Aunque se comprobó que la inversión inicial y los costes de operación eran mayores para la producción de PHAs, su alto precio de mercado hizo que los dos procesos poseyeran un valor actual neto (VAN) y una tasa interna de retorno (TIR) muy similares (0.77M€ y $6.4 \pm 0.2\%$ respectivamente) en plantas de tratamiento de residuos de tamaño medio, pudiendo llegar a conseguir un precio de mercado de 4.2-4.6 € kg⁻¹ PHA en una planta de tratamiento de residuos que utilizara CHP de biogás para obtener la energía y calor necesarios para la producción, extracción y purificación de los PHAs.

1.2. Metanótrofos y clasificación

El metano es un gas que contribuye al efecto invernadero en la atmósfera terrestre (tabla 06). Su contenido en la atmósfera se ha duplicado desde la última era de hielo. El metano contribuye en un 20% al efecto invernadero antropogénico.

Tabla 06: Potencial de calentamiento de gases de efecto invernadero en un horizonte de 100 años (CNE, 2006).

Gas	Potencial de calentamiento
CO ₂	1
CH ₄	21
N ₂ O	310
SF ₄	23900
PFC	9200
HFC	11700

Por la acción de organismos metanótrofos se puede conseguir la conversión del biogás en productos de alto valor añadido a la vez que se consigue la reducción de las emisiones de metano a la atmósfera.

Los organismos metanótrofos son capaces de oxidar metano en presencia de oxígeno y utilizarlo como su principal fuente de carbono y energía. Aunque la mayor parte de los metanótrofos aerobios son bacterias, se han propuesto otros microorganismos (hongos y microalgas verdes) como oxidantes de metano (López et al., 2013). También se conocen otros organismos, tales como arqueas anaerobias y bacterias en sedimentos marinos, capaces de realizar la oxidación anaerobia del metano (Cui et al., 2015).

Se pueden encontrar metanótrofos aeróbicos en ambientes tales como pantanos, bosques, arrozales, aguas subterráneas, sedimentos marinos o fangos procedentes de aguas residuales (Rostkowski et al., 2013).

El crecimiento de metanótrofos se da principalmente en la interfase entre zonas aerobias y anaerobias, donde se dan unos flujos de metano considerablemente significativos (Semrau et al., 2010).

Los metanótrofos se clasifican en tres grupos diferentes, atendiendo a sus características morfológicas y fisiológicas, metanótrofos tipo I, tipo II y tipo X (Karthikeyan et al., 2015).

- Metanótrofos tipo I: Presentan membranas intracitoplasmáticas en forma de paquetes de discos vesiculares. Usan la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) para la asimilación de carbono y contienen ácidos grasos (fosfolípidos) de 14-16 carbonos.
- Metanótrofos tipo II: Presentan una membrana intracitoplasmática alineada con la periferia de la célula, usan la ruta de la serina para la asimilación de carbono y contienen fosfolípidos de 18 carbonos.

- Metanótrofos tipo X: Son considerados una subclase dentro de los metanótrofos tipo I y comparten características con éstos y con los metanótrofos tipo II, incluyendo el uso de la ruta RuMP para la asimilación de formaldehído y presentan la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa de la ruta de la serina para fijar dióxido de carbono (López et al., 2013).

Tabla 07: Características de los metanótrofos (Hanson y Hanson, 1996).

Características	Tipo I	Tipo II	Tipo X
Morfología	Bacilos cortos (usualmente en solitario), cocos o elipsoides	Bacilos curvos y normales	Cocos (se encuentran frecuentemente formando parejas)
Crecimiento a 45°C	No	No	Si
Disposición de membrana	Haces de discos vesiculares	Membranas alineadas con la periferia celular	Haces de discos vesiculares
Asimilación N ₂	No	Si	Si
Ruta metabólica	RuMP	Serina	RuMP

1.3. Degradación de metano

La degradación de metano es un proceso en múltiples etapas. La oxidación de metano a metanol mediante la enzima monooxigenasa es la primera reacción en producirse. Posteriormente se forman diferentes productos intermedios como formaldehído y ácido fórmico, finalizando en la producción de CO₂ y biomasa (López et al., 2013).

El formaldehído debe ser convertido a ácido fórmico o usado como bloque de construcción en la síntesis de nuevo material celular mediante la ruta RuMP en metanótrofos tipo I y tipo X o mediante la ruta de la serina en metanótrofos tipo II.

No se puede conseguir la conversión completa de metano en biomasa microbiana mediante el empleo de metanótrofos, ya que cualquiera de las dos rutas de asimilación resulta en la producción de al menos un 12% de CO₂ (Bédard y Knowles, 1989).

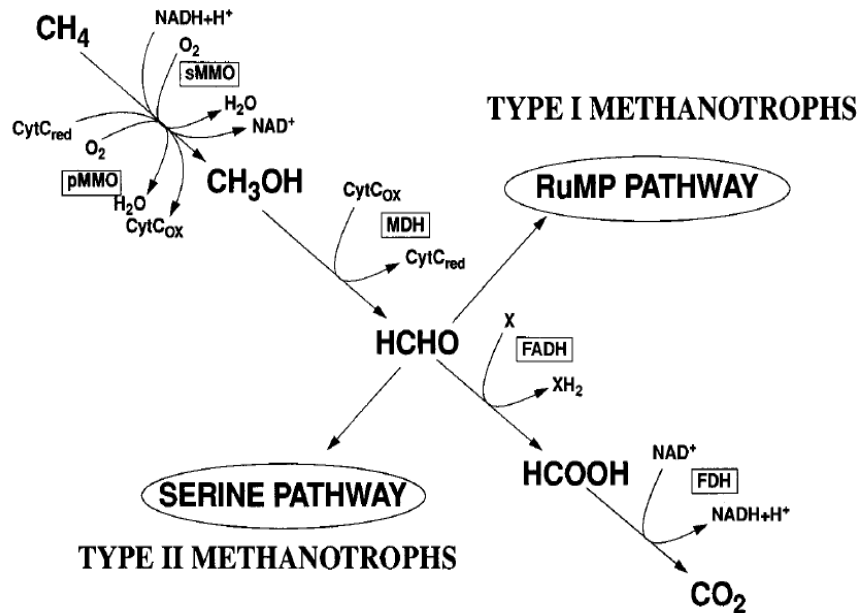


Figura 03: Rutas de oxidación de metano y asimilación de formaldehído. CytC, citocromo c; FADH, formaldehído deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa (Hanson y Hanson, 1996).

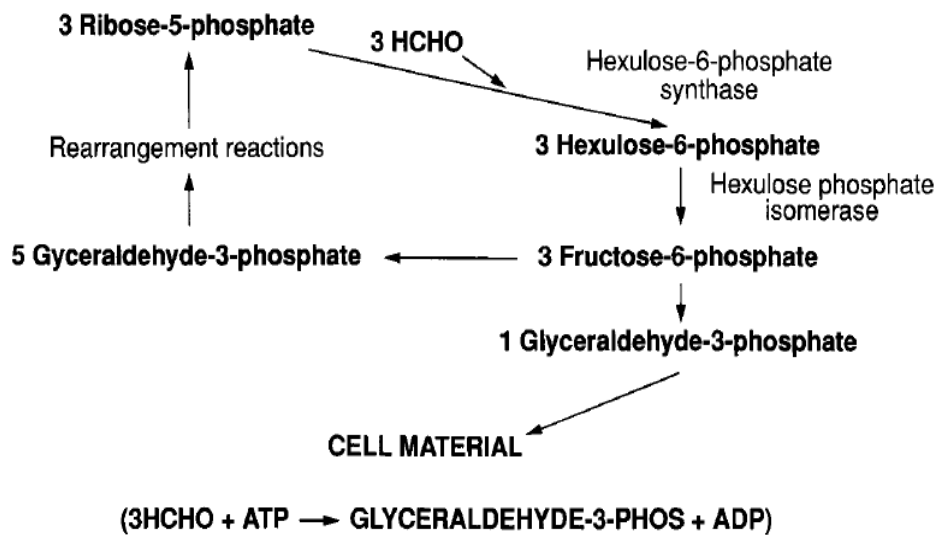


Figura 04: Ruta RuMP para asimilación de formaldehído (Hanson y Hanson, 1996).

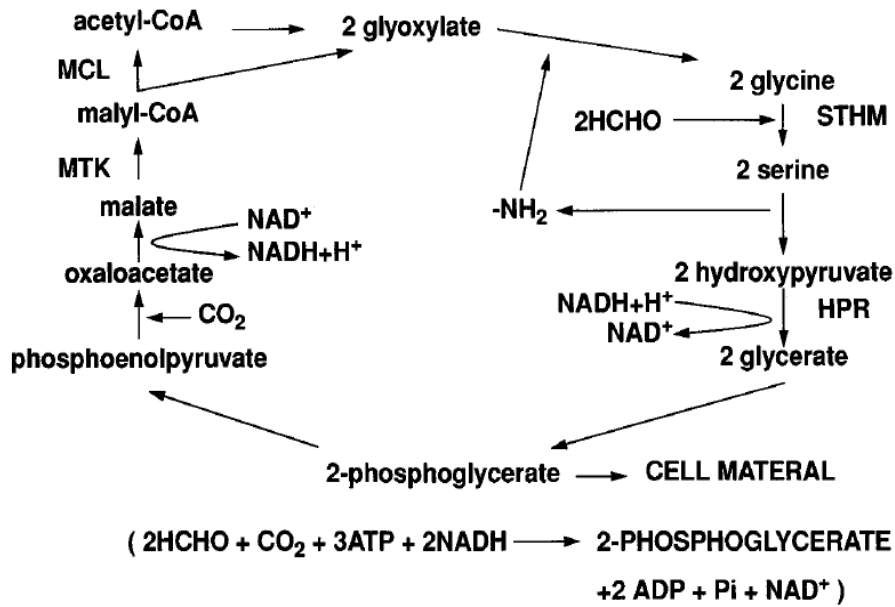
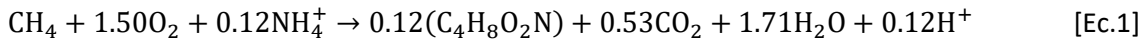


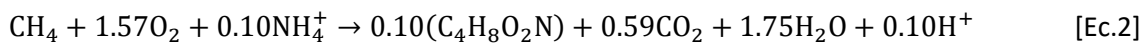
Figura 05: Ruta de la serina (Hanson y Hanson, 1996).

Las relaciones estequiométricas que definen el crecimiento metanotrófico se pueden expresar de dos formas diferentes (Karthikeyan et al., 2015).

- Estequiometría basada en la demanda de oxígeno y nitrógeno para las rutas RuMP y serina.

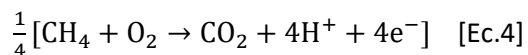
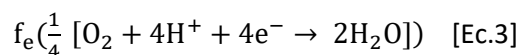


Ruta RuMP.



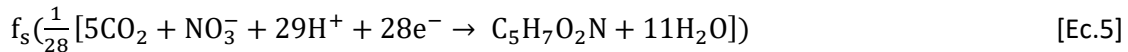
Ruta serina.

- Estequiometría en función de la fracción de electrones requerida por el donador de electrones. La síntesis celular de metanótrofos implica el uso de una fracción de electrones (f_e) procedente de la oxidación del metano para reducir el oxígeno a agua produciendo energía. La fracción de electrones restante (f_s) es empleada en la síntesis celular (Rostkowski et al., 2013).

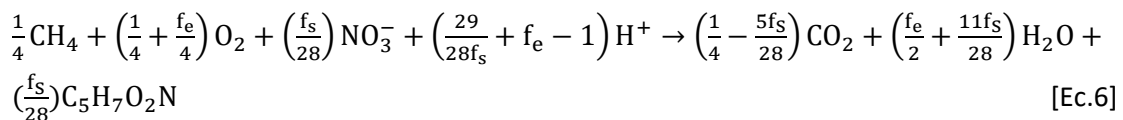


El metabolismo del metano requiere oxígeno como aceptor final de electrones para producir energía (Ec. 3) y como reactivo en el ataque inicial al metano como donador de electrones (Ec. 4).

La naturaleza de micronutrientes y macronutrientes influye en gran medida en la síntesis celular. Si el nitrato es la única fuente de nitrógeno y considerando la fórmula empírica de la biomasa $C_5H_7O_2N$, la construcción de nueva biomasa puede ser descrita mediante la siguiente ecuación:



Teniendo en cuenta todas las expresiones anteriores, la reacción total para la degradación biológica del metano resulta ser:



Se puede utilizar tanto el modelo de Monod como el de Michaelis-Menten para describir la cinética de la reacción. La constante de Monod (K_s) expresa la afinidad de los microorganismos por el sustrato. Se pudo observar que los metanótrofos tipo I poseen una afinidad mayor por el metano (K_s menor).

Comparando la eficiencia en la biodegradación de metano por ambas rutas (RuMP y serina), la ruta RuMP (metanótrofos tipo I) posee una conversión mayor, ya que sólo es necesaria una molécula de ATP para asimilar 3 moléculas de formaldehído durante la oxidación del metano.

Los metanótrofos tipo II (ruta de la serina) poseen una eficacia de conversión menor, ya que requieren de 3 moléculas de ATP y 2 de NADH para fijar 2 moléculas de formaldehído y una de dióxido de carbono, aunque este tipo de metanótrofos tiene una capacidad de almacenamiento superior de fosfolípidos y polihidroxicanoatos (PHAs).

1.4. Factores a considerar en la selección de metanótrofos

Los principales factores a tener en cuenta en la selección de metanótrofos tipo I o tipo II en cultivos mixtos son las concentraciones de oxígeno y metano, temperatura, pH, fuente de nitrógeno y concentración de micronutrientes (Cu) (Tabla 08). Cabe señalar que es fundamental obtener una estrategia de selección de metanótrofos tipo II sobre los metanótrofos tipo I para conseguir una correcta acumulación de PHAs.

Las ratios $O_2:CH_4$ han de mantenerse en una proporción superior a 1.5:1 para permitir la oxidación de metano (Bédard y Knowles, 1989), aunque bajos ratios $O_2:CH_4$ pueden favorecer el crecimiento de metanótrofos tipo II, mientras que ratios $O_2:CH_4$ más elevados pueden favorecer el crecimiento de metanótrofos tipo I (Henkel et al., 2000).

No se han realizado estudios para determinar la influencia de la temperatura en la selección de metanótrofos tipo I o tipo II, aunque los metanótrofos muestran mayores tasas de biodegradación bajo condiciones mesofílicas (25-30°C), se han encontrado metanótrofos de tipo I termofílicos, con crecimientos óptimos en el rango de 42-65 °C (géneros *Methylothermus*, *Methylocaldum*, *Methylococcus*). Con respecto al pH, la mayoría de metanótrofos crecen de forma preferente en condiciones neutras (6.8-7.5), aunque ambientes más ácidos pueden promover la selección de metanótrofos tipo II sobre tipo I en cultivos mixtos (Pieja et al., 2011). Esta mayor tolerancia de los metanótrofos tipo II por los ambientes más ácidos puede ser debida a los requerimientos de CO₂ en el ciclo de la serina (Karthikeyan et al., 2015).

Únicamente los metanótrofos tipo II han manifestado capacidad para asimilar N₂ poseen los genes nifH para sintetizar enzima nitrogenasa (Rostowski et al., 2013). Se prefiere la utilización de nitratos y amonio sobre N₂ y nitritos como fuente de nitrógeno tanto para metanótrofos tipo I como para metanótrofos tipo II.

Respecto a las concentraciones de micronutrientes, el cobre controla la expresión de los genes necesarios para la codificación de la enzima MMO y regula la actividad de las enzimas pMMO y sMMO (Semrau et al., 2010). La concentración de cobre en el cultivo ha de ser ajustada para mantener la homeostasis del cobre y prevenir toxicidad. La mayoría de metanótrofos crecen en condiciones óptimas a concentraciones menores a 4.3 mM, aunque la síntesis de metanótrofos tipo II se ve favorecida a concentraciones inferiores de cobre, por debajo de 0.8 mM.

Tabla 08: Condiciones de enriquecimiento. Selección de metanótrofos (López et al., 2019).

Configuración reactor	Inóculo	O ₂ :CH ₄	Fuente nitrógeno (mM)	Condiciones enriquecimiento
CSTR	Co-cultivo de <i>M. trichosporium</i> OB3b/ <i>M. albus</i> BG8	4:1 1:10	NO ₃ ⁻ (1) NO ₃ ⁻ (0.5)	No Cu
Batch	Co-cultivo de <i>Methylocystis</i> sp./ <i>Methylomicrobium album</i>	1:5	NH ₄ ⁺ (50)	
FBR	Sedimentos de fuentes termales	1:4	N ₂	
Batch	Fango activo	1:1	NO ₃ ⁻ (10)	Sin Cu, medio diluido al 10% Carbonato al 10 mM, pH 5
Alimentado en batch	Fango activo	1.5:1	NH ₄ ⁺	30°C
Alimentado en batch	Muestras de vertederos	1: 5	NH ₄ ⁺ (4)	

1.5. Biopolímeros: polihidroxicanoatos (PHAs)

1.5.1. Descripción y tipos de PHAs

Los PHAs, polihidroxicanoatos, tales como el poli-3-hidroxi butirato (PHB) o el poli-3-hidroxi valerato (PHV), son copolímeros de los hidroxicanoatos, de cadena lineal y comportamiento termoplástico. Son poliésteres lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del siguiente monómero.

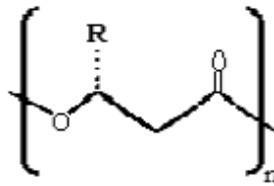


Figura 06: Estructura general de PHAs.

Se puede distinguir entre dos tipos de PHAs atendiendo a la longitud de su cadena lateral. PHAs de cadena corta, con cadena alquílica lateral de hasta dos átomos de carbono y PHAs de cadena media, con cadenas de 3 o más átomos de carbono. Los PHAs de cadena corta son más rígidos y frágiles, mientras que los de cadena media presentan mayor elasticidad y menor resistencia mecánica.

Debido a sus características mecánicas y su biodegradabilidad, estos biopolímeros poseen el potencial para sustituir a los plásticos tradicionales derivados de combustibles fósiles (Cantera et al., 2017). El mayor problema que presentan los PHAs es su elevado coste de producción en comparación con los plásticos derivados de combustibles fósiles ya que, aunque el precio de los PHAs se ha reducido durante los últimos años, varía entre 5 y 20 € por kg, dependiendo de la fuente de carbono, la pureza, la composición de los monómeros y la cepa microbiana utilizada (Bugnicourt et al., 2016).

La fuente de carbono representa el mayor problema para la producción industrial de PHAs, ya que supone entre el 40 y el 50% de los costes de producción (Khosravi-Darani et al., 2013). La abundancia y disponibilidad del metano, tanto diluido en corrientes residuales como concentrado en biogás, lo convierten en la fuente de alimentación ideal para la producción de PHAs, permitiendo reducir más del 50% en el coste de adquisición de materias primas durante el proceso de producción de PHAs (Levett et al., 2016).

Los PHAs se acumulan como gránulos de almacenamiento intracelulares bajo condiciones de limitación de nutrientes y en exceso de fuente de carbono, como reserva de energía durante

periodos de hambruna. Tanto la composición monomérica de los PHAs como su eficacia de producción se ven afectados por las condiciones del cultivo como pueden ser la temperatura, pH, fuente de carbono, presencia de co-sustratos, cantidad de oxígeno y concentración de micronutrientes y macronutrientes (Karthikeyan et al., 2015).

