



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Optimización de la producción de
biopolímeros a partir de gases de efecto
invernadero**

Autor: Dña. Silvia García Casado

Tutor 1: D. Raúl Muñoz Torre

Tutor 2: Dña. Yadira Rodríguez Muñoz

Valladolid, Julio 2021



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la producción de polihidroxi butirato (PHB) empleando la cepa *Methylocystis hirsuta* CSC1, biogás como fuente de carbono y energía y nitrato como fuente de nitrógeno en un sistema de dos etapas en continuo. Se realizaron tres ensayos con diferentes cargas de N-NO_3^- y velocidades de dilución, para determinar las condiciones óptimas de operación en el reactor de tanque agitado (STR) y en la columna de burbujeo (BCB), destinados al crecimiento de la biomasa y acumulación de PHB, respectivamente. El empleo de una carga media de N-NO_3^- ($\sim 43 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) y una velocidad de dilución de $0,013 \text{ h}^{-1}$ en el STR permitió obtener condiciones estables de operación, aunque se logró una mayor productividad ($\sim 140 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) en la BCB a velocidades de dilución inferiores ($0,011 \text{ h}^{-1}$). La alta acumulación de PHB en el STR cuestiona los beneficios de operar sistemas en dos etapas.

Palabras clave: *Biogás, eliminación gases de efecto invernadero, metanótrofos, producción de PHB, sistema en dos etapas.*

ABSTRACT

The present study investigated polyhydroxybutyrate (PHB) production in a two-stage continuous system inoculated with *Methylocystis hirsuta* CSC1 and fed with biogas as a carbon and energy source and nitrate as a nitrogen source. Three different tests were carried out varying the N-NO_3^- loading rate and dilution rate to determine the optimal operational conditions in the stirred tank reactor (STR) and the bubble column bioreactor (BCB), which were devoted to biomass growth and PHB accumulation, respectively. A moderate N-NO_3^- loading rate ($\sim 43 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and a dilution ratio of $0,013 \text{ h}^{-1}$ in STR resulted in stable operating conditions, although higher PHB productivities ($\sim 140 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) were achieved under a lower dilution ratio ($0,011 \text{ h}^{-1}$) in the BCB. The high PHB accumulation obtained in the STR under nitrogen sufficient conditions challenge the benefit of two-stage systems for PHB production compared to one-stage systems.

Keywords: *Biogas, GHG abatement, methanotrophs, PHB production, two-stage system.*



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



Índice

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Estado del arte del biogás | 1 |
| 1.1.1. La digestión anaerobia. Composición y producción del biogás. | 1 |
| 1.1.2. Situación actual y perspectivas globales..... | 6 |
| 1.1.3. Usos convencionales..... | 9 |
| 1.1.4. Productos de valor añadido partir de biogás..... | 11 |
| 1.2. Metanótrofos para la degradación del CH ₄ | 13 |
| 1.2.1. Clasificación..... | 13 |
| 1.2.2. Rutas metabólicas de oxidación aerobia del metano..... | 14 |
| 1.2.3. Metanótrofos tipo II..... | 16 |
| 1.3. Producción de biopolímeros a partir de biogás - Polihidroxibutirato (PHB)..... | 19 |
| 1.3.1. Tipos y propiedades de los PHAs | 20 |
| 1.3.2. Síntesis de PHB a partir de biogás..... | 22 |
| 1.3.3. Aplicaciones de los PHAs..... | 23 |
| 1.4. Tecnologías para la bio-conversión del metano..... | 25 |
| 1.4.1. Biorreactores de biomasa suspendida | 26 |
| 1.4.2. Otras configuraciones | 28 |
| 1.5. Estrategias de operación para la producción de PHB | 29 |
| 1.5.1. Operación en una etapa | 30 |
| 1.5.2. Operación en dos etapas..... | 32 |
| 1.6. Justificación del trabajo fin de grado | 33 |
| 2. OBJETIVOS | 37 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1. Materiales..... | 39 |
| 3.2. Métodos..... | 40 |
| 3.2.1. Procedimiento experimental..... | 40 |