1.5.2. Rutas de síntesis de PHA

Se ha demostrado (Pieja et al., 2012) que los metanótrofos tipo II acumulan PHAs a partir de la ruta de la serina. Mediante limitación de nutrientes tales como N, P, O₂, S o Mg en el cultivo, los metanótrofos tipo II utilizan parte del carbono procedente de la oxidación del metano para la producción de PHAs. El formaldehído generado en la oxidación del metano actúa como nexo de unión entre el catabolismo y anabolismo en metanótrofos tipo II. La ruta anabólica es activada por la acción de enzimas dependientes de la tetrahidrometanopterin (H₄MTP), catalizando la reacción entre la glicina y el formaldehído y obteniendo serina, la cual entra en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) en condiciones de exceso de nutrientes o en el ciclo de PHA en condiciones de limitación de nutrientes (Anthony, 2011; Karthikeyan et al., 2015). Bajo condiciones de limitación de nutrientes se produce una gran cantidad de coenzima A mediante el ciclo de Krebs que permite la transformación del acetil Coenzima A en acetoacetil coenzima A (Tan et al., 2014). Posteriormente este sustrato es transformado en hidroxiacil (HA) coenzima A debido a la acción de una acetoacetil coenzima A reductasa. El PHA es sintetizado a partir de este último compuesto por la acción de la PHA-sintasa (Pieja et al., 2011; Tan et al., 2014).

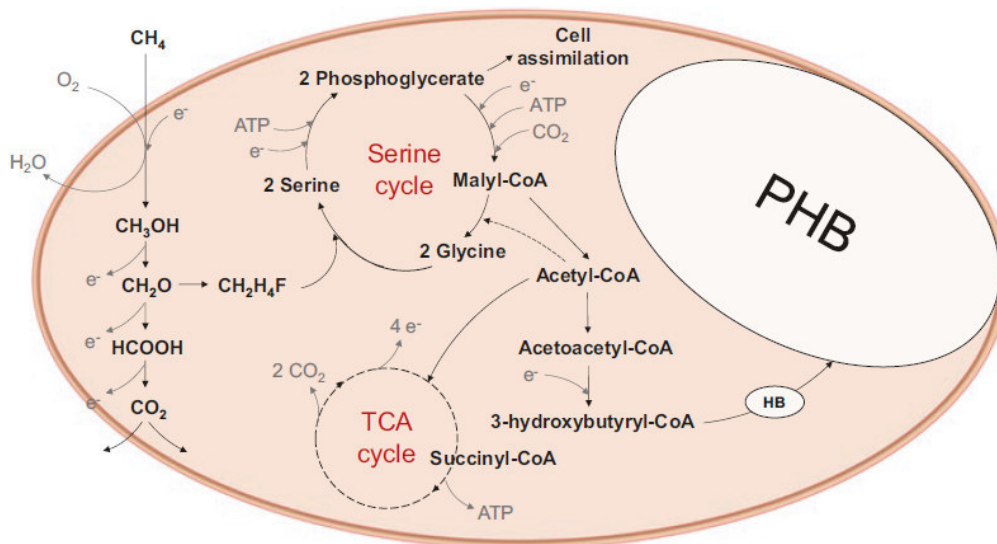


Figura 07: Producción de PHB con metanótrofos tipo II (López et al., 2019).

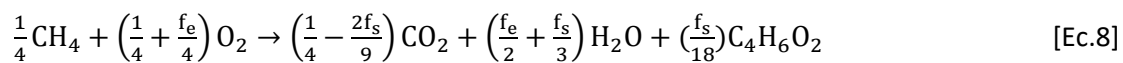
La ecuación estequiométrica para la acumulación de PHB con metanótrofos usando la ruta de la serina es la siguiente:





Siendo FP la succinato-deshidrogenasa oxidada en el TCA, FPH₂ la succinato deshidrogenasa reducida y C₄H₆O₂ la fórmula empírica general para un monómero de PHB.

Teniendo en cuenta esta ecuación, el rendimiento teórico estimado para la conversión de metano en PHA (Y_{PHA}) es de 0.67 gPHA gCH₄⁻¹. Debido a que parte del metano y oxígeno consumidos se transforman en dióxido de carbono para generar NADP⁺ el rendimiento teórico se reduce a 0.54 gPHA gCH₄⁻¹ (Khosravi-Darani et al., 2013). El cobre presente en el cultivo es importante para conservar estos valores de rendimiento, ya que la ausencia del mismo en el cultivo puede hacer que el valor del rendimiento decaiga (Zhang et al., 2017). Se han llegado a obtener rendimientos dos veces mayores que los calculados empíricamente, lo cual ha podido ser justificado por la influencia del parámetro f_s dependiente de cada organismo (Rostkowki et al., 2013). Se puede expresar una ecuación estequiométrica dependiente de los parámetros f_s y f_e.



Como los metanótrofos tipo II acumuladores de PHB muestran un mejor comportamiento en condiciones de exceso de nutrientes (nitrógeno), se pueden implementar estrategias basadas en la disponibilidad o carencia de éstos. Estrategias de alimentación: hambruna de diferentes nutrientes han demostrado ser viables en el enriquecimiento de metanótrofos tipo II en un cultivo mixto mejorando así su contenido en PHB operando a largo plazo.

1.5.3. Aplicaciones

Los PHAs pueden ser empleados en múltiples campos de aplicación como usos médicos, industriales, agricultura y aplicaciones terapéuticas (Figura 08). La producción de bioplásticos en Europa durante el último año ascendió a 2.11 millones de toneladas (Figura 09) con previsiones de crecimiento durante los próximos cinco años (Figura 10), destinando su uso a diferentes sectores, tales como la automoción, la agricultura, la construcción o la electrónica (Figura 11).

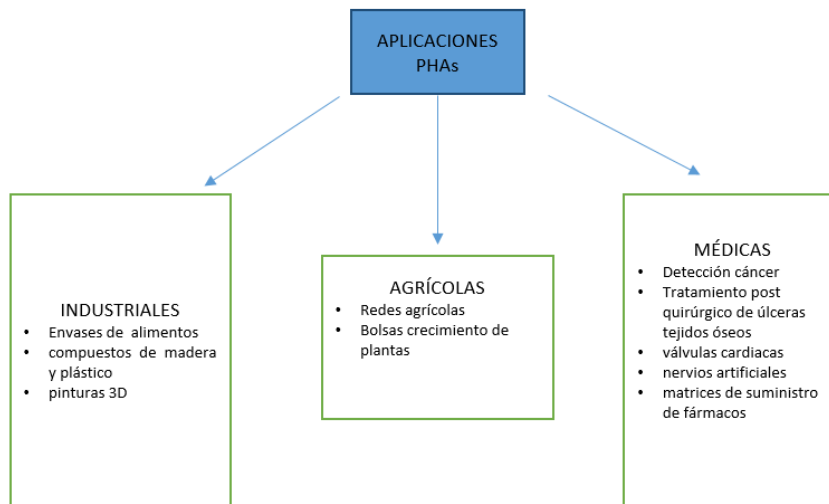


Figura 08: Aplicaciones PHAs.

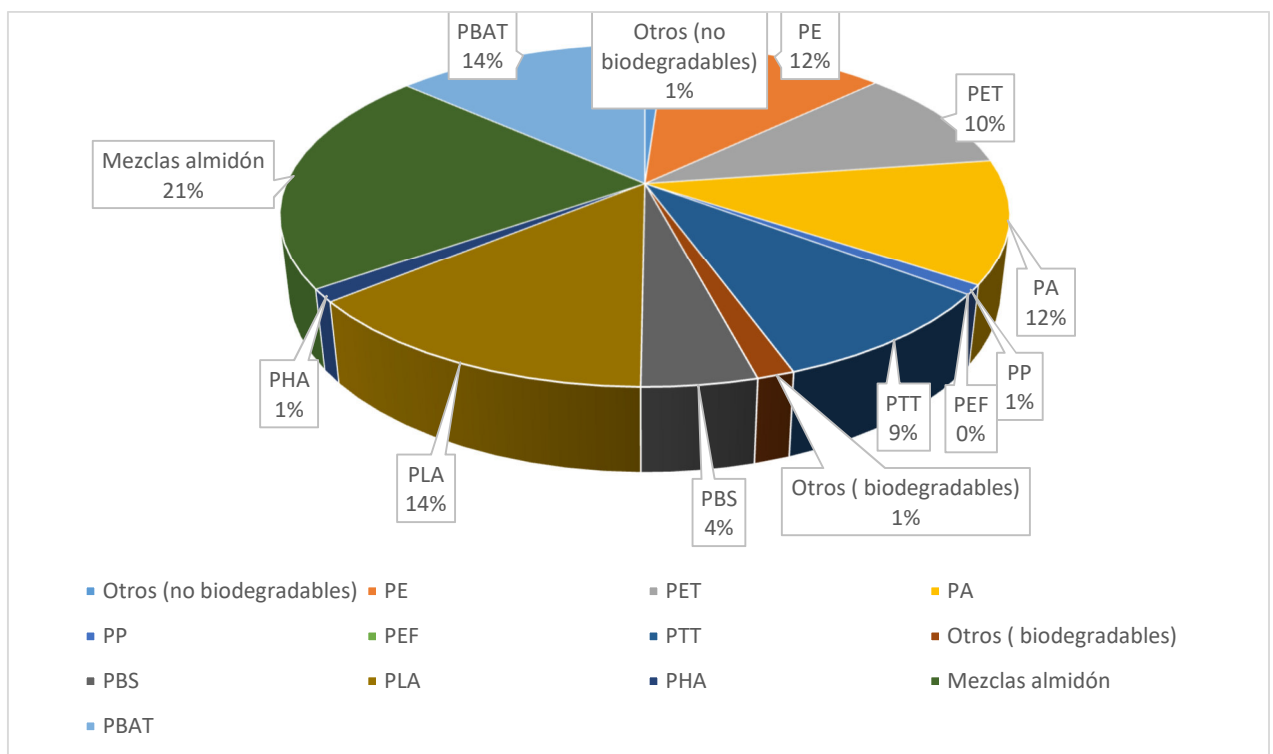


Figura 09: Producción bioplásticos 2019 (total: 2.11 millones de toneladas) (European Bioplastics, 2019).

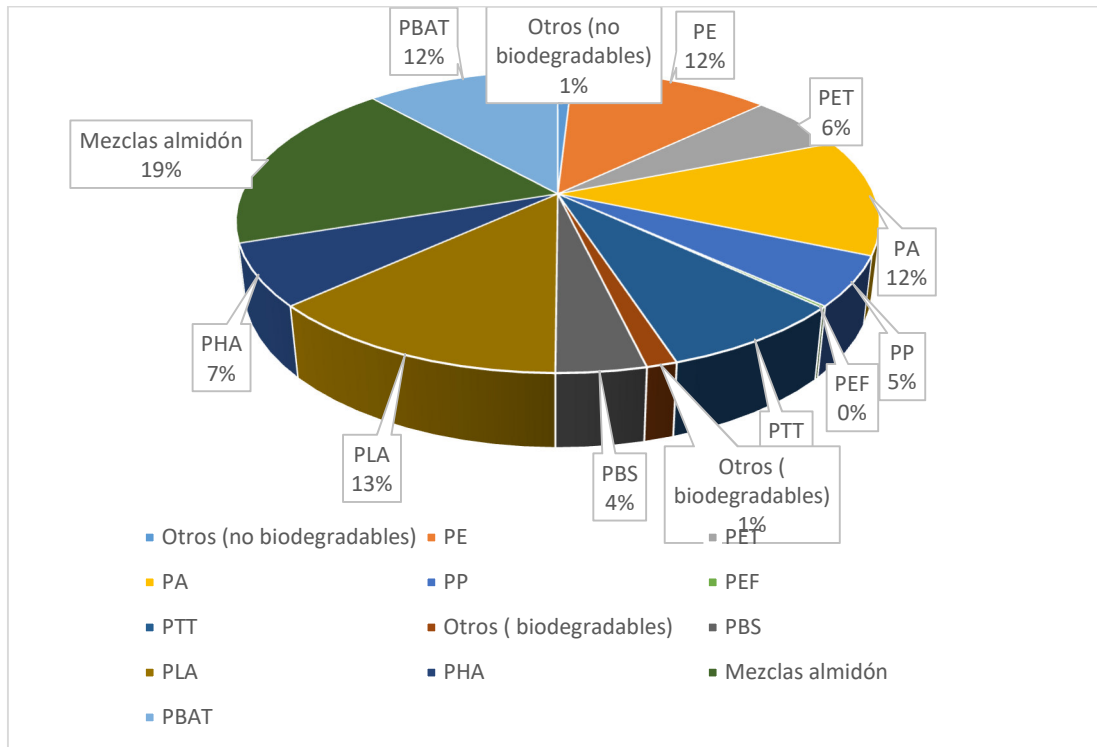


Figura 10: Previsiones producción bioplásticos 2024 (total: 2.42 millones de toneladas) (European Bioplastics, 2019).

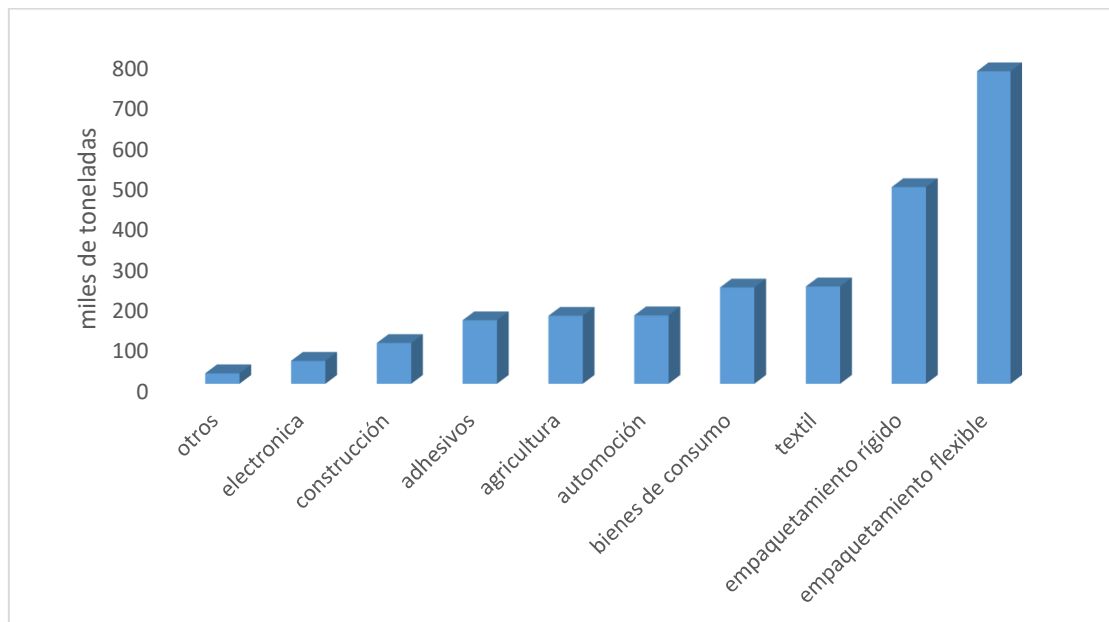


Figura 11: Usos bioplásticos (European Bioplastics, 2019).

1.6. Eliminación de metano y biorreactores

1.6.1. Eliminación de metano

Las técnicas de eliminación de metano basadas en métodos biológicos han ido aumentando en importancia debido a su gran robustez y eficacia, en un rango elevado de caudales y concentraciones de metano por debajo de su límite inferior de explosión (5% v/v). Los costes de operación de las técnicas biológicas son inferiores a los de las técnicas tradicionales (físico-químicas) de eliminación de metano, ya que estas últimas poseen unos mayores requerimientos energéticos. Las técnicas biológicas cuentan también con un menor impacto ambiental debido a su menor huella de CO₂ y a que generan residuos inocuos o menos contaminantes que los generados por métodos físico-químicos (Estrada et al, 2012).

Estas técnicas biológicas únicamente requieren de la presencia de fase acuosa para llevar a cabo las reacciones metabólicas de biodegradación de metano y la disponibilidad de macronutrientes (N, K, S, P) y micronutrientes (Cu, Zn, Fe, Mn) para hacer posible la síntesis de las enzimas necesarias. Ambos son suministrados en forma de medio mineral salino (NMS) (Muñoz et al., 2015). Previo a la biodegradación o bioconversión de contaminantes gaseosos, el metano debe transferirse de la fase gas a la fase acuosa (Figura 12).

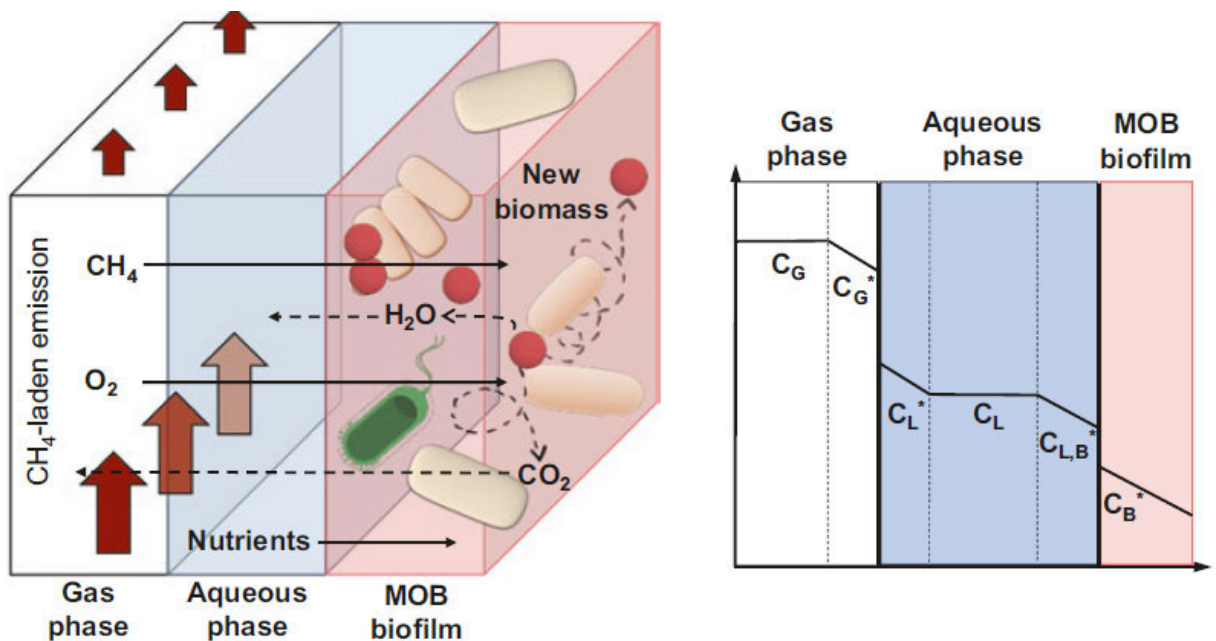


Figura 12: Transferencia de materia en biorreactores. C_G : concentración de metano en la fase gaseosa global; C_G^* : concentración de metano en fase gaseosa en la interfase líquido- gas; C_L^* : concentración de metano en fase líquida en equilibrio con la fase gas; C_L : concentración de metano en la fase líquida global; $C_{L,B}^*$: concentración de metano fase líquida en la interfase líquido-biofilm; C_B^* : concentración de metano en biofilm en equilibrio con fase líquida (López et al., 2019).



El mayor problema en los procesos biológicos de eliminación de metano es la baja transferencia de materia del metano y el oxígeno requerido para su oxidación (fase gaseosa) entre la fase gas y la acuosa, y entre la fase acuosa y la biopelícula donde se encuentran las bacterias oxidantes. Su alta ley de Henry adimensional hace que el metano y el oxígeno se solubilizan difícilmente en la fase líquida, reduciéndose la eficacia de la biodegradación de metano (López et al., 2013; Estrada et al., 2014). Debido a esta baja transferencia de materia se hace necesario implementar la operación del proceso con mayores tiempos de contacto entre fase líquida y gaseosa, de manera que aumenta el volumen de los biorreactores necesarios, aumentando con ello sus costes de inversión y operación. Se aumenta también la mezcla y agitación para aumentar la turbulencia y mejorar la transferencia de materia, lo que conlleva un mayor gasto de potencia. Se hace necesario implementar nuevas configuraciones de biorreactores que mejoren la transferencia de materia entre fases reduciendo los costes energéticos. En este sentido se ha conseguido implementar dos tipos de biorreactores (Cantera et al., 2018).

- Biorreactor con recirculación interna de gas: permite desacoplar el tiempo de residencia del gas y la turbulencia en el caldo de cultivo bacteriano del tiempo de residencia total (ERTB) dentro del reactor, mejorando la transferencia de materia sin comprometer el tiempo de contacto entre fases (Estrada et al., 2014; García-Pérez et al., 2018).
- Uso de fase secundaria no acuosa (NAP): estas fases secundarias están formadas por compuestos no tóxicos, no biodegradables y no volátiles que presentan mayor afinidad por el metano y el oxígeno que la fase líquida. El uso de estas fases hace posible un menor tamaño de burbuja (aumentando el área interfacial) reduciendo la tensión interfacial con el gas y mejorando así la transferencia de materia (Cantera et al., 2016; Stone et al., 2017).

1.6.2. Configuración de biorreactores

Se puede distinguir entre dos diferentes tipos de biorreactores: régimen laminar y en régimen turbulento. En los primeros, la superficie de contacto entre fase líquida y gaseosa es proporcionada mediante un relleno con el que se consigue aumentar el tiempo de contacto entre fases y facilitar la retención de biomasa (aunque dificulta su recuperación). Este tipo de reactores tiene una peor transferencia de materia entre fases, lo que obliga a mayores tamaños de reactor (Kraakman et al., 2011). Los biorreactores en régimen turbulento poseen un mayor coeficiente de transferencia de materia. Debido a su gran agitación, los requerimientos de energía necesarios son mayores. En estos reactores la biomasa se encuentra suspendida en la fase líquida, lo que facilita su recuperación. Debido a su gran consumo energético es necesario emplear diferentes configuraciones (Recirculación interna de gas o NAP, mencionadas anteriormente) que mejoran la transferencia de materia reduciendo el consumo, para facilitar la implementación de estos reactores a gran escala (Cantera et al., 2017, 2018).



1.6.2.1. Biorreactores laminares

Biofiltros (BF): En este tipo de biorreactores la fase gaseosa es humidificada y posteriormente atraviesa un relleno donde se encuentra la biopelícula encargada de la degradación del contaminante y el biofiltro es irrigado de forma periódica con una disolución de nutrientes acuosa. El tipo de relleno es un parámetro clave, influyendo en la actividad microbiana y superficie de contacto en la que se forma la biopelícula y se produce la transferencia de materia (Cantera et al., 2017). Estos reactores presentan elevadas áreas interfaciales, bajos costes de operación y tiempos de arranque cortos. Su altura está limitada por la caída de presión y tienen tiempos de residencia elevados. Durante la filtración de metano, puede darse un sobrecrecimiento de biomasa que puede empeorar la eliminación y aumentar la caída de presión dentro del reactor, por lo que se han implementado diversas técnicas de control del crecimiento de biomasa (Estrada et al., 2013; López et al., 2018; Covarrubias-García et al., 2017).

Biofiltros percoladores (BTF): En estos sistemas la fase gaseosa con los gases contaminantes se hace pasar a través de una biopelícula inmovilizada en un lecho de relleno irrigado de forma continua con una disolución acuosa de nutrientes. El metano absorbido en la solución acuosa es degradado en la biopelícula fija mediante los nutrientes de la disolución continuamente irrigada. La inversión inicial en este tipo de reactores llega a ser del doble que en los biofiltros, aunque los costes de operación son menores ya que este tipo de biofiltros cuenta con menores caídas de presión (Muñoz et al., 2015; Lebrero et al., 2015). En este tipo de reactores es más fácil controlar el pH, temperatura e irrigación de nutrientes que en los biofiltros. Aunque el control sobre el crecimiento de biomasa es más fácil en este tipo de sistemas que en los biofiltros, la extracción de esta es complicada, debido a su difícil accesibilidad y a la adherencia de la biomasa al relleno.

Reactores de biopelícula de flujo horizontal (HFBRs): En este tipo de reactores se apilan multitud de láminas en vertical, una encima de otra. Estos sistemas permiten un mejor acceso a la biomasa y mayor facilidad en su recogida. Tanto la fase líquida como la fase gaseosa cruzan de forma horizontal a través de cada lámina antes de pasar a la lámina inferior, asegurando de esta forma un contacto óptimo con la biopelícula dispuesta en cada una de las láminas. Añadiendo una o dos biopelículas NAP a la fase acuosa se puede mejorar la eliminación de metano para los mismos tiempos de residencia en este tipo de reactores (Kennelly et al., 2014).

Reactores de biopelícula en membrana (MBfRs): Este tipo de tecnología está basada en la difusión, pasiva o activa del gas contaminante situado en un lado de la membrana hacia la biopelícula en fase líquida situada al otro lado mediante un gradiente de presión o concentración. Tanto el material en el que está construida la membrana como su configuración deben ser seleccionadas adecuadamente para no caer en limitaciones en la transferencia de materia, ya que algunos tipos de materiales y membranas presentan una elevada afinidad por contaminantes hidrofóbicos como el metano (Kumar et al., 2008).

Reactores de biopelícula capilar (CBfRs): estos reactores están compuestos de microcapilares rectos de entre 1-5 mm de diámetro, dispuestos de forma paralela y separados por una pared delgada en los que las fuerzas de capilaridad controlan sobre las fuerzas viscosas o de gravedad

(Kraakman et al., 2011). La fase líquida y la fase gaseosa son conducidas separadamente a través de los canales consiguiendo un modelo de flujo tipo pistón. La eliminación de contaminante en este tipo de reactores no se ve comprometida por el crecimiento de biomasa entre los canales. Los coeficientes de transferencia de materia en este tipo de reactores son comparables a los obtenidos en reactores turbulentos, con un consumo de energía menor.

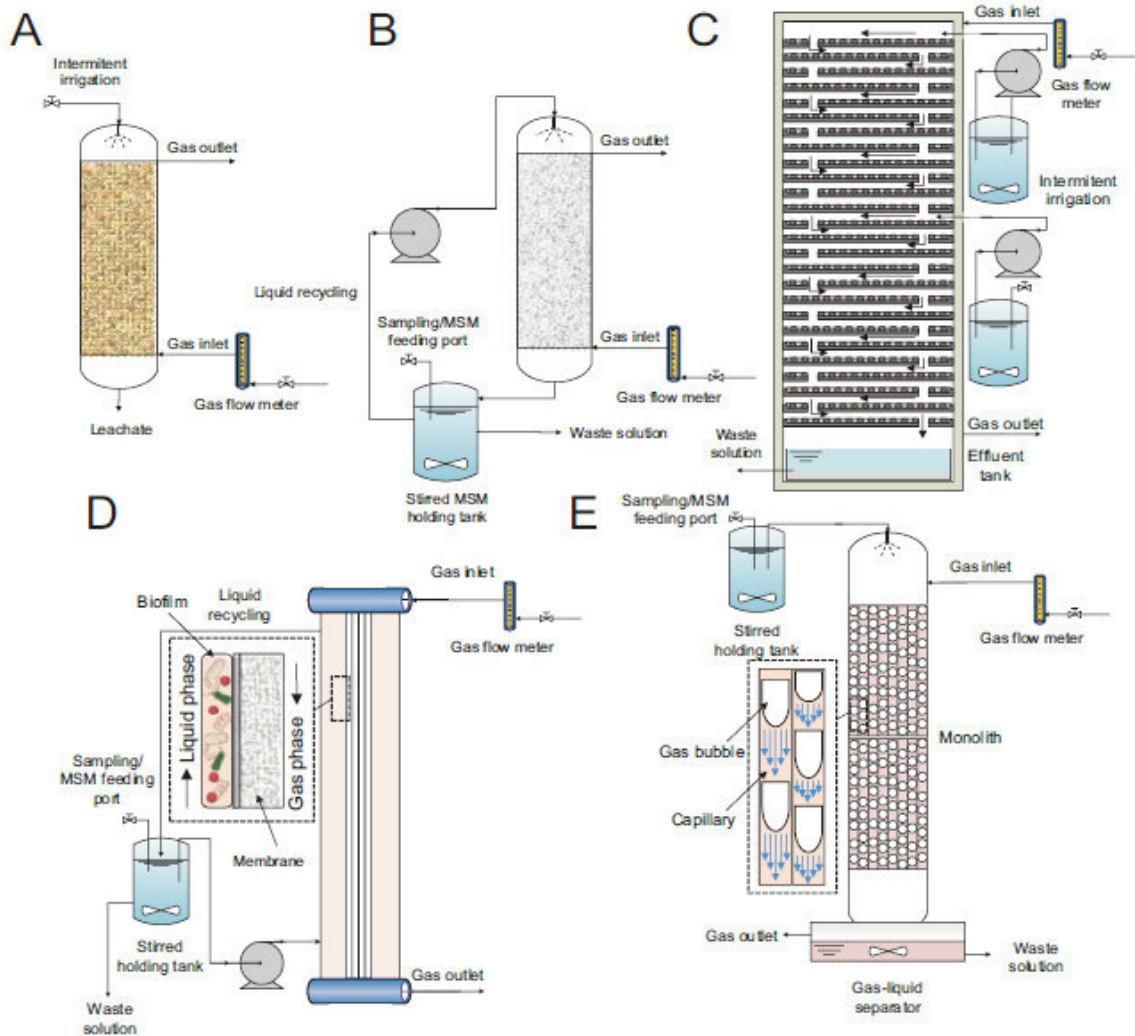


Figura 13: Biorreactores laminares. A: biofiltro (BF); B: biofiltro percolador (BTF); C: reactor biopelícula flujo horizontal (HFBR); D: reactor de biopelícula en membrana (MBfR); E: Reactor biopelícula capilar (CBfR) (López et al., 2019).



1.6.2.2. *Biorreactores turbulentos*

Reactores de tanque agitado (STRs): En este tipo de reactores turbulentos se asegura una mezcla perfecta y la suspensión de la biomasa en la fase líquida mediante agitación continua de forma mecánica la mayor parte de las veces (Nienow et al., 2014). Se utiliza agitación y mezcla para romper las burbujas de la emisión contaminante alimentada por la parte inferior del reactor con lo que se consigue un aumento considerable del área interfacial y para reducir la anchura de la capa líquida, incrementando el coeficiente de transferencia de materia entre las fases líquida y gaseosa (Kraakman et al., 2011). A pesar de los buenos resultados que se consiguen con este tipo de reactores, su elevado consumo energético hace que se prefiera implementar BTFs o BFs en aplicaciones a gran escala (Kraakman et al., 2011). El uso de STRs es recomendado cuando el flujo volumétrico de gas a tratar es pequeño. Para flujos de gas mayores es preferible usar reactores de columna de burbujeo (BCBs) (Petersen et al., 2017).

Biorreactores de columna de burbujeo (BCBs): Tanto este tipo de reactores como en los reactores airlift (ALRs) y reactores de recirculación forzada (FCLBs) se diferencian de los reactores de tanque agitado en que no es necesario emplear agitación mecánica. La transferencia de materia entre fases, así como una adecuada mezcla es conseguida utilizando difusores de microporo en los BCBs o instalando un tubo difusor concéntrico para crear un gradiente de densidad en el caldo del cultivo y mejorar la turbulencia en ALRs (López et al., 2013). En este tipo de biorreactores la biomasa está suspendida en la fase líquida, lo que facilita su recolección. Al no requerir agitación mecánica, sus consumos de energía son más reducidos que los de STRs.

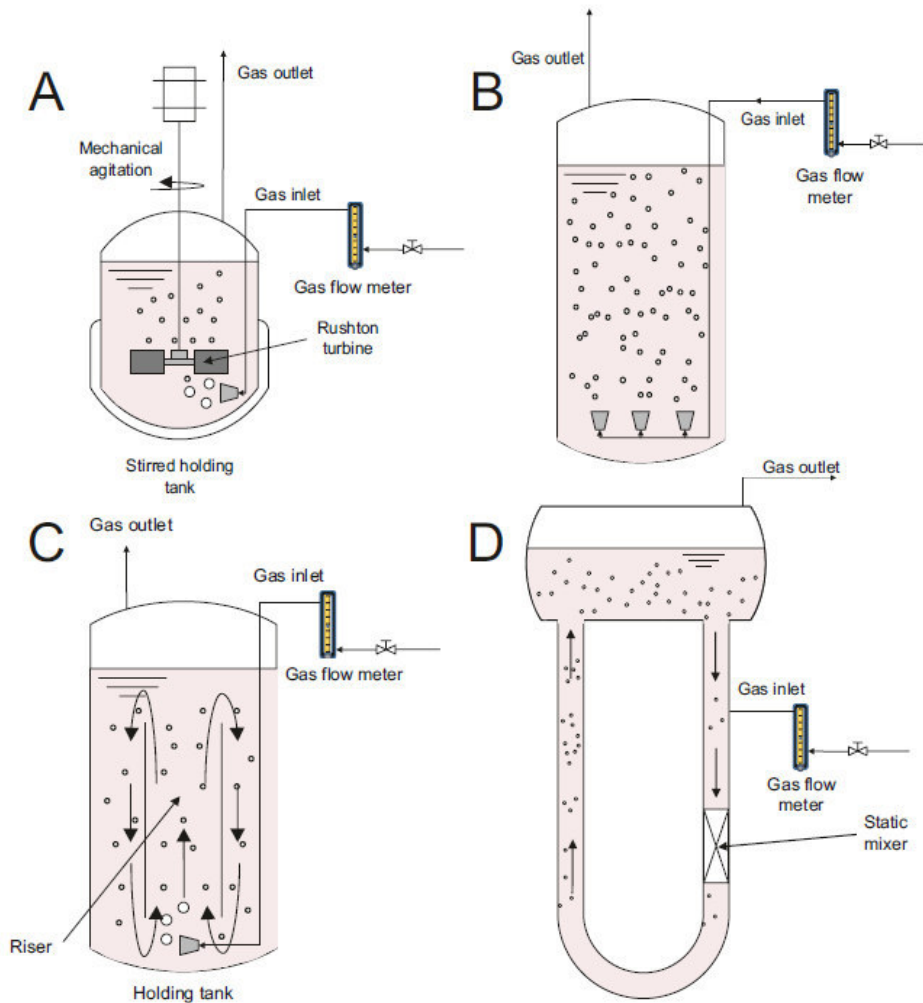


Figura 14: Biorreactores turbulentos. A: STR; B: BCB; C: ALR; D: FCLB (López et al., 2019).

1.7. Justificación

Las emisiones de metano constituyen el 20% del calentamiento global debido a la capacidad de este gas, 21 veces mayor que la del dióxido de carbono para absorber la radiación terrestre, por lo que se hace importante desarrollar tecnologías limpias y con un coste eficiente para la eliminación de metano (García Pérez et al., 2018).

Los PHAs son biopolímeros cuyas excelentes propiedades mecánicas (similares a las del propileno y polietileno) junto con su gran biodegradabilidad, les convierten en candidatos potenciales para sustituir a los plásticos derivados del petróleo (Cantera et al., 2018). Debido a esto cerca de 30 compañías en la actualidad se dedican a la producción de estos biopolímeros, siendo Meredian. Inc (300 kt anuales) y Bio-on (10 kt anuales) las principales productoras en los U.S.A y Europa respectivamente (Chen et al., 2015). El alto precio de las fuentes de carbono (30-40% de los costes de producción) limita la comercialización de los PHAs, debido a su elevado precio de mercado (5-20 € kg⁻¹ con un rendimiento de producción de 200-500 mg de PHA por gramo de biomasa) comparados con los plásticos derivados de combustibles fósiles (Bugnicourt



et al., 2014). Por esto, el metano diluido en emisiones de gas industriales es una potencial fuente de alimentación para la producción de PHAs, ya que su uso como fuente de carbono puede reducir los costes de producción considerablemente (Cantera et al., 2018).

El principal problema para la producción de PHAs a partir de metano es la baja solubilidad del metano y del oxígeno en disoluciones acuosas (Lee et al., 2015) lo cual limita la tasa de producción de PHAs, dificultando el uso de estas tecnologías para su producción a gran escala. Se han utilizado biorreactores a presión para mejorar la transferencia de materia y alcanzar un contenido en PHAs del 51%, incrementando la densidad celular de metanótrofos de 1.4 a 5 g L⁻¹, aunque crear estas condiciones es caro y puede ser perjudicial para los microorganismos. Aumentar la agitación puede mejorar la transferencia de materia reduciendo el tamaño de burbuja, pero esta forma de operación conlleva un aumento de los costes de operación (Yao et al., 2020). El uso de BCBs puede superar las limitaciones en la transferencia de materia empleando difusores de burbuja ultrafina de tamaño de poro menor de 0.5 micras (García Pérez et al., 2018) y sin necesidad de agitación (la cual conlleva mayores costes energéticos) llegando a conseguir contenidos de PHAs de 25% en masa (Khosravi Darani et al., 2019).

En los últimos dos años la Unión Europea ha adoptado una serie de estrategias destinadas a la transición de la economía europea desde una economía lineal basada en combustibles fósiles a una economía circular más renovable, adoptando medidas para mejorar el reciclaje, el tratamiento de residuos y aumentar el uso de materiales biodegradables. Para la Comisión Europea mejorar la sostenibilidad de la industria de plásticos es un factor clave en su Estrategia de Economía circular. La Estrategia de Plásticos de la UE tiende a una transición en la industria de plásticos siguiendo una estrategia de 3R (reducir, reusar, reciclar) con el objetivo de que todo plástico en el mercado sea reciclable para el año 2030, por lo que la UE reconoce la importancia de los bioplásticos (como los PHAs) para el objetivo de conseguir una bioeconomía circular europea fuerte (Pérez et al., 2020).

Se han realizado previamente trabajos en sistemas de alta transferencia (biorreactor de columna de burbujeo) que analizaron la capacidad de acumulación de metanótrofos tipo II mediante ciclos de alimentación: hambruna usando nitrato como fuente de nitrógeno y un cultivo puro, y estudiaron la influencia del tiempo de residencia del gas en el reactor (Rodríguez et al., 2020) y de la tasa de recirculación (García-Pérez et al., 2018). En este estudio se pretende comprobar, en un sistema de características similares, la influencia de la fuente de nitrógeno empleada (nitratos y amonio), de la concentración de cobre, así como de la velocidad de dilución en el enriquecimiento de comunidades de metanótrofos tipo II con capacidad de acumulación de PHA a partir de lodos activos.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue evaluar diferentes estrategias para la selección y el enriquecimiento de metanótrofos con capacidad de sintetizar PHAs (tipo II) a partir de lodos activos en un biorreactor de columna de burbujeo con recirculación interna del gas alimentado por una corriente de biogás, así como para la eliminación simultánea del contenido de metano de dicha corriente.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Evaluar la influencia de la fuente de nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+) empleada en el medio de cultivo sobre el enriquecimiento en metanótrofos de tipo II y sobre el desempeño del sistema (capacidad de eliminación de metano, productividad de biomasa, etc.).
- Estudiar el efecto de la concentración de iones Cu^{2+} en el medio de cultivo sobre el enriquecimiento en metanótrofos de tipo II y en el rendimiento del biorreactor.
- Evaluar el efecto del aumento de la velocidad de dilución en la fase de limitación de N variando el tiempo de limitación de N en el periodo de hambruna (24 h, 48 h y 72 h) sobre la selección de metanótrofos de tipo II.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Configuración del sistema

Para el desarrollo del experimento se contó con un montaje consistente en un biorreactor de columna de burbujeo (BCB) de PVC de 80 cm de altura, 2.5 L de volumen en el que se introdujo una corriente de aire y biogás con una relación molar $O_2:CH_4$ de 2:1 (Figura 15, 16). La tapa superior del biorreactor estaba provista de 4 conexiones. La primera se utilizó como línea de entrada del biogás, suministrado desde bombona con una composición $CO_2:CH_4$ 30:70% v/v, y aire. La mezcla gaseosa se alimentó a través de un set de tres difusores de acero inoxidable de 2 micras de tamaño de poro colocado en la parte inferior de la columna. La segunda de las conexiones fue utilizada como línea de salida de gases del reactor mientras que la tercera de las conexiones se utilizó para intercambio de medio mineral y recogida de muestras de la fase líquida para su posterior análisis. La última de las conexiones fue dotada de una válvula de alivio de presión por motivos de seguridad, para reducir la presión en el interior del reactor en el caso de que fuera necesario. La parte inferior del reactor estaba provista de otra conexión que fue empleada para mejorar la agitación en el reactor y conseguir despegar la fase sólida que quedaba adherida a las paredes del biorreactor y homogeneizarla con la fase líquida.