| | | |
|--------|---|----|
| 3.2.2. | Métodos analíticos | 46 |
| 3.2.3. | Cálculos..... | 48 |
| 4. | RESULTADOS | 51 |
| 4.1. | Test 1: Operación en continuo con alta carga de nitrógeno | 51 |
| 4.1.1. | Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos..... | 51 |
| 4.1.2. | Nitrógeno total, N-NO ₃ ⁻ y N-NO ₂ ⁻ | 54 |
| 4.1.3. | Productividad de PHB | 56 |
| 4.2. | Test 2: Operación en continuo con baja carga de nitrógeno | 58 |
| 4.2.1. | 1.2.1 Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos..... | 58 |
| 4.2.2. | Nitrógeno total, N-NO ₃ ⁻ y N-NO ₂ ⁻ | 62 |
| 4.2.3. | Productividad de PHB | 65 |
| 4.3. | Test 3: Operación en continuo con carga media de nitrógeno | 68 |
| 4.3.1. | Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos..... | 68 |
| 4.3.2. | Nitrógeno total, N-NO ₃ ⁻ y N-NO ₂ ⁻ | 72 |
| 4.3.3. | Productividad de PHB | 75 |
| 5. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 79 |
| 5.1. | Efecto de concentración de N-NO ₃ ⁻ sobre el desempeño del sistema..... | 79 |
| 5.2. | Efecto de concentración de N-NO ₃ ⁻ sobre la acumulación de PHB..... | 81 |
| 5.3. | Influencia de la velocidad de dilución..... | 82 |
| 6. | CONCLUSIÓN | 85 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 87 |
| | ANEXOS | 95 |
| | ANEXO I: Curvas de calibrado..... | 95 |
| | ANEXO II: Imágenes del sistema | 97 |



Índice Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de producción de biogás a partir de residuos y aguas residuales mediante digestión anaerobia..... | 2 |
| Figura 2. Esquema de un CSTR (A) y un UASB (B) (Hamilton y otros, 2019) | 3 |
| Figura 3. Esquema de las fases de la digestión anaerobia (Wilkinson, 2011)..... | 4 |
| Figura 4. Crecimiento relativo de psicrófilos, mesófilos y termófilos (Neczaj y otros, 2019)..... | 5 |
| Figura 5. Evolución de la producción de energía eléctrica procedente de biogás en el mundo (IRENA, 2019) | 7 |
| Figura 6. Evolución del número de plantas de generación de biogás y la energía eléctrica instalada (A) y la producción de biogás (B) en Europa en los últimos 10 años (EBA, 2020) | 8 |
| Figura 7. Aplicaciones energéticas del biogás (Cuesta Santianes y otros, 2017)..... | 9 |
| Figura 8. Ruta de la oxidación aerobia del metano (Strong y otros, 2015) | 15 |
| Figura 9. Ciclo de la serina en MOB II (Hanson & Hanson, 1996)..... | 17 |
| Figura 10. Esquema de la ruta metabólica del nitrógeno (Cai y otros, 2016)..... | 19 |
| Figura 11. Estructura general de los PHAs y el homopolímero polihidroxibutirato (PHB)..... | 21 |
| Figura 12. Ciclo de la serina y ruta metabólica para la síntesis del PHB en MOB II (López y otros, 2019) | 22 |
| Figura 13. Aplicaciones de los PHAs a nivel industrial | 23 |
| Figura 14. Capacidad de producción global de bioplásticos en 2020 (European Bioplastics, 2020) | 25 |
| Figura 15. Esquema de un STR (López y otros, 2019) | 26 |
| Figura 16. Esquema de una BCB (López y otros., 2019) | 27 |
| Figura 17. Esquema de un reactor Airlift (López y otros, 2019) | 28 |
| Figura 18. Esquema de patrón de flujo de Taylor en el interior de tubos capilares. | 29 |
| Figura 19. Esquema experimental de producción de PHB en dos etapas (Du y otros, 2001)..... | 33 |
| Figura 20. Inóculo de <i>Methylocystis hirsuta</i> | 40 |
| Figura 21. Esquema (A) e imagen (B) del sistema experimental..... | 43 |