El caudal de gases tanto de entrada como de salida del sistema fue de 42 ml min^{-1} y el tiempo de residencia del gas fue de 60 min. Parte de la corriente de salida fue recirculada con una tasa de recirculación de 30 (con respecto al flujo de entrada) mediante una bomba (Watson-Marlow, EE.UU.). La corriente de recirculación se hizo pasar por un condensador de camisa refrigerada con agua a 10°C proveniente de baño térmico y posteriormente bombeada a la línea de entrada de gases del biorreactor. La temperatura se mantuvo a 25°C en una sala termostaticada. El interior del reactor se mantuvo en agitación continua mediante un agitador magnético a 500 rpm.

El flujo de biogás se fijó mediante un controlador de flujo másico. El sistema estaba provisto de rotámetros para controlar los flujos de entrada y recirculación, y de puntos de toma de muestras en las líneas de entrada, salida y recirculación para extraer las muestras de fase gaseosa a analizar y determinar la caída de presión en el reactor.

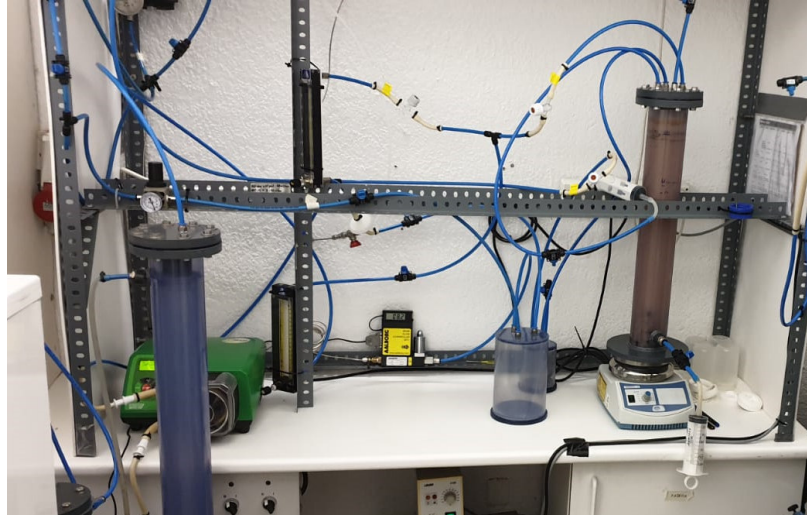


Figura 15. Imagen del sistema experimental.

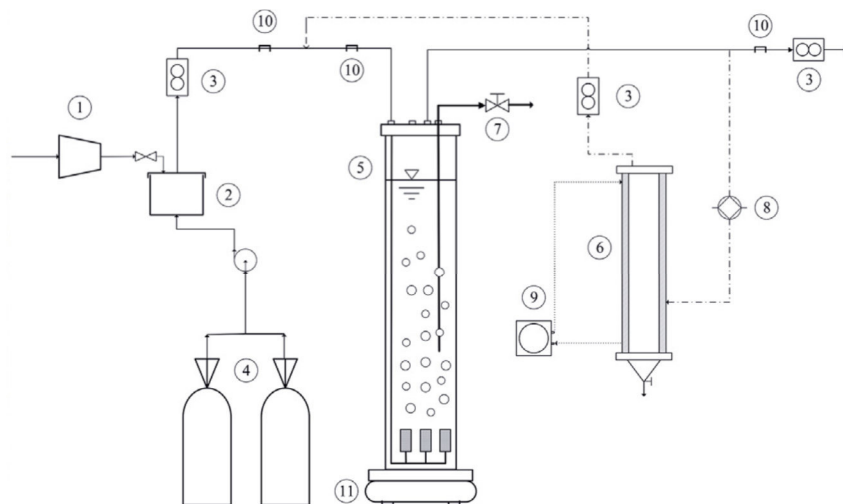


Figura 16. Esquema del sistema experimental: 1) compresor de aire, 2) cámara de mezcla, 3) rotámetros, 4) bombonas biogás, 5) reactor de columna de burbujeo, 6) condensador, 7) válvula de alivio de presión, 8) bomba de recirculación de gases, 9) baño termostático, 10) toma de muestra de gases, 11) agitador magnético, 12) controlador de flujo másico (Rodríguez et al., 2020).

Se realizaron tres experimentos diferentes, variando la fuente de nitrógeno del medio mineral y la concentración de micronutrientes. Cada uno de estos experimentos es descrito en detalle a continuación.

3.2. Test 1. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NH_4^+ como fuente de nitrógeno

3.2.1 Medio mineral e inóculo

El medio mineral utilizado fue una modificación del medio mineral salino con nitrato de Whittenbury para el cultivo de metanótrofos. La composición del medio fue (g L^{-1}): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.08; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2; FeEDTA , $1.9 \cdot 10^{-3}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.087 \cdot 10^{-3}$; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.28 \cdot 10^{-3}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \cdot 10^{-3}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.05 \cdot 10^{-3}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.04 \cdot 10^{-3}$; H_3BO_3 , $0.0015 \cdot 10^{-3}$; CoCl_2 , $0.00027 \cdot 10^{-3}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.002 \cdot 10^{-3}$; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $0.001 \cdot 10^{-3}$; KH_2PO_4 , $0.26 \cdot 10^{-3}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0.83 \cdot 10^{-3}$. Como fuente de nitrógeno se empleó NH_4^+ en concentraciones de 0.226 g L^{-1} , 0.452 g L^{-1} , 0.904 g L^{-1} (56 ppm N, 112 ppm N y 224 ppm N respectivamente). El pH del medio se ajustó a 6.8.

Como inóculo, se utilizó fango activo suministrado por la depuradora de aguas de Valladolid.

3.2.2 Modo de operación

El experimento se prolongó durante 46 días, operando de la siguiente forma: Inicialmente se centrifugaron 300 mL de fango activo, siendo la biomasa obtenida inoculada posteriormente en el reactor en un volumen inicial de 2 L NFMS (medio mineral sin nitrógeno) para una concentración inicial de 0.6 g L^{-1} . El día posterior a la inoculación se añadieron 500 mL NFMS para aumentar el volumen de trabajo a 2.5 L. Los metanótrofos tipo II tienen la capacidad de sintetizar PHAs bajo condiciones limitantes de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo o magnesio en el medio, y usar éste como fuente de energía y carbono. Por tanto, como estrategia de enriquecimiento se sometió al cultivo a diferentes ciclos en ausencia y presencia de N de la siguiente forma (Tabla 09).

Tabla 09: Test 1 (NH_4^+ fuente de nitrógeno).

Etapa	Alimentación: hambruna (h)	Concentración NMS ($\text{g L}^{-1} \text{NH}_4^+$ / ppm N)	Duración (días)	Descarte biomasa (mL d^{-1})
1	24:24	0.23/56	4	-
2	24:24	0.45/112	6	-
3	24:24	0.90/224	6	-
4	24:24	0.90/224	16	300
5	24:48	0.90/224	16	300

Velocidad de dilución (d): 0.2 d^{-1} .

3.3. Test 2. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno

3.3.1 Medio mineral e inóculo

Se utilizaron diferentes medios minerales con diferentes concentraciones de nitrógeno, utilizando KNO_3 como fuente de nitrógeno. Las composiciones fueron (g L^{-1}): KNO_3 , 0.404 (56 ppm N), 0.808 (112 ppm N), 1.617 (224 ppm N). El resto del medio mineral se preparó tal y como se detalla en el apartado 3.2.1. El pH del medio se ajustó a 6.8.

Como inóculo, se utilizó fango activo suministrado por la depuradora de aguas de Valladolid.

3.3.2 Modo de operación

Inicialmente, el reactor fue inoculado con fango activo de la línea de recirculación (10% v/v) en 2.5 L de medio mineral con una concentración N-NO_3^- de 56 ppm, siendo la fuente de nitrógeno empleada nitrato de potasio. Como estrategia de enriquecimiento se sometió al cultivo a diferentes ciclos en ausencia y presencia de N de la siguiente forma (Tabla 10).

Tabla 10: Test 2 (KNO_3 fuente de nitrógeno).

Etapas	Alimentación: hambruna (h)	Concentración NMS ($\text{g L}^{-1} \text{KNO}_3$ / ppm N)	Duración (días)	Descarte biomasa (mL d^{-1})
1	24:24	0.40/56	6	-
2	24:24	0.81/112	6	-
3	24:24	1.62/224	6	-
4	24:24	1.62/224	16	300
5	24:48	1.62/224	16	300

Velocidad de dilución (d): 0.2 d^{-1} .

3.4. Test 3. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno y baja concentración de Cu^{2+} ($0.16 \mu\text{M}$)

3.4.1 Medio mineral e inóculo

Se emplearon medios minerales para el cultivo de metanótrofos como los descritos en el apartado 3.2.2. En éstos la concentración de Cu^{2+} se redujo a $0.16 \mu\text{M}$, que corresponde a una concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de $0.04 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$. El aporte de nitrógeno, al igual que en el ensayo anterior, se llevó a cabo con KNO_3 (Tabla 11). El pH del medio se ajustó a 6.8.

Como inóculo, se utilizó fango activo de la línea de recirculación suministrado por la depuradora de aguas de Valladolid.

3.4.2 Modo de operación

Inicialmente el reactor fue inoculado con 0.25 L (10% v/v) de fango activo centrifugado, en 2.5 L de NMS (56 ppm N-NO₃⁻) para una concentración inicial de 0.8 g L⁻¹ de biomasa en el reactor. La fuente de nitrógeno empleada fue nitrato de potasio. Como estrategia de enriquecimiento se sometió al cultivo a diferentes ciclos en ausencia y presencia de N de la siguiente forma (Tabla 11).

Tabla 11: Test 3 (KNO₃ fuente de nitrógeno, Cu²⁺ 0.16 μM).

Etapas	Alimentación: hambruna (h)	Concentración NMS (g L ⁻¹ KNO ₃ / ppm N)	Duración (días)	Descarte biomasa (mL d ⁻¹)
1	24:24	0.40/56	6	-/500
2	24:24	0.81/112	6	-/500
3	24:24	1.62/224	6	-/500
4	24:48	1.62/224	18	-/1000/-
5	24:72	1.62/224	14	-/1500/-/-

Velocidad de dilución (D): Etapas 1, 2, 3: 0.2 d⁻¹; Etapa 4: 0.2 d⁻¹ (NMS) día 1, 0.4 d⁻¹ (NFMS) día 2, sin intercambio día 3; Etapa 5: 0.2 d⁻¹ (NMS) día 1, 0.6 d⁻¹ (NFMS) día 2, sin intercambio días 3 y 4.

Después de cada uno de los tres experimentos realizados se procedió a la parada del reactor y su posterior limpieza y acondicionamiento antes del arranque del reactor y su inoculación para el siguiente experimento. En el desarrollo de los tres experimentos se tomaron muestras de las corrientes de entrada, salida y recirculación para medir las concentraciones de CH₄, O₂ y CO₂ mediante cromatografía de gases (GC-TCD). Se tomaron muestras líquidas del medio del interior del reactor diariamente para medir pH y concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV). Se centrifugaron las muestras líquidas para devolver los pellets de biomasa al reactor resuspendidos en medio fresco y el sobrenadante utilizado para realizar los análisis correspondientes: nitrógeno total (diariamente), carbono total, orgánico e inorgánico (tres veces a la semana). Muestras líquidas de 1.5 mL (en duplicado) fueron centrifugadas para realizar análisis de PHAs. La caída de presión y el caudal de gases de salida también fueron controlados diariamente.

3.5. Métodos analíticos

Las concentraciones de los gases CH₄, O₂ y CO₂ en las corrientes de entrada, salida y recirculación del reactor se midieron en un cromatógrafo de gases 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 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. Se utilizó helio como gas portador siendo el tiempo del análisis de 5 minutos. La



caída de presión en el reactor se midió con un medidor de presión digital PI1696. El caudal de gases de salida se determinó por medición en probeta mediante el método de desplazamiento de líquido. El pH se midió utilizando un electrodo de membrana de vidrio modelo PH BASIC 20 (Crison, España). Las concentraciones de aniones (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , Cl^-) fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC-IC después de ser filtradas las muestras (1 mL) a través de filtros 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 un protector de aniones IC-PAK (Waters, E.E.U.U.). Las muestras de caldo de cultivo del reactor fueron centrifugadas durante 8 minutos a 10000 rpm y las muestras destinadas a análisis de PHAs (1.5mL en duplicado) fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm.

El análisis del nitrógeno total (TN), carbono orgánico total (TOC) y carbono inorgánico (IC) presentes en el sobrenadante y previamente filtrado con filtro de 45 micras se midieron utilizando un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, Japón) equipado con un módulo de TNM-1 de quimioluminiscencia.

El análisis de SST y SSV se realizaron de acuerdo al método estándar (APHA, 2005), filtrando a vacío las muestras sobre un filtro pesado anteriormente, que fue introducido posteriormente en una estufa a 105°C durante aproximadamente 24 h. Se dejaron enfriar los filtros en desecador y se pesaron para determinar los SST. Finalmente, los filtros fueron introducidos en mufla a 550°C durante otras 24 horas y posteriormente enfriados y vueltos a pesar para determinar los SSV.

El contenido en PHAs se determinó mediante protocolo de análisis de biopolímeros (PHB-PHV) con patrón interno de ácido benzoico y patrones de co-polímero PHB-PHV (88%PHB-12%PHV). Se añadió 1 mL de una disolución 1-propanol: HCl (80:20) a los pellets de biomasa obtenidos de las muestras de PHAs de 1.5 mL y, previa agitación en vortex, se añadieron 2mL de cloroformo y 5 μL de patrón interno (5 g L^{-1} de ácido benzoico en propanol). Las muestras así obtenidas fueron agitadas nuevamente y sometidas a digestión en termorreactor durante 4 horas. Posteriormente, y una vez enfriadas a temperatura ambiente, se añadió 1mL de agua desionizada a las muestras, que posteriormente fueron agitadas nuevamente. Una vez conseguida la separación de fases, la fase orgánica fue recogida y filtrada en filtro de 22 micras para ser analizada mediante cromatografía de masas GC-MS para cuantificar la concentración de PHAs (Chen et al., 2020).



3.6. Cálculos

Se definen a continuación los parámetros utilizados para evaluar la eficacia del sistema para cada uno de los experimentos realizados.

Capacidad de eliminación de metano ($\text{gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$):

$$EC = \frac{(CH_{4,in} - CH_{4,out})(g \text{ m}^{-3}) \times F_{in}(\text{m}^3 \text{ h}^{-1})}{V(\text{m}^3)} \quad [\text{Ec.9}]$$

Eficiencia de eliminación de metano (%):

$$RE = \frac{(CH_{4,in} - CH_{4,out})(g \text{ m}^{-3})}{CH_{4,in}(g \text{ m}^{-3})} \times 100 \quad [\text{Ec. 10}]$$

Producción de CO_2 ($\text{gCO}_2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$):

$$PCO_2 = \frac{(CO_{2,out} - CO_{2,in})(g \text{ m}^3) \times F_{in}(\text{m}^3 \text{ h}^{-1})}{V(\text{m}^3)} \quad [\text{Ec. 11}]$$

Siendo:

$\text{CH}_{4,in}$ y $\text{CH}_{4,out}$ las concentraciones de metano en la línea de entrada y salida de gases del reactor, respectivamente.

$\text{CO}_{2,in}$ y $\text{CO}_{2,out}$ las concentraciones de dióxido de carbono en las líneas de entrada y salida de gases del reactor, respectivamente.

F_{in} el caudal total de entrada del gas.

V el volumen de trabajo del reactor.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

4. RESULTADOS

Se analizaron los datos obtenidos durante todos los días del ciclo de enriquecimiento para cada uno de los tres experimentos y se representaron los resultados obtenidos durante cada uno de los días. Se obtuvo una representación con respecto del tiempo de los parámetros más importantes del sistema, que se detallan a continuación para cada uno de los experimentos.

4.1. Test 1. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NH_4^+ como fuente de nitrógeno

4.1.1. Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2

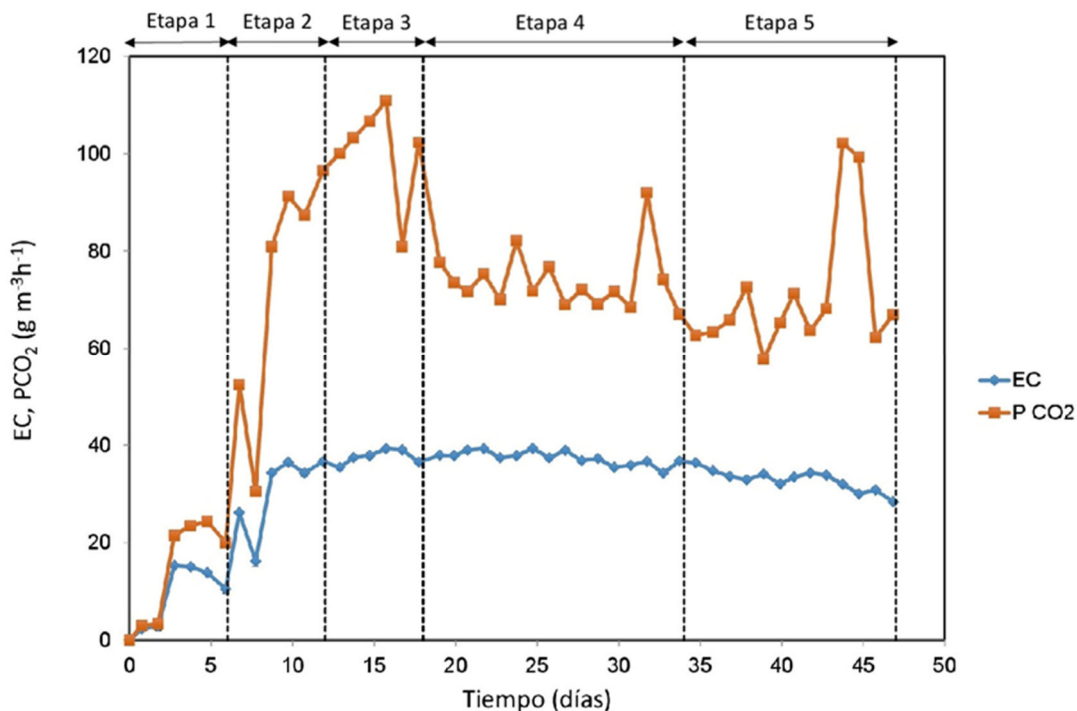


Figura 17: Variación temporal capacidad de eliminación (EC) y producción de CO_2 .

Se pudo observar (figura 17) como la eliminación de metano fue aumentando progresivamente según la concentración del medio rico en nitrógeno fue aumentando (0.226 g L^{-1} , 0.452 g L^{-1} y $0.904 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$) debido al aumento en la concentración de biomasa en el reactor. Se comprobó que a partir del día 12 del experimento (día en el que se empezó a intercambiar NMS $0.904 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$, etapa 3) la EC comenzó a estabilizarse alcanzando sus valores máximos. A partir del mencionado día la capacidad de eliminación media obtenida fue de $34.4 \pm 5.7 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y la eficacia de eliminación media obtenida fue de $56.1 \pm 9.3\%$, lo que conllevó que el proceso estuvo limitado por transferencia de materia gas-líquido de CH_4 .

Los valores máximos se alcanzaron en la cuarta etapa de 16 días de duración en la que se operó con ciclos de alimentación: hambruna de N (24h:24h) y una concentración de $0.904 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$. Se pudo observar que en la siguiente etapa con ciclos de alimentación: hambruna de N (24h:48h) la EC disminuyó lentamente hasta el final del experimento, aunque esta disminución no fue muy acusada.

4.1.2. Nitrógeno total, Sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB

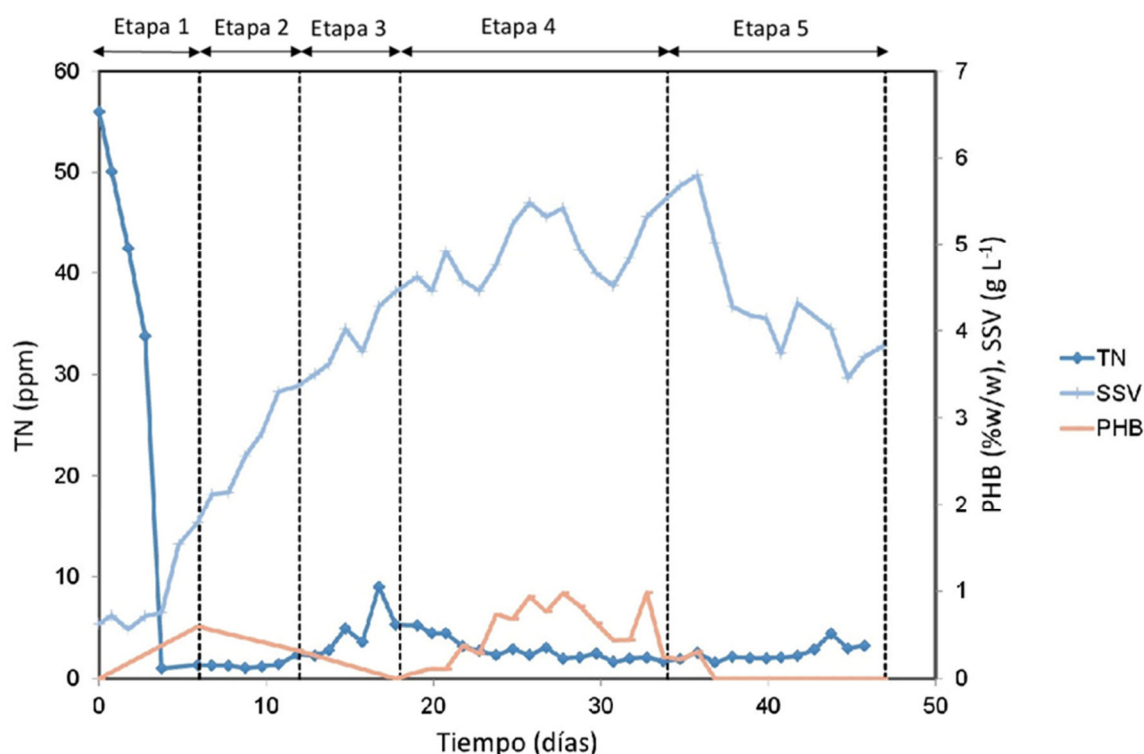


Figura 18: Variación temporal de nitrógeno total (TN), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y PHB.

El nitrógeno total (TN) descendió bruscamente a partir del cuarto día del experimento, para permanecer en valores inferiores a 10 ppm (valor medio de $2.75 \pm 1.50 \text{ ppm}$) durante todo el resto del experimento, lo cual indicó que se trabajó en condiciones limitantes de nitrógeno durante la totalidad del experimento (condiciones bajo las cuales los metanótrofos tipo II tienen la capacidad de sintetizar PHAs).

El valor de los SSV aumentó progresivamente en las primeras etapas del experimento, en las que no se retira biomasa del reactor al intercambiar el medio mineral. Se pudo apreciar que a partir del día 18 del experimento (comienzo de la cuarta etapa en la que se comenzó a retirar biomasa) la concentración de SSV empezó a alcanzar sus valores máximos y a estabilizarse, obteniéndose un valor medio de $4.42 \pm 0.46 \text{ g L}^{-1}$.

La concentración de PHB obtenida en este experimento fue muy limitada, sin superar nunca valores mayores del 1% en masa (Figura 18).

El pH se mantuvo en un valor medio de 6.77 ± 0.30 durante la realización del experimento, ajustándose a las condiciones de operación definidas en el apartado anterior (pH 6.8).

4.2. Test 2. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno

4.2.1. Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2

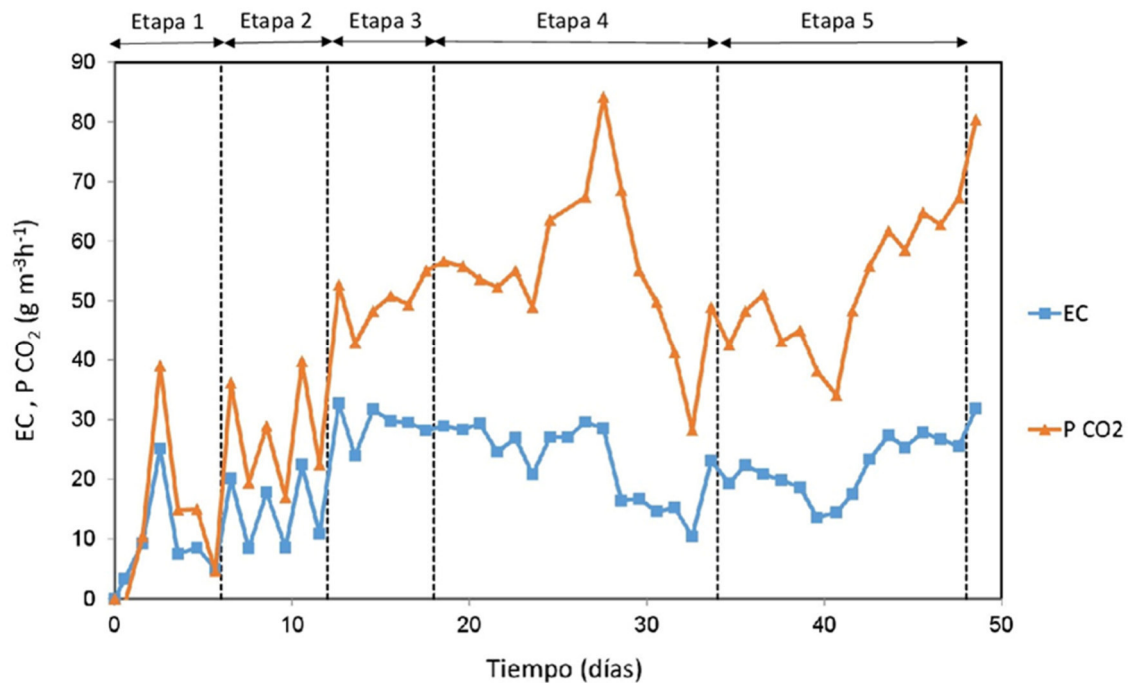


Figura 19: Variación temporal capacidad de eliminación (EC) y producción de CO_2 .

La eliminación de metano aumentó progresivamente según la concentración de nitrógeno del medio se fue incrementando (56, 112, 224 ppm) hasta alcanzar un valor de $33 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ al final del experimento. Se pudo apreciar también un aumento y disminución dentro de cada etapa de enriquecimiento según se alternaba entre medio con nitrógeno (NMS) y medio sin nitrógeno (NFMS). La eliminación de metano acabó estabilizándose a partir de la tercera etapa del experimento (224 ppm N), momento en que dejó de limitar la actividad biológica en el proceso y pasó a limitar el transporte. En dicha fase la eliminación media de metano se situó en $23.4 \pm 6.2 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ con una eficiencia media de eliminación de $40.2 \pm 11.9\%$ (figura 19).

También se pudo observar que en el día 27 de experimentación se empezó a producir una caída en la eliminación de metano que alcanzó su valor mínimo el día 32 del experimento de la cual el sistema logro recuperarse en los tres días posteriores. A partir del día 35 del experimento se observó otra caída en la eliminación que alcanzó su valor mínimo (menos pronunciado que el anterior) el día 40 del experimento, a partir del cual el sistema logró recuperarse de nuevo hasta el final del experimento, lo cual hizo pensar en un cambio en la población bacteriana del reactor.

4.2.2. Nitrógeno total, sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB

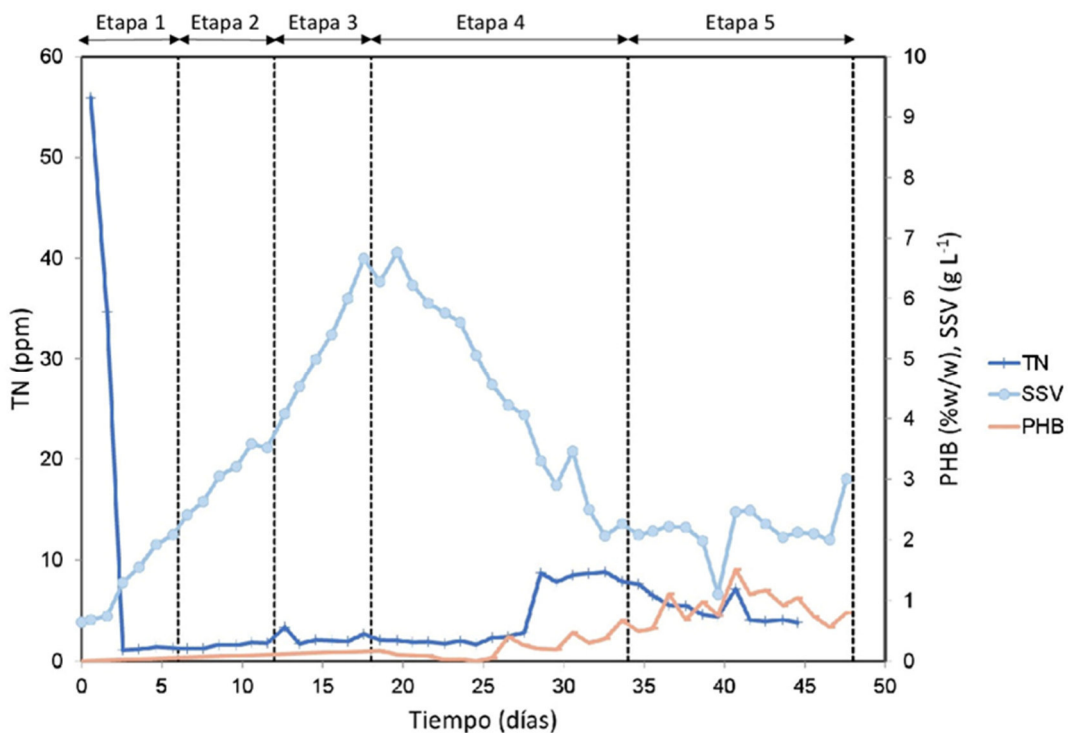


Figura 20: Variación temporal de nitrógeno total (TN), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y PHB.

Se observó (figura 20) que el nitrógeno total descendió bruscamente a partir del tercer día del experimento (valor medio de 3.82 ± 2.53 ppm), lo cual indicó que en este caso también se trabajó en condiciones limitantes de nitrógeno durante la totalidad del experimento. En el día 27 hubo un aumento brusco en la concentración de TN en el reactor, coincidiendo con la disminución en la EC. Este fenómeno pudo deberse a una conversión de nitrato a nitrito, que pudo inhibir la degradación de metano.

Se pudo apreciar que la concentración de SSV fue aumentando progresivamente durante las primeras etapas del ciclo (en las cuales no se retiró biomasa del reactor). En la cuarta etapa del ciclo (a partir del día 18). A partir del día 25 del experimento el valor de los SSV comenzó a disminuir, debido a la retirada de biomasa del reactor. Esta tendencia continuó en la quinta

etapa del experimento en la cual se consiguió mantener los SSV en un valor estable de $2.16 \pm 0.39 \text{ g L}^{-1}$.

La concentración de PHB obtenida en este experimento fue baja (figura 20), obteniéndose un valor máximo de 1.51% w/w el día 40, en la quinta etapa del experimento.

En este caso el pH se mantuvo en un valor medio de 6.81 ± 0.12 durante la realización del experimento, ajustándose también a las condiciones de operación definidas en el apartado anterior (pH 6.8).

4.3. Test 3. Enriquecimiento de metanótrofos tipo II con NO_3^- como fuente de nitrógeno y baja concentración de Cu^{2+} ($0.16 \mu\text{M}$)

4.3.1. Capacidad de eliminación de CH_4 y producción de CO_2

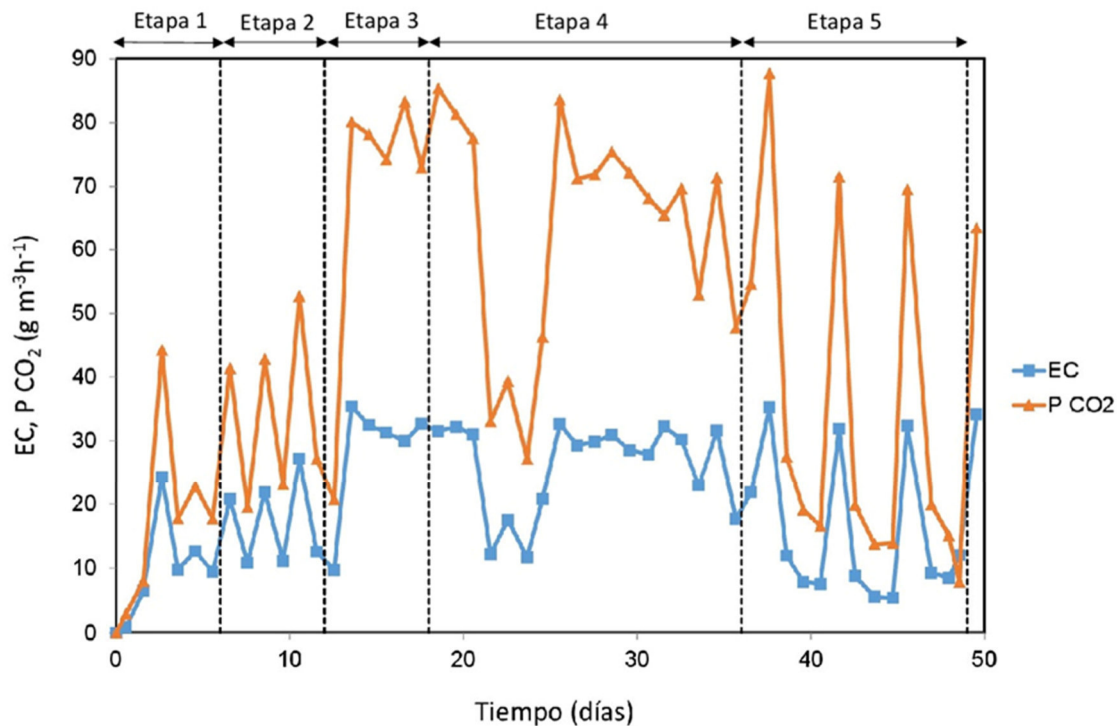


Figura 21: Variación temporal capacidad de eliminación (EC) y producción de CO_2 .

Igual que en los experimentos anteriores, en las primeras etapas del ciclo de enriquecimiento la capacidad de eliminación fue aumentando progresivamente según aumentó la concentración de nitrógeno en el medio mineral de entrada al reactor (NMS) (56 ppm, 112ppm, 224 ppm N-NO_3^-). A partir del día 12 del experimento (día en el que se comenzó a intercambiar NMS 224 ppm N-NO_3^- , etapa 3) la capacidad de eliminación se estabilizó, continuando esta tendencia en

la siguiente etapa del experimento. Esto indicó el momento en que el proceso pasó de estar limitado por actividad biológica a estar limitado por transporte. La capacidad de eliminación y eficiencia de eliminación medias durante las etapas 3 y 4 del experimento (donde éstas se mantuvieron estables) fueron de $26.8 \pm 7.6 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $36.5 \pm 13.0\%$, respectivamente. Hubo que tener en cuenta un brusco descenso en la EC durante los días 21-24 del ciclo de enriquecimiento, que pudo ser debido al cambio en el modo de operación al incrementar las presiones selectivas y aumentar la duración de los ciclos de alimentación: hambruna (figura 21).

Se comprobó que en la última etapa del ciclo de enriquecimiento (en la cual se aumentaron aún más las presiones selectivas alimentando el reactor en ciclos de alimentación: hambruna de 24h: 72h, día 36 del experimento), tanto la EC como RE presentaron valores oscilantes, alcanzando su máximo 24 horas después de la alimentación con NMS y cayendo considerablemente durante las 72 horas de hambruna.

4.3.2. Nitrógeno total, Sólidos suspendidos volátiles y acumulación de PHB

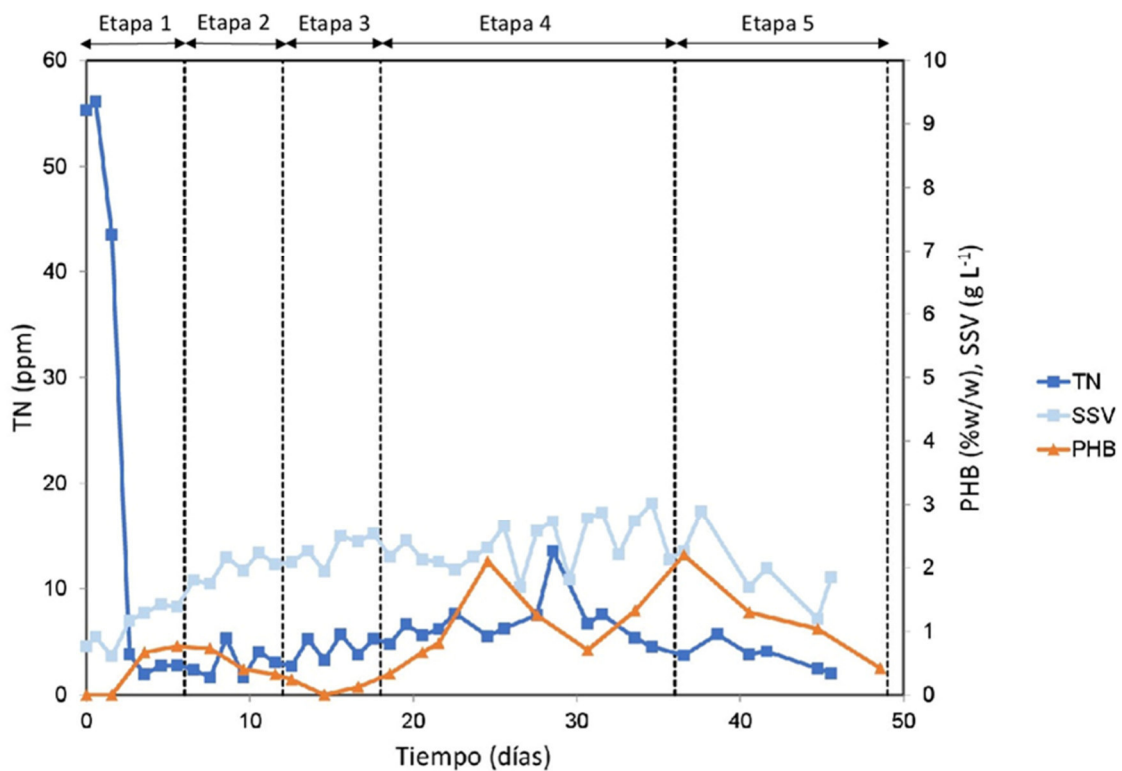


Figura 22: Variación temporal de nitrógeno total (TN), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y PHB.

Se pudo comprobar que, al igual que en los experimentos anteriores (figura 22), el nitrógeno total (descendió bruscamente a partir del tercer día del experimento (valor medio de 4.58 ± 2.43



ppm), lo cual indicó que se trabajó en condiciones limitantes de nitrógeno durante la totalidad del mismo.

La concentración de SSV fue aumentó progresivamente en las primeras etapas del ciclo de enriquecimiento. La media de SSV para las etapas 3 y 4 (224 ppm N-NO₃⁻, donde su valor se mantuvo más estable) fue de 2.33 ± 0.35 g L⁻¹. En la cuarta etapa, en la que se aumentaron las presiones selectivas se observó una mayor oscilación en los valores de SSV.

Se pudo observar también que, en la última etapa del experimento, en la que se aumentaron las presiones selectivas al máximo (ciclos de alimentación: hambruna de 24h: 72h) los valores de la concentración de SSV experimentaron un descenso considerable con consecuencia de la falta de nitrógeno estructural para formar biomasa.

La concentración de PHB no alcanzo valores muy elevados, obteniéndose un máximo del 2.1% w/w el día 25 del experimento.