| | |
|---|----|
| Figura 22. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO ₂ (\blacksquare) en el interior del STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1..... | 53 |
| Figura 23. Evolución de la concentración de TN (x), N- NO ₃ ⁻ (\bullet) y N- NO ₂ ⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1 | 55 |
| Figura 24. Evolución del porcentaje de PHB (\diamond) y la concentración de N- NO ₃ ⁻ (\bullet) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1 | 57 |
| Figura 25. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO ₂ (\blacksquare) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2..... | 61 |
| Figura 26. Evolución de la concentración de TN (x), N- NO ₃ ⁻ (\bullet) y N- NO ₂ ⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2 | 64 |
| Figura 27. Evolución del porcentaje de PHB (\diamond) y la concentración de N- NO ₃ ⁻ (\bullet) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2 | 67 |
| Figura 28. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO ₂ (\blacksquare) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3..... | 71 |
| Figura 29. Evolución de la concentración de TN (x), N- NO ₃ ⁻ (\bullet) y N- NO ₂ ⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3 | 74 |
| Figura 30. Evolución del porcentaje de PHB (\diamond) y la concentración de N- NO ₃ ⁻ (\bullet) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3 | 77 |



Índice Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición del biogás (%) según el tipo de biomasa (Chen y otros, 2015) | 1 |
| Tabla 2. Propiedades del biogás (FAO y otros, 2011)..... | 10 |
| Tabla 3. Procesos de producción de hidrógeno a partir de metano..... | 11 |
| Tabla 4. Productos de alto valor añadido derivados de la actividad de los metanótrofos (Cantera y otros, 2018) | 12 |
| Tabla 5. Clasificación y características de los metanótrofos (López y otros, 2019; Strong y otros, 2015) | 14 |
| Tabla 6. Rango de valores de diferentes propiedades de los PHAs (Bugnicourt y otros, 2014) | 21 |
| Tabla 7. Producción de PHB con diferentes cultivos puros (López y otros, 2019)... | 22 |
| Tabla 8. Estrategias de operación en ciclos reportadas por Rodríguez y otros (2021) | 31 |
| Tabla 9. Composición del medio mineral NMS y la solución buffer | 39 |
| Tabla 10. Resumen de las tres estrategias de operación empleadas | 46 |



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estado del arte del biogás

El biogás es una mezcla gaseosa formada principalmente por metano (CH_4) generada por la degradación de materia orgánica presente en residuos orgánicos agro-industriales, ganaderos, urbanos y aguas residuales, entre otros, en ausencia de oxígeno. Presenta múltiples aplicaciones, siendo la producción de energía (electricidad y calor) la más desarrollada en la actualidad. Sin embargo, la estabilización del mercado de producción de energía a partir de biogás reportada en los últimos años debido, principalmente, a la falta de incentivos económicos (Kampman y otros, 2017) hace necesario buscar alternativas a las aplicaciones convencionales del biogás. Una de las que suscita mayor interés es el empleo del biogás como materia prima para poder generar productos de alto valor añadido dentro de las denominadas biorrefinerías, con las que se busca sustituir a las refinerías convencionales (basadas en el uso de fuentes contaminantes y no renovables) y conseguir obtener biocombustibles, sustancias químicas y productos de interés de forma sostenible con el medio ambiente (Cherubini, 2010).

1.1.1. La digestión anaerobia. Composición y producción del biogás.

La composición del biogás varía en función del tipo de sustrato empleado y del tipo de proceso de digestión empleado (Tabla 1), pero se caracteriza por estar formado principalmente por metano (CH_4 , entre el 50-70%) seguido del dióxido de carbono (CO_2 , 30-50%), junto con otros compuestos en menor proporción como hidrógeno (H_2), sulfuro de hidrógeno (H_2S), oxígeno (O_2) o nitrógeno (N_2).

Tabla 1. Composición del biogás (%) según el tipo de biomasa (Chen y otros, 2015)

| | Residuos agrícolas | Vertederos | Residuos industriales |
|----------------------|--------------------|------------|-----------------------|
| CH_4 | 50-70 | 50-80 | 50-70 |
| CO_2 | 30-50 | 20-50 | 30-50 |
| H_2S | 0,70 | 0,10 | 0,80 |
| H_2 | 0-2 | 0-5 | 0-2 |
| N_2 | 0-1 | 0-3 | 0-1 |
| O_2 | 0-1 | 0-1 | 0-1 |

La tecnología para producir esta mezcla gaseosa que presenta mejores prestaciones energéticas y de menor impacto ambiental es la digestión anaerobia. Este tipo de proceso se caracteriza por trabajar tanto en vía húmeda ($10\% <$ Concentración de sólidos) como en vía seca, siendo los primeros los más comunes. Los digestores anaerobios contienen en su interior los microorganismos necesarios para que pueda llevarse a cabo la producción del biogás junto con el digestato, residuo del proceso que puede ser tratado y reutilizado como fertilizante por su alto contenido en nutrientes, lecho para animales, acondicionador de suelos etc. (Figura 1).