Igual que en los anteriores experimentos, el pH se mantuvo en un valor medio de 6.70 ± 0.13 durante su duración, ajustándose también a las condiciones de operación definidas en el apartado anterior (pH 6.8).



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se analizaron conjuntamente los tres experimentos, comparando las principales variables y analizando su dependencia con las diferentes condiciones aplicadas en cada experimento.

5.1. Capacidad de eliminación de CH₄ (EC)

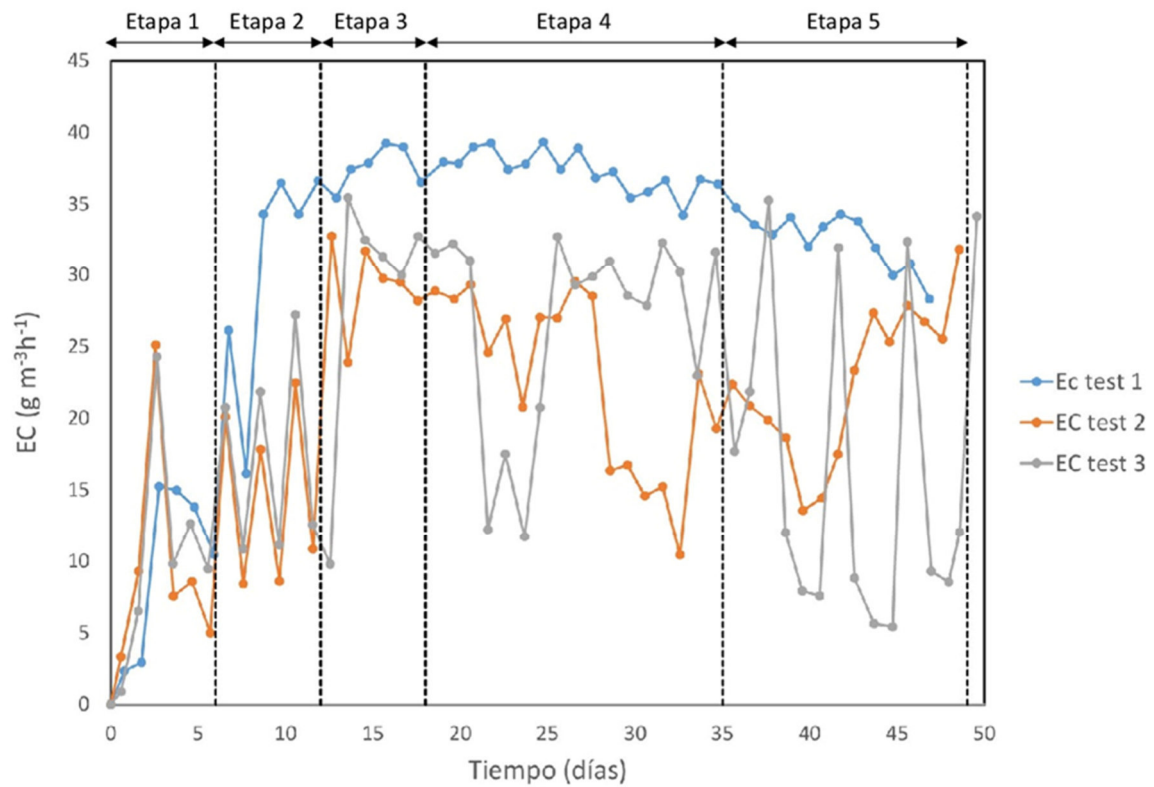


Figura 23: Comparación de la EC de metano. Test1: fuente de nitrógeno NH₄⁺; Test 2: fuente de nitrógeno NO₃⁻; Test 3: fuente de nitrógeno NO₃⁻ y concentración Cu²⁺ 0.16μM (reducida).

Tabla 12: Capacidad de eliminación (EC) y eficiencia de eliminación (RE) para los test realizados.

	Test 1	Test 2	Test 3
EC gCH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	34.4 ± 5.7	23.4 ± 6.2	26.8 ± 7.6
RE (%)	56.1 ± 9.3	40.2 ± 11.9	36.5 ± 13.0



5.1.1. Influencia de la fuente de nitrógeno

Comparando los tres experimentos (Figura 23) se pudo determinar que en el primer test (NH_4^+ como fuente de nitrógeno) se alcanzaron unas capacidades de eliminación de metano mayores que en los otros dos test restantes (Tabla 12) en los que se utilizó nitrato de potasio como fuente de nitrógeno. En el primer test se pudo comprobar además que, una vez llegada la cuarta fase del ciclo de enriquecimiento (alimentado el reactor con NMS con la concentración más elevada de nitrógeno para cada experimento) los valores de la capacidad de eliminación de metano se mantuvieron más estables durante la duración del experimento, mientras que en los dos test restantes (NMS NO_3^-) la capacidad de eliminación osciló más durante la duración del mismo. De estos resultados se pudo deducir que el empleo de amonio como fuente de nitrógeno produjo mejores resultados, obteniendo la capacidad de eliminación media más elevada ($34.4 \pm 5.7 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) y manteniéndose ésta más estable durante la duración del experimento. Es de sobra sabido que el amonio conlleva mayores rendimientos de producción de biomasa (lo que confiere estabilidad al proceso) y el nitrato puede reducirse a nitrito, que es tóxico para los microorganismos (Rodríguez et al., 2020)

5.1.2. Influencia de la concentración de iones Cu^{2+}

Comparando los dos últimos test realizados (NMS NO_3^-) se pudo observar que tanto en el test 2 como en el test 3 (concentración de iones de cobre reducida) las capacidades de eliminación medias obtenidas fueron similares, aunque ligeramente mayores en el test 3 (concentración de iones de cobre reducida) (Tabla 12). Se pudo observar que en el último test ($\text{Cu}^{2+} 0.16 \mu\text{M}$) los valores de la capacidad de eliminación oscilaron más durante la realización del experimento, lo cual se pudo deber a las diferentes condiciones de operación en cada uno de los dos test, ya que en las dos últimas fases de este último experimento se aumentaron las presiones selectivas aumentando la duración de los ciclos de alimentación: hambruna (24h:48h y 24h:72h). Fue en estos dos últimos ciclos del test donde se observó una mayor variación en los valores de capacidad de eliminación. De estos datos se pudo deducir que el empleo de una concentración reducida de iones de cobre aumentó ligeramente la capacidad de eliminación de metano ($26.8 \pm 7.6 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) a costa de una mayor variabilidad de los resultados en la última etapa del experimento.

5.1.3. Influencia de la velocidad de dilución (D)

Analizando la capacidad de eliminación en el test 3 ($\text{Cu}^{2+} 0.16 \mu\text{M}$) (figura 23) se pudo observar que al final de la cuarta etapa (día 30) (donde se aumentaron las presiones selectivas y se varió la velocidad de dilución en cada uno de los días del ciclo de alimentación: hambruna) y sobre todo durante la quinta etapa (donde se aumentaron aún más las presiones selectivas) la capacidad de eliminación de metano perdió su estabilidad, alcanzando máximos más elevados que los obtenidos en el test 2 (mayor concentración de iones de cobre) 24 horas después de la etapa de alimentación y cayendo en los valores mínimos más pequeños de todos los

experimentos tras las 72 horas de la etapa de hambruna, repitiéndose este comportamiento durante todos los días de dicha etapa.

Los valores de capacidad de eliminación obtenidos (Tabla 12) fueron comparables a los obtenidos por García-Pérez et al. (2018) en un BCB empleado para la producción de PHB y la eliminación simultánea de metano utilizando como inóculo un cultivo puro de *Methylocystis hirsuta* operando con una tasa de recirculación de 15 y un tiempo de residencia de 30 minutos y consiguiendo así una capacidad de eliminación de $27.9 \pm 2.1 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, inferiores a los obtenidos en el primer test (NH_4^+ como fuente de nitrógeno) y ligeramente superiores a los obtenidos en los test 2 y 3 (NO_3^- como fuente de nitrógeno).

Valores de capacidad de eliminación obtenidos por Rodríguez et al. (2020) en BCB inoculado como en el caso anterior con un cultivo puro de *Methylocystis hirsuta* y operando en las mismas condiciones (tasa de recirculación de 30 y tiempo de residencia de 60 minutos) que en los tres test realizados en el presente estudio fueron de $40.2 \pm 0.3 \text{ gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, mayores que en cualquiera de los tres test analizados (tabla 12).

5.2. Acumulación de polihidroxibutirato (PHB)

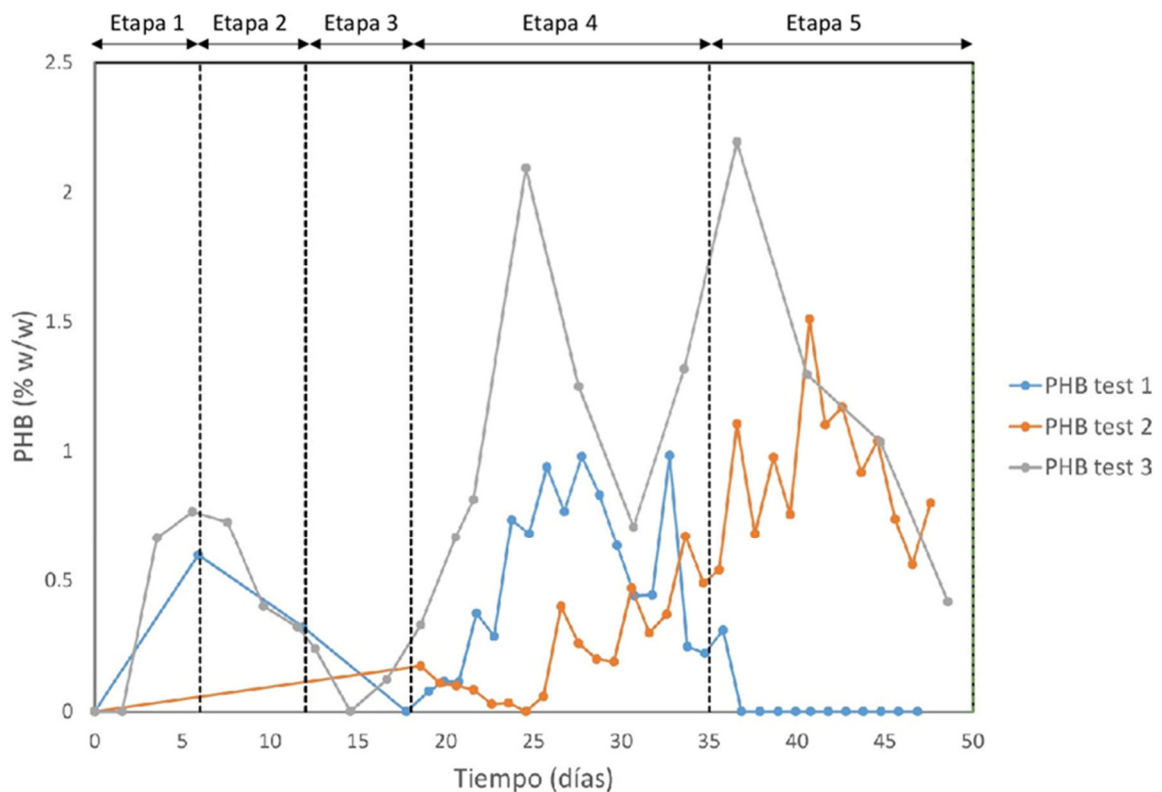


Figura 24: Comparación del contenido de PHB en la biomasa. Test1: fuente de nitrógeno NH_4^+ ; Test 2: fuente de nitrógeno KNO_3 ; Test 3: fuente de nitrógeno NO_3^- y $[\text{Cu}^{2+}] = 0.16 \mu\text{M}$.

Tabla 13: Acumulación máxima PHB para cada experimento.

PHB máximo (% w/w)		
Test 1	Test 2	Test 3
0.98	1.10	2.10

5.2.1. Influencia de la fuente de nitrógeno

Comparando los tres experimentos se pudo determinar que la concentración de PHB obtenida resulto ser superior en el test 3 (utilizando NO_3^- como fuente de nitrógeno y una concentración reducida de iones de cobre). Se obtuvieron máximos superiores al 2% w/w (Tabla 13) en las últimas fases del experimento en las que se aumentaron las presiones selectivas y se incrementaron los ciclos de alimentación hambruna (24h:48h y 24h:72h), aunque el bajo resultado obtenido no permite afirmar que el empleo de nitrato de potasio en vez del de NH_4^+ como fuente de nitrógeno favorezca la selección de metanótrofos tipo II acumuladores de PHAs. En general, los contenidos de PHB observados en este estudio fueron muy inferiores a los reportados con cepas puras acumuladoras de PHB en condiciones de operación similares (10-40%)(Rodríguez et al., 2020; García-Pérez et al., 2018))

5.2.2. Influencia de la concentración de iones Cu^{2+}

El valor máximo de PHB se obtuvo en el tercer test realizado, con una concentración reducida de iones de cobre (tabla 13) pero igual que lo dicho en el apartado anterior, el bajo valor obtenido no permite afirmar que una reducción en la concentración de iones de cobre facilite la síntesis de PHAs. Se concluye por lo tanto que una baja concentración de cobre no contribuye a crear presiones selectivas suficientemente efectivas para promover el enriquecimiento de comunidades de metanótrofos tipo II.

5.2.3. Influencia de la velocidad de dilución (D)

Se puede apreciar (Figura 24) que en el tercer test (Cu^{2+} 0.16 μM) se alcanzaron los valores máximos de PHAs de entre todos los experimentos realizados en la cuarta y quinta etapas de dicho test (en las cuales se aumentaron las presiones selectivas y se varió la velocidad de dilución en los diferentes días del ciclo de alimentación: hambruna). Este resultado podría llevar a pensar que un aumento de las presiones selectivas afectó de manera positiva a la capacidad de síntesis de PHAs en el reactor. Aun así, los resultados obtenidos en dicho test, aunque mayores que en el resto de test realizados, demostraron que la síntesis de PHAs fue muy reducida.



Los experimentos anteriormente mencionados en el punto 5.1. (García-Pérez et al., 2018 y Rodríguez et al., 2020) y dedicados a la síntesis de PHAs y eliminación simultánea de metano consiguieron unos valores máximos del 40.0% y 23.2% w/w respectivamente. Los valores de PHAs máximos obtenidos por Rahnama et al. (2012) en un BCB sin recirculación, inoculado con un cultivo puro de *Methylocystis hirsuta* y alimentado por una mezcla de aire y gas natural fueron del 42.5% w/w. Del mismo modo los valores máximos obtenidos por Sundstrom y Criddle (2015) en un biorreactor de alto rendimiento inoculado con un cultivo puro de *Methylocystis parvus* alcanzaron un 49.4% w/w. Todos ellos son valores muy superiores a cualquiera de los obtenidos en los tres ensayos llevados a cabo en este estudio, por lo que se puede afirmar que el enriquecimiento de metanótrofos tipo II en el reactor no se logró satisfactoriamente bajo ninguna de las condiciones aplicadas.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



6. CONCLUSIONES

Durante la realización de los tres ciclos de enriquecimiento completos para los tres experimentos se pudo determinar que los resultados más positivos se obtuvieron en el primer experimento (enriquecimiento con amonio como fuente de nitrógeno) con respecto a la capacidad de eliminación de metano y la eficiencia de eliminación. Aunque se obtuvieron máximos puntuales mayores en los otros experimentos, la media de eliminación de metano fue superior en el primer test y se mantuvo más estable durante la realización de todo el ciclo de enriquecimiento.

Con respecto a la producción de PHB se observó que en el tercer test se alcanzó la concentración más elevada con valores superiores al 2% w/w, aunque cabe destacar que la síntesis intracelular de éstos en el reactor fue muy reducida, de lo que se pudo deducir que el enriquecimiento de metanótrofos tipo II en el reactor no se logró satisfactoriamente en ninguno de los test realizados.

De los datos anteriores se pudo concluir que se deberían probar otras condiciones de operación, otro tipo de inóculo o variar la concentración de alguno de los nutrientes del medio, para intentar conseguir unas condiciones que favorezcan la selección de metanótrofos tipo II sobre los metanótrofos tipo I, y lograr así la producción de PHA a partir de metano.



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Anthony C (2011) How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway. *SciProg* 94:109–137.
<https://doi.org/10.3184/003685011X13044430633960>
2. Bédard C, Knowles R (1989) Physiology, biochemistry and specific inhibitors of CH₄, NH₄ and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev* 53
3. Bioplastics market developmet update (2019). *European bioplastics* (2019).
www.european-bioplastics.org
4. Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V (2016) The main characteristics, properties, improvements, and market data of polyhydroxyalkanoates. In: Thakur VK, Thakur MK (eds) *Handbook of sustainable polymers: processing and applications*, 1st edn. Pan Stanford Publishing, Boca Ratón, pp 899–928. <https://doi.org/10.1201/b19600-25>. isbn:978-9-814-61353-8
5. Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V: Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym Lett* 2014, 8:791-808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
6. Cai C, Hu S, Guo J, Shi Y, Xie G-J, Yuan Z (2015) Nitrate reduction by denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms can reach a practically useful rate. *Water Res* 87. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.026>
7. Cantera S, Estrada JM, Lebrero R, García-Encina PA, Muñoz R (2016) Comparative performance evaluation of conventional and two-phase hydrophobic stirred tank reactors for methane abatement: mass transfer and biological considerations. *Biotechnol Bioeng* 113:1203–1212. <https://doi.org/10.1002/bit.25897>
8. Cantera S, Frutos OD, López JC, Lebrero R, Muñoz R (2017) Technologies for the bioconversion of GHGs into high added value products: current state and future prospects. In: Alvarez-Fernández R, Zubelzu S, Martínez R *Carbon footprint and the industrial life cycle, from urban planning to recycling*. Springer International Publishing, Cham, pp 359–388. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54984-2>. isbn:978-3-319-54983-5
9. Cantera S, Muñoz R, Lebrero R, López JC, Rodríguez Y, García-Encina PA (2018) Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Biotechnol* 50:128–135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.021>
10. Chen GQ, Hajnal I, Wu H, Lv L, Ye J: Engineering biosynthesis mechanisms for diversifying polyhydroxyalkanoates. *Trends Biotechnol* 2015, 33:565-574.
11. Covarrubias-García I, Aizpuru A, Arriaga S (2017) Effect of the continuous addition of ozone on biomass clogging control in a biofilter treating ethyl acetate vapors. *Sci Total Environ* 584–585:469–475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.031>
12. Cui M, Ma A, Qi H, Zhuang X, Zhuang G (2015) Anaerobic oxidation of methane: an “active” microbial process. *MicrobiologyOpen* 4:1–11.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.232>



13. Deublein D, Steinhouser A. (2008). Biogas from waste and renewable resources: An introduction. <https://doi.org/10.1002/9783527621705>
14. Esguerra, M. (1989). Experiencias prácticas con biodigestores de bajo costo para la generación de energía y el tratamiento de aguas residuales en países en desarrollo. Conferencia Internacional de Mecanización Agraria. Seminario FAO-CNRE: Tecnologías de producción de biogás.
15. Estrada JM, Dudek A, Muñoz R, Quijano G (2013) Fundamental study on gas–liquid mass transfer in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. *J Chem Technol Biotechnol* 89:1419–1424. <https://doi.org/10.1002/jctb.4226>
16. Estrada JM, Kraakman NJRB, Lebrero R, Muñoz R (2012) A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies. *Biotechnol Adv* 30(6):1354–1363. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.010>
17. Estrada JM, Lebrero R, Quijano G, Pérez R, Figueroa-González I, García-Encina PA, Muñoz R (2014) Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chem Eng J* 253:385–393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053>
18. García-Pérez T, López JC, Passos F, Lebrero R, Revah S, Muñoz R (2018) Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chem Eng J* 334:691–697. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.106>
19. Hanson R, Hanson T (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiol Rev.* 1996 Jun; 60(2): 439–471.
20. Henckel T, Roslev P, Conrad R (2000) Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ Microbiol* 2:666–679. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00149.x>
21. Lee J, Yasin M, Park S, Chang IS, Ha KS, Lee EY, Lee J, Kim C, Gas-liquid mass transfer coefficient of methane in bubble column reactor, *Kor. J. Chem. Eng.* 32 (6) (2015). <https://doi.org/10.1007/s11814-014-0341-7>
22. Jingura R, Matengaifa R (2007) Optimization of biogas production by anaerobic digestion for sustainable energy development in Zimbabwe. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2007.06.015>
23. K. Khosravi- Darani, F. Yazdian, F. Babapour, A.R. Amirsadeghi, Poly(3-hydroxybutyrate) production from natural gas by a methanotroph native bacterium in a bubble column bioreactor, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 33 (2019)
24. Kapoor R, Ghosh P, Tyagi B, Kumar Vijay V, Vijay V, Shekhar Thakur I, Kamyab H, DucNguyen D, Kumar A (2020). Advances in biogás valorization and utilization: A comprehensive review. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123052>
25. Karthikeyan OP, Chidambarampadmavathy K, Cirés S, Heimann K (2015) Review of sustainable methane mitigation and biopolymer production. *Crit Rev Environ Sci Technol* 45:1579–1610. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.966422>