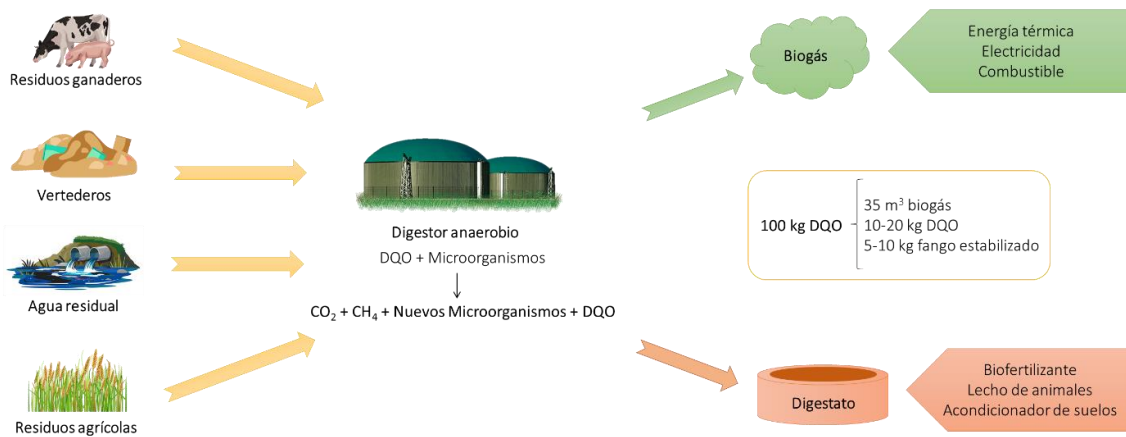


Figura 1. Esquema de producción de biogás a partir de residuos y aguas residuales mediante digestión anaerobia

Existen diversas configuraciones de digestores anaerobios, entre las que destacan los reactores de mezcla completa (CSTR) y aquellos donde la biomasa se encuentra retenida en su interior en forma de lecho fijo, fluidizado o granular (Hamilton y otros, 2019; IDAE, 2007). Los CSTR son tanques en cuyo interior se encuentran los microorganismos y el sustrato a degradar distribuidos uniformemente en su interior gracias a un sistema de agitación mecánico o neumático. Suelen operar con altos tiempos de residencia, de entre 20 y 30 días, y un sustrato cuya fracción sólida sea del 3-6% para facilitar su funcionamiento. Además, puede implementarse un sistema de recirculación para devolver al interior del reactor parte de los microorganismos extraídos con el efluente, buscando reducir con ello el tiempo de retención hidráulica (Figura 2A). Por otro lado, también suelen emplearse reactores de lecho fijo, fluidizado o granular que se caracterizan por retener las comunidades anaerobias en su interior. Dentro de este grupo de reactores destacan los digestores de flujo ascendente (UASB) donde los microorganismos anaerobios se encuentran

suspendidos gracias a la entrada continua del sustrato líquido formando gránulos que quedan retenidos dentro del reactor (Figura 2B).

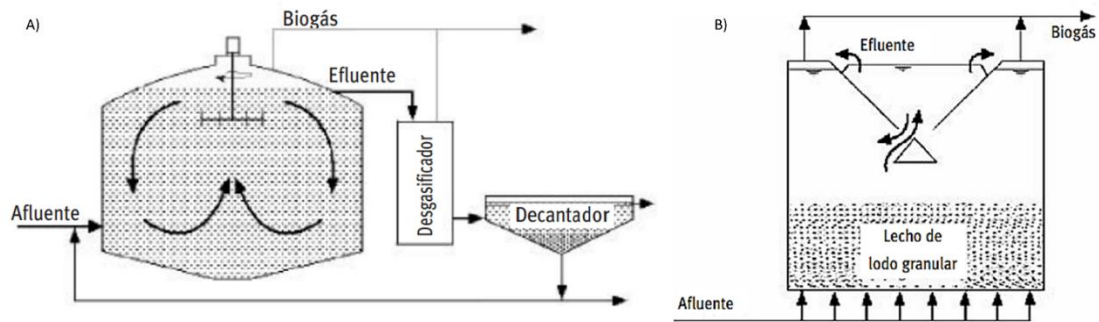


Figura 2. Esquema de un CSTR (A) y un UASB (B) (Hamilton y otros, 2019)

Dentro de estos digestores se lleva a cabo un proceso biológico complejo en el que un consorcio de microorganismos, tanto metanogénicos como no metanogénicos, es capaz de degradar la fracción orgánica del sustrato a biogás (Figura 3). Para ello, se establece una cadena de reacciones divididas en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (FAO y otros, 2011).