26. Kennelly C, Gerrity S, Collins G, Clifford E (2014) Liquid phase optimisation in a horizontal flow biofilm reactor (HFBR) technology for the removal of methane at low temperatures. *Chem Eng J* 242:144–154. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.071>
27. Khosravi-Darani K, Mokhtari ZB, Amai T, Tanaka K (2013) Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1407–1424. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4649-0>
28. Kraakman NJR, Rocha-Rios J, van Loosdrecht MCM (2011) Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:873–886. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3365-5>
29. Kumar A, Dewulf J, Van Langenhove H (2008) Membrane-based biological waste gas treatment. *Chem Eng J* 136:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.06.006>
30. Lebrero R, Hernández L, Pérez R, Estrada JM, Muñoz R (2015) Two-liquid phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: exploring the potential of hydrophobic methanotrophs. *J Environ Manag* 151:124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.016>
31. Levett I, Birkett G, Davies N, Bell A, Langford A, Laycock B, Lant P, Pratt S (2016) Technoeconomic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane – the case of thermophilic bioprocessing. *J Environ Chem Eng* 4:3724–3733. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.07.033>
32. López JC, Merchán L, Lebrero R, Muñoz R (2018) Feast-famine biofilter operation for methane mitigation. *J Clean Prod* 170:108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.157>
33. López JC, Quijano G, Souza TSO, Estrada JM, Lebrero R, Muñoz R (2013) Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2277–2303. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
34. López JC, Rodríguez Y, Pérez V, Lebrero R, Muñoz R (2019). CH₄-Based Polyhydroxyalkanoate Production: A Step Further Towards a Sustainable Bioeconomy. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_11
35. Liu LY, Xie GJ, Xing DF, Liu BF, Ding J, Ren NQ, (2020). Biological conversion of methane to polyhydroxyalkanoates: Current advances, challenges, and perspectives. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2020.100029>
36. Mao C, Feng Y, Wang X, Ren G (2015) Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
37. Muñoz R, Malhautier L, Fanlo JL, Quijano G (2015) Biological technologies for the treatment of atmospheric pollutants. *Int J Environ Anal Chem* 95:950–967. <https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1055471>
38. Muñoz R, Polanco M, Díaz I, Lebrero R (2019). El estado del arte de la valorización del biogás en el sector del tratamiento de residuos y aguas residuales. www.retema.es. Especial bioenergía 2019.
39. Nienow AW (2014) Stirring and stirred-tank reactors. *Chem Ing Tech* 86:2063–2074. <https://doi.org/10.1002/cite.201400087>



40. Pérez V, Mota CR, Muñoz R, Lebrero R (2020) Polyhydroxyalcanoates (PHA) production from biogas in waste treatment facilities: assessing the potential impacts on economy, environment and society. *Chemosphere* 255 (2020) 126929.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126929>
41. Pérez V, Pascual A, Rodrigo A, García Torreiro M, Latorre-Sánchez M, Coll Lozano C, David-Moreno A, Oliva-Domínguez JM, Serna-Maza A, Herrero García N, González Granados I, Roldan-Aguayo R, Ovejero-Roncero D, Molto Marin JL, Smith M, Musinovic H, Rangué A, Belard L, Pascual C, Lebrero R, Muñoz R (2020) Integrated innovative biorefinery for the transformation of municipal solid waste into biobased products. Integrating biorefineries for waste valorisation 2020, pages 41-80.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818228-4.00002-2>
42. Petersen LAH, Villadsen J, Jørgensen SB, Gernaey K (2017) Mixing and mass transfer in a pilotscale U-loop bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 114:344–354.
<https://doi.org/10.1002/bit.26084>
43. Pieja AJ, Rostkowski KH, Criddle CS (2011) Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria. *Microb Ecol* 62:564–573. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9873-0>
44. Pieja AJ, Sundstrom ER, Criddle CS (2012) Cyclic, alternating methane and nitrogen limitation increases PHB production in a methanotrophic community. *Bioresour Technol* 107:385–392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.044>
45. Rahnama F, Vasheghani-Farahani E, Yazdian F, Abbas Shojaosadati S (2012) PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop biorreactor. *Biochemical Engineering Journal* 65 (2012) 51– 56.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.014>
46. Rodríguez Y, Milen Firmino PI, Pérez V, Lebrero R, Muñoz R (2020) Biogas valorization via continuous polyhydroxybutyrate production by *Methylocystis hirsuta* in a bubble column bioreactor. *Waste Management* 113 (2020) 395–403.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.009>
47. Rostkowski KH, Pfluger AR, Criddle CS (2013) Stoichiometry and kinetics of the PHB producing type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP. *Bioresour Technol* 132:71–77.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.129>
48. Semrau JD, DiSpirito AA, Yoon S (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev* 34:496–531. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x>
49. Stone KA, Hilliard MV, He QP, Wang J (2017) A mini review on bioreactor configurations and gas transfer enhancements for biochemical methane conversion. *Biochem Eng J* 128:83–92 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.003>
50. Sundstrom ER, Criddle CS. 2015. Optimization of methanotrophic growth and production of poly(3-hydroxybutyrate) in a high-throughput microbioreactor system. *Appl Environ Microbiol* 81:4767–4773. [doi:10.1128/AEM.00025-15](https://doi.org/10.1128/AEM.00025-15).



51. Tan GYA, Chen CL, Li L, Ge L, Wang L, Razaad IMN, Li Y, Zhao L, Mo Y, Wang JY (2014) Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. Polym Basel 6:706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
52. Varnero, M.T. Manual de Reciclaje Orgánico y Biogás. Ministerio de Agricultura (FIA), 1991
53. Zhang T, Wang X, Zhou J, Zhang Y (2018) Enrichments of methanotropic-heterotrophic cultures with high poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities. J Environ Sci 65:133-143 <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.03.016>



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



ANEXOS

ANEXO A1: TABLAS DE DATOS

Tabla A1: Sólidos Suspendidos totales y volátiles test 1 (NH_4^+ fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	Sólidos suspendidos volátiles (SSV) (g L^{-1})	Sólidos Suspendidos Totales (SST) (g L^{-1})
10/06/2019	15:30	0.00		
11/06/2019	9:30	0.75	0.72	1.26
12/06/2019	9:30	1.75	0.57	0.82
13/06/2019	9:30:00	2.75	0.71	0.99
14/06/2019	9:30:00	3.75	0.76	0.93
15/06/2019	10:00:00	4.77	1.54	1.87
16/06/2019	13:00	5.90	1.79	2.19
17/06/2019	9:00	6.73	2.12	2.36
18/06/2019	9:00	7.73	2.14	2.48
19/06/2019	9:00	8.73	2.56	2.88
20/06/2019	9:00	9.73	2.83	3.18
21/06/2019	9:00	10.73	3.30	3.73
22/06/2019	12:00	11.85	3.36	3.79
23/06/2019	13:00	12.90	3.50	3.90
24/06/2019	9:00	13.73	3.62	4.00
25/06/2019	9:00	14.73	4.02	4.46
26/06/2019	9:00	15.73	3.76	4.06
27/06/2019	9:00	16.73	4.28	4.52
28/06/2019	9:00	17.73	4.45	4.79
29/06/2019	16:00	19.02	4.62	5.06
30/06/2019	13:00	19.90	4.46	5.20
01/07/2019	9:00	20.73	4.92	5.18
02/07/2019	9:00	21.73	4.58	4.90
03/07/2019	9:00	22.73	4.46	5.00
04/07/2019	9:00	23.73	4.76	5.08
05/07/2019	9:00	24.73	5.24	5.56
06/07/2019	9:00	25.73	5.48	5.78
07/07/2019	9:00	26.73	5.32	5.64
08/07/2019	9:00	27.73	5.42	5.72
09/07/2019	9:00	28.73	4.94	5.12
10/07/2019	9:00	29.73	4.66	5.34
11/07/2019	9:00	30.73	4.52	4.52



12/07/2019	9:00	31.73	4.84	5.00
13/07/2019	9:00	32.73	5.32	5.40
14/07/2019	9:00	33.73	#N/A	5.68
15/07/2019	9:00	34.73	5.68	5.96
16/07/2019	10:00	35.77	5.80	6.28
17/07/2019	11:00	36.81	5.02	5.34
18/07/2019	12:00	37.85	4.28	4.78
19/07/2019	13:00	38.90	4.18	4.34
20/07/2019	13:00	39.90	4.14	4.32
21/07/2019	9:30	40.75	3.74	4.08
22/07/2019	9:30	41.75	4.32	4.64
23/07/2019	9:30	42.75	#N/A	4.43
24/07/2019	9:30	43.75	4.02	4.22
25/07/2019	9:30	44.75	3.46	3.78
26/07/2019	9:30	45.75	3.70	3.88
27/07/2019	11:30	46.83	3.82	3.98

Tabla A2: Capacidad y eficacia de eliminación test 1 (NH_4^+ fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	Capacidad de eliminación (EC) ($\text{gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	Eficacia de eliminación (RE) (%)
10/06/2019	15:30	0.00	0.0	0.0
11/06/2019	9:30	0.75	2.3	3.3
12/06/2019	9:30	1.75	2.9	4.1
13/06/2019	9:30:00	2.75	15.2	24.7
14/06/2019	9:30:00	3.75	15.0	23.0
15/06/2019	10:00:00	4.77	13.8	21.5
16/06/2019	13:00	5.90	10.4	16.4
17/06/2019	9:00	6.73	26.1	44.0
18/06/2019	9:00	7.73	16.1	25.2
19/06/2019	9:00	8.73	34.3	61.1
20/06/2019	9:00	9.73	36.5	62.9
21/06/2019	9:00	10.73	34.3	62.2
22/06/2019	12:00	11.85	36.6	62.0
23/06/2019	13:00	12.90	35.4	60.3
24/06/2019	9:00	13.73	37.4	61.3
25/06/2019	9:00	14.73	37.8	61.3
26/06/2019	9:00	15.73	39.2	58.8
27/06/2019	9:00	16.73	39.0	63.3
28/06/2019	9:00	17.73	36.5	60.8
29/06/2019	16:00	19.02	37.9	61.8



30/06/2019	13:00	19.90	37.8	63.4
01/07/2019	9:00	20.73	39.0	64.1
02/07/2019	9:00	21.73	39.3	64.1
03/07/2019	9:00	22.73	37.4	63.7
04/07/2019	9:00	23.73	37.8	61.9
05/07/2019	9:00	24.73	39.3	63.0
06/07/2019	9:00	25.73	37.4	60.5
07/07/2019	9:00	26.73	38.9	61.0
08/07/2019	9:00	27.73	36.8	59.0
09/07/2019	9:00	28.73	37.3	57.1
10/07/2019	9:00	29.73	35.4	56.5
11/07/2019	9:00	30.73	35.8	57.1
12/07/2019	9:00	31.73	36.7	55.1
13/07/2019	9:00	32.73	34.2	56.6
14/07/2019	9:00	33.73	36.7	57.8
15/07/2019	9:00	34.73	36.4	56.1
16/07/2019	10:00	35.77	34.7	55.9
17/07/2019	11:00	36.81	33.5	53.8
18/07/2019	12:00	37.85	32.9	54.5
19/07/2019	13:00	38.90	34.1	56.1
20/07/2019	13:00	39.90	32.0	51.5
21/07/2019	9:30	40.75	33.4	54.6
22/07/2019	9:30	41.75	34.3	55.5
23/07/2019	9:30	42.75	33.8	55.7
24/07/2019	9:30	43.75	31.9	53.3
25/07/2019	9:30	44.75	30.0	50.3
26/07/2019	9:30	45.75	30.8	51.7
27/07/2019	11:30	46.83	28.3	45.8

Tabla A3: PHB test 1 (NH₄⁺ fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	PHB (%w/w)
10/06/2019	15:30	0.00	0.00
11/06/2019	9:30	0.75	#N/A
12/06/2019	9:30	1.75	#N/A
13/06/2019	9:30:00	2.75	#N/A
14/06/2019	9:30:00	3.75	#N/A
15/06/2019	10:00:00	4.77	#N/A
16/06/2019	13:00	5.90	0.60



17/06/2019	9:00	6.73	#N/A
18/06/2019	9:00	7.73	#N/A
19/06/2019	9:00	8.73	#N/A
20/06/2019	9:00	9.73	#N/A
21/06/2019	9:00	10.73	#N/A
22/06/2019	12:00	11.85	0.32
23/06/2019	13:00	12.90	#N/A
24/06/2019	9:00	13.73	#N/A
25/06/2019	9:00	14.73	#N/A
26/06/2019	9:00	15.73	#N/A
27/06/2019	9:00	16.73	#N/A
28/06/2019	9:00	17.73	0.00
29/06/2019	16:00	19.02	0.08
30/06/2019	13:00	19.90	0.11
01/07/2019	9:00	20.73	0.11
02/07/2019	9:00	21.73	0.37
03/07/2019	9:00	22.73	0.29
04/07/2019	9:00	23.73	0.73
05/07/2019	9:00	24.73	0.68
06/07/2019	9:00	25.73	0.9
07/07/2019	9:00	26.73	0.77
08/07/2019	9:00	27.73	0.98
09/07/2019	9:00	28.73	0.8
10/07/2019	9:00	29.73	0.63
11/07/2019	9:00	30.73	0.44
12/07/2019	9:00	31.73	0.4
13/07/2019	9:00	32.73	0.98
14/07/2019	9:00	33.73	0.25
15/07/2019	9:00	34.73	0.2
16/07/2019	10:00	35.77	0.31
17/07/2019	11:00	36.81	0.00
18/07/2019	12:00	37.85	0.00
19/07/2019	13:00	38.90	0.00
20/07/2019	13:00	39.90	0.00
21/07/2019	9:30	40.75	0.00
22/07/2019	9:30	41.75	0.00
23/07/2019	9:30	42.75	0.00
24/07/2019	9:30	43.75	0.00
25/07/2019	9:30	44.75	0.00
26/07/2019	9:30	45.75	0.00
27/07/2019	11:30	46.83	0.00



Tabla A4: Sólidos Suspendidos totales y volátiles test 2 (NO_3^- fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	Sólidos Suspendidos volátiles (SSV) (g L^{-1})	Sólidos Suspendidos Totales (SST) (g L^{-1})
05/08/2019	20:00	0.00		
06/08/2019	9:30	0.56	0.68	0.96
07/08/2019	10:00	1.58	0.74	1.05
08/08/2019	9:20:00	2.56	1.29	1.62
09/08/2019	9:30:00	3.56	1.55	1.83
10/08/2019	11:15:00	4.64	1.92	2.18
11/08/2019	12:20	5.68	2.08	2.29
12/08/2019	9:15	6.55	2.41	2.65
13/08/2019	9:30	7.56	2.63	2.93
14/08/2019	9:20	8.56	3.05	3.31
15/08/2019	11:10	9.63	3.21	3.48
16/08/2019	9:15	10.55	3.58	3.92
17/08/2019	9:15	11.55	3.52	3.83
18/08/2019	11:10	12.63	4.08	4.45
19/08/2019	9:15	13.55	4.53	4.89
20/08/2019	9:20	14.56	4.99	5.47
21/08/2019	9:20	15.56	5.40	5.93
22/08/2019	9:20	16.56	6.00	6.34
23/08/2019	9:20	17.56	6.66	6.86
24/08/2019	9:15	18.55	6.28	6.38
25/08/2019	11:20	19.64	6.76	6.90
26/08/2019	10:00	20.58	6.22	6.50
27/08/2019	9:30	21.56	5.92	6.06
28/08/2019	10:15	22.59	5.76	5.92
29/08/2019	9:20	23.56	5.60	5.58
30/08/2019	9:00	24.54	5.06	5.10
31/08/2019	9:00	25.54	4.56	4.36
01/09/2019	9:00	26.54	4.22	4.18
02/09/2019	9:00	27.54	4.06	4.40
03/09/2019	9:30	28.56	3.30	3.70
04/09/2019	9:10	29.55	2.90	3.30
05/09/2019	9:15	30.55	3.46	3.00
06/09/2019	9:30	31.56	2.50	2.82
07/09/2019	9:30	32.56	2.06	2.28
08/09/2019	11:00	33.63	2.26	2.54
09/09/2019	11:20	34.64	2.08	2.38
10/09/2019	9:00	35.54	2.14	2.38



11/09/2019	9:10	36.55	2.22	2.44
12/09/2019	10:00	37.58	2.20	2.46
13/09/2019	11:15	38.64	1.98	2.18
14/09/2019	10:15	39.59	1.10	2.50
15/09/2019	12:30	40.69	2.46	2.82
16/09/2019	10:00	41.58	2.48	2.74
17/09/2019	9:10	42.55	2.26	2.52
18/09/2019	11:00	43.63	2.04	2.30
19/09/2019	9:10	44.55	2.12	2.40
20/09/2019	9:20	45.56	2.10	2.26
21/09/2019	9:10	46.55	2.00	2.24
22/09/2019	10:00	47.58	3.00	3.38

Tabla A5: Capacidad y eficacia de eliminación test 2 (NO₃⁻ fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	Capacidad de eliminación (EC) (gCH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	Eficacia de eliminación (RE) (%)
05/08/2019	20:00	0.00	0.0	0.0
06/08/2019	9:30	0.56	3.3	5.4
07/08/2019	10:00	1.58	9.3	14.4
08/08/2019	9:20:00	2.56	25.1	42.7
09/08/2019	9:30:00	3.56	7.5	12.3
10/08/2019	11:15:00	4.64	8.6	14.0
11/08/2019	12:20	5.68	5.0	8.0
12/08/2019	9:15	6.55	20.1	34.5
13/08/2019	9:30	7.56	8.4	14.2
14/08/2019	9:20	8.56	17.8	30.5
15/08/2019	11:10	9.63	8.6	14.5
16/08/2019	9:15	10.55	22.5	39.2
17/08/2019	9:15	11.55	10.8	18.6
18/08/2019	11:10	12.63	32.7	59.3
19/08/2019	9:15	13.55	23.9	42.3
20/08/2019	9:20	14.56	31.7	57.7
21/08/2019	9:20	15.56	29.8	53.5
22/08/2019	9:20	16.56	29.5	54.3
23/08/2019	9:20	17.56	28.2	51.7
24/08/2019	9:15	18.55	28.9	51.7
25/08/2019	11:20	19.64	28.3	49.7
26/08/2019	10:00	20.58	29.3	51.4
27/08/2019	9:30	21.56	24.6	43.0



28/08/2019	10:15	22.59	26.9	49.1
29/08/2019	9:20	23.56	20.8	37.2
30/08/2019	9:00	24.54	27.0	47.7
31/08/2019	9:00	25.54	27.0	47.7
01/09/2019	9:00	26.54	29.6	46.0
02/09/2019	9:00	27.54	28.5	47.8
03/09/2019	9:30	28.56	16.3	25.0
04/09/2019	9:10	29.55	16.7	25.5
05/09/2019	9:15	30.55	14.6	23.0
06/09/2019	9:30	31.56	15.2	24.1
07/09/2019	9:30	32.56	10.4	17.1
08/09/2019	11:00	33.63	23.1	36.6
09/09/2019	11:20	34.64	19.3	31.4
10/09/2019	9:00	35.54	22.4	35.5
11/09/2019	9:10	36.55	20.9	33.2
12/09/2019	10:00	37.58	19.9	31.8
13/09/2019	11:15	38.64	18.6	31.2
14/09/2019	10:15	39.59	13.5	22.8
15/09/2019	12:30	40.69	14.4	23.2
16/09/2019	10:00	41.58	17.5	30.3
17/09/2019	9:10	42.55	23.3	40.2
18/09/2019	11:00	43.63	27.3	48.9
19/09/2019	9:10	44.55	25.3	46.2
20/09/2019	9:20	45.56	27.9	49.4
21/09/2019	9:10	46.55	26.7	45.6
22/09/2019	10:00	47.58	25.5	42.3

Tabla A6: PHB test 2 (NO₃⁻ fuente de nitrógeno).