El proceso de digestión comienza con la hidrólisis de lípidos, proteínas y carbohidratos, y suele ser la etapa limitante del proceso, sobre todo si el sustrato de partida presenta una gran fracción sólida. En esta etapa, la descomposición de estos compuestos de gran tamaño permite obtener sustratos más simples y solubles (azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos) empleándose para ello un conjunto de bacterias fermentativas cuya función es secretar enzimas hidrolíticas al medio extracelular, como lipasas, celulasas, proteasas, etc. Estos microorganismos hidrolíticos son en su mayoría anaerobios estrictos, como las especies del género *Bacteriocides*, *Clostridia* o *Bifidobacteria*, aunque también forman parte del proceso una minoría de microorganismos anaerobios facultativos (Weiland, 2010).

La etapa posterior se conoce como acidogénesis y engloba la fermentación de azúcares y de aminoácidos gracias a la acción de microorganismos acidogénicos, concretamente bacterias anaeróbicas facultativas y estrictas como *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacillus*, etc. (Sayara y otros, 2019). Como resultado del proceso se obtienen ácidos grasos volátiles (AGV), destacando el ácido acético, propiónico o butírico, junto con otros productos como etanol, hidrógeno y dióxido de carbono. De todos estos productos, acetato (CH_3COO^-), H_2 y CO_2 pueden ser empleados como

sustrato por las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas, respectivamente, para la formación de metano (Meegoda y otros, 2018).

Sin embargo, el resto de AGV (propiónico, butírico, etc.) junto con otros compuestos como el etanol deben ser degradados en una etapa intermedia conocida como acetogénesis, siendo transformados en H_2 y CH_3COO^- . Esta parte del proceso es llevada a cabo por bacterias acidogénicas, que requieren de concentraciones bajas de hidrógeno para no ser inhibidas. Para ello, suele trabajarse con bacterias denominadas homoacetogénicas, como es el caso de *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum*, que se caracterizan por ser heterótrofas y producir exclusivamente acetato, consumiendo H_2 , lo que garantiza mantener presiones parciales bajas de este compuesto (Weiland, 2010).

Finalmente tiene lugar la etapa de metanogénesis, donde el CH_3COO^- y el H_2 producidos en etapas anteriores es empleado por un grupo de arqueas anaerobias estrictas para formar metano y CO_2 . Prácticamente todos los microorganismos metanogénicos son capaces de consumir hidrógeno, mientras que sólo los géneros *Methanosarcina*, *Metanomonococcus* y *Methanothrix* degradan el acético; a pesar de ello, un 70% del CH_4 obtenido en estos reactores procede de la descarboxilación del ácido acético (FAO y otros, 2011; Weiland, 2010).