Fecha	Hora	Día	PHB (% w/w)
05/08/2019	20:00	0.00	0.00
06/08/2019	9:30	0.56	#N/A
07/08/2019	10:00	1.58	#N/A
08/08/2019	9:20:00	2.56	#N/A
09/08/2019	9:30:00	3.56	#N/A
10/08/2019	11:15:00	4.64	#N/A
11/08/2019	12:20	5.68	#N/A
12/08/2019	9:15	6.55	#N/A



13/08/2019	9:30	7.56	#N/A
14/08/2019	9:20	8.56	#N/A
15/08/2019	11:10	9.63	#N/A
16/08/2019	9:15	10.55	#N/A
17/08/2019	9:15	11.55	#N/A
18/08/2019	11:10	12.63	#N/A
19/08/2019	9:15	13.55	#N/A
20/08/2019	9:20	14.56	#N/A
21/08/2019	9:20	15.56	#N/A
22/08/2019	9:20	16.56	#N/A
23/08/2019	9:20	17.56	#N/A
24/08/2019	9:15	18.55	0.17
25/08/2019	11:20	19.64	0.11
26/08/2019	10:00	20.58	0.10
27/08/2019	9:30	21.56	0.08
28/08/2019	10:15	22.59	0.03
29/08/2019	9:20	23.56	0.03
30/08/2019	9:00	24.54	0.00
31/08/2019	9:00	25.54	0.06
01/09/2019	9:00	26.54	0.4
02/09/2019	9:00	27.54	0.26
03/09/2019	9:30	28.56	0.20
04/09/2019	9:10	29.55	0.19
05/09/2019	9:15	30.55	0.47
06/09/2019	9:30	31.56	0.30
07/09/2019	9:30	32.56	0.37
08/09/2019	11:00	33.63	0.67
09/09/2019	11:20	34.64	0.49
10/09/2019	9:00	35.54	0.54
11/09/2019	9:10	36.55	1.11
12/09/2019	10:00	37.58	0.68
13/09/2019	11:15	38.64	0.98
14/09/2019	10:15	39.59	0.76
15/09/2019	12:30	40.69	1.51
16/09/2019	10:00	41.58	1.10
17/09/2019	9:10	42.55	1.17
18/09/2019	11:00	43.63	0.92
19/09/2019	9:10	44.55	1.04
20/09/2019	9:20	45.56	0.74
21/09/2019	9:10	46.55	0.56
22/09/2019	10:00	47.58	0.80

**Tabla A7:** Sólidos Suspendidos totales y volátiles test 3 (NO_3^- fuente de nitrógeno, Cu^{2+} 0.16 μM).

Fecha	Hora	Día	Sólidos Suspendidos volátiles (SSV) (g L^{-1})	Sólidos Suspendidos Totales (SST) (g L^{-1})
31/10/2019	20:00	0.00	0.8	
01/11/2019	9:30	0.56	0.9	1.19
02/11/2019	9:20	1.56	0.6	0.84
03/11/2019	11:00:00	2.63	1.2	1.43
04/11/2019	9:00:00	3.54	1.3	1.51
05/11/2019	9:15:00	4.55	1.4	1.66
06/11/2019	9:15	5.55	1.4	1.55
07/11/2019	9:10	6.55	1.8	2.03
08/11/2019	9:15	7.55	1.7	1.99
09/11/2019	9:15	8.55	2.2	2.36
10/11/2019	10:30	9.60	2.0	2.13
11/11/2019	9:05	10.55	2.2	2.45
12/11/2019	9:00	11.54	2.1	2.19
13/11/2019	9:00	12.54	2.1	2.23
14/11/2019	9:10	13.55	2.3	2.46
15/11/2019	9:10	14.55	1.9	1.97
16/11/2019	9:15	15.55	2.5	2.63
17/11/2019	11:00	16.63	2.4	2.63
18/11/2019	9:50	17.58	2.5	2.80
19/11/2019	9:15	18.55	2.2	2.45
20/11/2019	9:30	19.56	2.4	2.75
21/11/2019	9:05	20.55	2.1	2.48
22/11/2019	9:15	21.55	2.1	2.31
23/11/2019	9:20	22.56	2.0	2.23
24/11/2019	12:00	23.67	2.2	2.54
25/11/2019	9:00	24.54	2.3	2.57
26/11/2019	9:10	25.55	2.7	3.00
27/11/2019	9:10	26.55	1.7	1.92
28/11/2019	9:10	27.55	2.6	2.89
29/11/2019	9:00	28.54	2.7	2.95
30/11/2019	9:20	29.56	1.8	2.02
01/12/2019	12:00	30.67	2.8	3.09
02/12/2019	9:15	31.55	2.9	3.18
03/12/2019	9:20	32.56	2.2	2.41
04/12/2019	9:15	33.55	2.7	2.97
05/12/2019	10:20	34.60	3.0	3.29
06/12/2019	12:20	35.68	2.1	2.33



07/12/2019	9:20	36.56	2.3	2.48
08/12/2019	11:00	37.63	2.9	3.15
09/12/2019	10:30	38.60	#N/A	#N/A
10/12/2019	9:30	39.56	#N/A	#N/A
11/12/2019	9:15	40.55	1.7	1.88
12/12/2019	11:00	41.63	2.0	2.22
13/12/2019	9:05	42.55	#N/A	#N/A
14/12/2019	11:45	43.66	#N/A	#N/A
15/12/2019	13:30	44.73	1.2	1.32
16/12/2019	9:30	45.56	1.8	1.96
17/12/2019	18:30	46.94	#N/A	
18/12/2019	18:30	47.94	#N/A	

Tabla A8: Capacidad y eficacia de eliminación test 3 (NO_3^- fuente de nitrógeno, Cu^{2+} 0.16 μM).

Fecha	Hora	Día	Capacidad de eliminación (EC) ($\text{gCH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	Eficacia de eliminación (RE) (%)
31/10/2019	20:00	0.00	0.0	0.0
01/11/2019	9:30	0.56	0.9	1.4
02/11/2019	9:20	1.56	6.5	9.9
03/11/2019	11:00:00	2.63	24.3	40.8
04/11/2019	9:00:00	3.54	9.8	15.5
05/11/2019	9:15:00	4.55	12.6	20.3
06/11/2019	9:15	5.55	9.4	15.4
07/11/2019	9:10	6.55	20.7	34.3
08/11/2019	9:15	7.55	10.8	17.6
09/11/2019	9:15	8.55	21.8	36.8
10/11/2019	10:30	9.60	11.1	18.2
11/11/2019	9:05	10.55	27.2	47.3
12/11/2019	9:00	11.54	12.6	21.0
13/11/2019	9:00	12.54	9.8	16.6
14/11/2019	9:10	13.55	35.4	56.4
15/11/2019	9:10	14.55	32.5	54.4
16/11/2019	9:15	15.55	31.3	53.5
17/11/2019	11:00	16.63	30.0	52.3
18/11/2019	9:50	17.58	32.7	53.4
19/11/2019	9:15	18.55	31.5	52.2
20/11/2019	9:30	19.56	32.2	53.5
21/11/2019	9:05	20.55	31.0	52.4
22/11/2019	9:15	21.55	12.2	19.3
23/11/2019	9:20	22.56	17.5	28.2



24/11/2019	12:00	23.67	11.7	18.2
25/11/2019	9:00	24.54	20.8	34.9
26/11/2019	9:10	25.55	32.7	55.0
27/11/2019	9:10	26.55	29.3	49.7
28/11/2019	9:10	27.55	29.9	50.9
29/11/2019	9:00	28.54	31.0	53.0
30/11/2019	9:20	29.56	28.6	48.9
01/12/2019	12:00	30.67	27.9	47.0
02/12/2019	9:15	31.55	32.3	53.8
03/12/2019	9:20	32.56	30.2	50.4
04/12/2019	9:15	33.55	23.0	37.4
05/12/2019	10:20	34.60	31.6	52.3
06/12/2019	12:20	35.68	17.7	29.6
07/12/2019	9:20	36.56	21.9	36.4
08/12/2019	11:00	37.63	35.2	59.4
09/12/2019	10:30	38.60	12.0	18.3
10/12/2019	9:30	39.56	7.9	12.4
11/12/2019	9:15	40.55	7.5	11.6
12/12/2019	11:00	41.63	31.9	55.7
13/12/2019	9:05	42.55	8.8	13.9
14/12/2019	11:45	43.66	5.6	9.0
15/12/2019	13:30	44.73	5.4	8.2
16/12/2019	9:30	45.56	32.4	59.8
17/12/2019	18:30	46.94	9.3	14.4
18/12/2019	18:30	47.94	8.5	13.8
19/12/2019	9:30	48.56	12.0	19.4
20/12/2019	9:00	49.54	34.1	56.1

Tabla A9: PHB test 3 (NO_3^- fuente de nitrógeno, Cu^{2+} 0.16 μM).

Fecha	Hora	Día	PHB (%)
31/10/2019	20:00	0.00	0.00
01/11/2019	9:30	0.56	#N/A
02/11/2019	9:20	1.56	0.00
03/11/2019	11:00:00	2.63	#N/A
04/11/2019	9:00:00	3.54	0.66
05/11/2019	9:15:00	4.55	#N/A
06/11/2019	9:15	5.55	0.77
07/11/2019	9:10	6.55	#N/A
08/11/2019	9:15	7.55	0.73



09/11/2019	9:15	8.55	#N/A
10/11/2019	10:30	9.60	0.40
11/11/2019	9:05	10.55	#N/A
12/11/2019	9:00	11.54	0.32
13/11/2019	9:00	12.54	0.24
14/11/2019	9:10	13.55	#N/A
15/11/2019	9:10	14.55	0.00
16/11/2019	9:15	15.55	#N/A
17/11/2019	11:00	16.63	0.12
18/11/2019	9:50	17.58	#N/A
19/11/2019	9:15	18.55	0.33
20/11/2019	9:30	19.56	#N/A
21/11/2019	9:05	20.55	0.67
22/11/2019	9:15	21.55	0.81
23/11/2019	9:20	22.56	#N/A
24/11/2019	12:00	23.67	#N/A
25/11/2019	9:00	24.54	2.09
26/11/2019	9:10	25.55	#N/A
27/11/2019	9:10	26.55	#N/A
28/11/2019	9:10	27.55	1.25
29/11/2019	9:00	28.54	#N/A
30/11/2019	9:20	29.56	#N/A
01/12/2019	12:00	30.67	0.71
02/12/2019	9:15	31.55	#N/A
03/12/2019	9:20	32.56	#N/A
04/12/2019	9:15	33.55	1.32
05/12/2019	10:20	34.60	#N/A
06/12/2019	12:20	35.68	#N/A
07/12/2019	9:20	36.56	2.19
08/12/2019	11:00	37.63	#N/A
09/12/2019	10:30	38.60	#N/A
10/12/2019	9:30	39.56	#N/A
11/12/2019	9:15	40.55	1.30
12/12/2019	11:00	41.63	#N/A
13/12/2019	9:05	42.55	#N/A
14/12/2019	11:45	43.66	#N/A
15/12/2019	13:30	44.73	1.04
16/12/2019	9:30	45.56	#N/A
17/12/2019	18:30	46.94	#N/A
18/12/2019	18:30	47.94	#N/A
19/12/2019	9:30	48.56	0.42



ANEXO A2: PARÁMETROS DEL SISTEMA

Tabla A10: Parámetros de calibración

		Calibración 03_04_19	
GC curvas calibrado		Pendiente gases	Pm (g mol ⁻¹)
	CH ₄	869.39	16
	CO ₂	465.46	40
	O ₂	477.22	32

Tabla A11: Parámetros del sistema

R (atm l K ⁻¹ mol ⁻¹)	0.082
T (K)	298
T (°C)	25
Volumen trabajo (L)	2.5
Volumen trabajo (m ³)	0.0025
Volumen reactor (L)	3
Volumen reactor (m ³)	0.003
EBRT (min)	60
Tasa recirculación	30
Bomba recirculación (rpm)	91.2

ANEXO A3: IMÁGENES DEL SISTEMA



Figura A1: Sistema BCB.

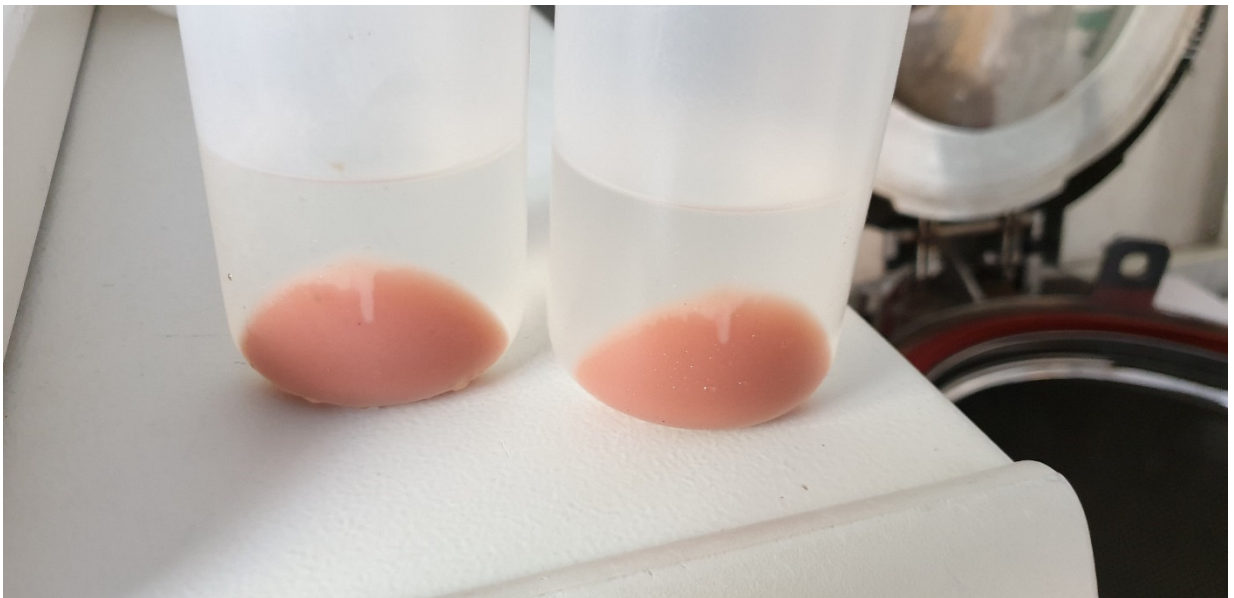


Figura A2: Pellets biomasa centrifugada.



Figura A5: Detalle columna BCB, BCB tras inoculación y detalle set de difusores.

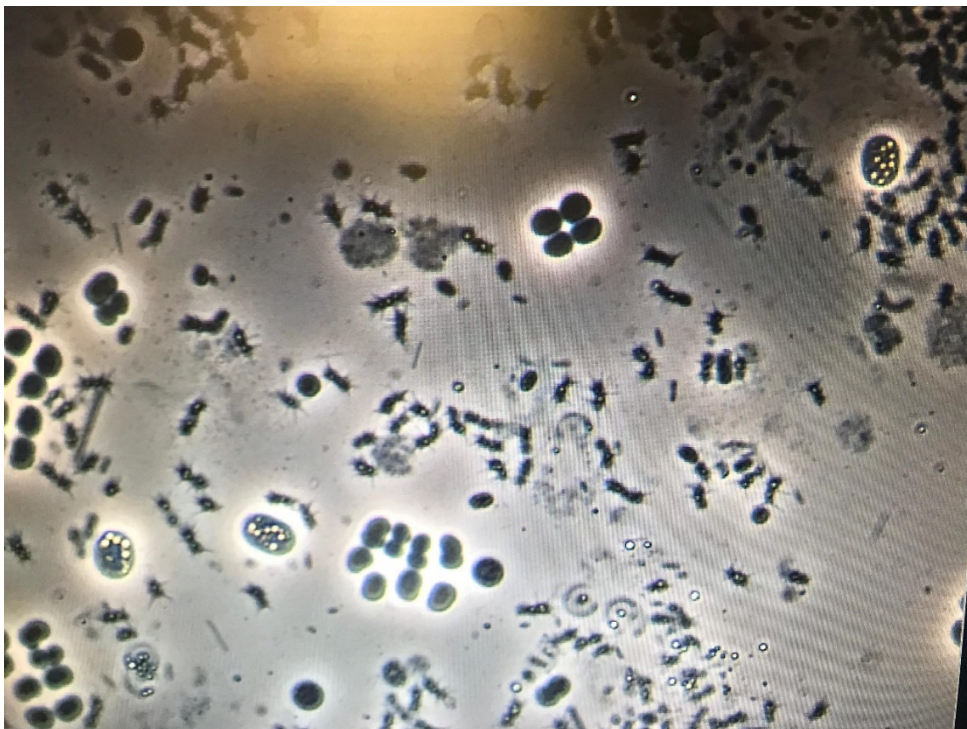
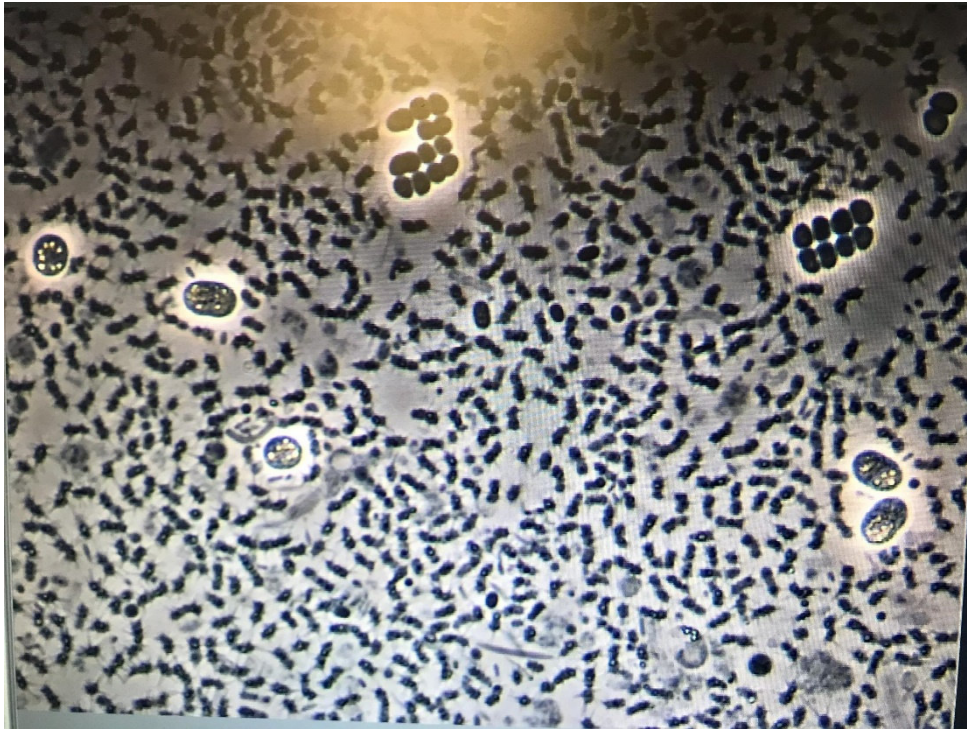


Figura A4: Detalle muestras PHAs al microscopio electrónico.