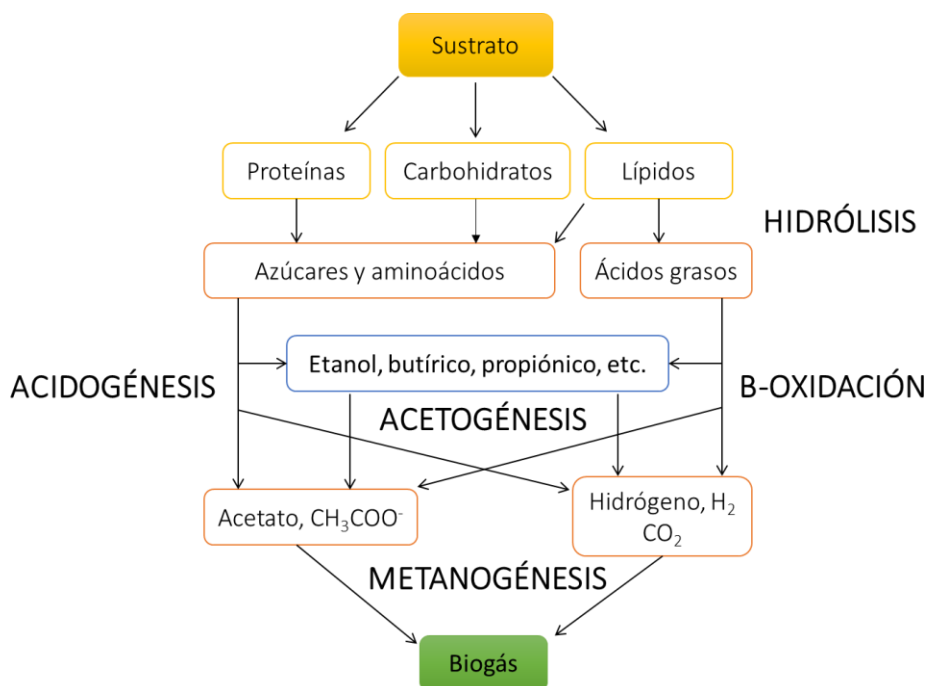


Figura 3. Esquema de las fases de la digestión anaerobia (Wilkinson, 2011)

Cabe destacar que, al igual que el sustrato de partida determina la composición del biogás, existen otros factores que influyen en el proceso de degradación, afectando al desarrollo de los microorganismos que se encuentran dentro del digestor:

- **Temperatura:** Influye en el proceso tanto cuantitativa como cualitativamente, puesto que determina tanto el tipo de microorganismos anaerobios (Figura 4v) como la evolución de las reacciones que se desarrollan en el interior del digestor. Estos pueden operar bajo condiciones psicrófilas (<20°C), mesófilas (30-40°C) y termófilas (45-60°C) (Neczaj y otros, 2019), siendo las condiciones mesófilas (37°C) las que reportan mejores prestaciones en lo relativo a estabilidad del proceso (Nsair y otros, 2020).

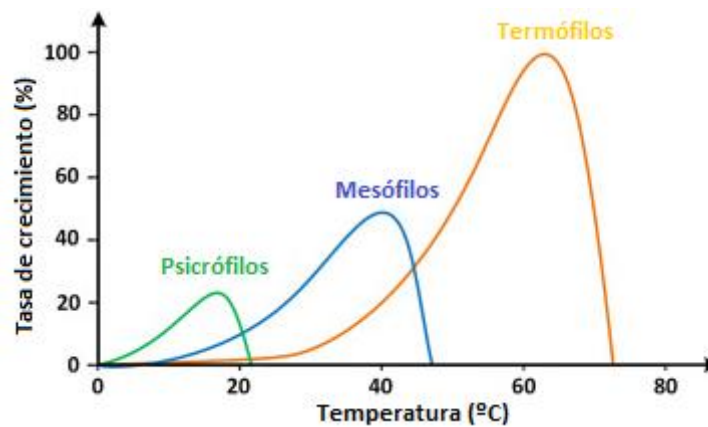


Figura 4. Crecimiento relativo de psicrófilos, mesófilos y termófilos (Neczaj y otros, 2019)

- **pH:** Este parámetro es esencial para el desarrollo de los microorganismos en el interior del reactor, y su valor óptimo varía en función de la etapa del proceso, ya que el crecimiento de bacterias acidogénicas se ve favorecido para pH de entre 5,5-7,0, mientras que para las metanogénicas el pH óptimo está en un rango de 6,3-7,8 (Sarker y otros, 2019). Esta diferencia de valores hace que existan dos configuraciones de digestores, en una o dos etapas, de forma que en los primeros es necesario trabajar con unos valores de pH que permitan la existencia tanto de microorganismos acidogénicos como metanogénicos (Dobre y otros, 2014).
- **Relación carbono/nitrógeno del sustrato:** Este ratio es un parámetro esencial en la producción de biogás y su valor óptimo se estima de 20-30:1 C:N, ya que valores superiores hacen que la degradación sea más lenta y valores

inferiores aumentan el riesgo de inhibición por presencia de amonio (Nsair y otros, 2020).

- **Tiempo de retención hidráulico (TRH):** Es uno de los parámetros de diseño más importantes a la hora de trabajar con procesos biológicos, y hace referencia al tiempo medio que pasan tanto el sustrato como los microorganismos dentro del digestor. Su importancia radica en que debe establecerse un equilibrio entre su valor y el tiempo de duplicación celular de los microorganismos del reactor, puesto que operar con tiempos de retención altos incrementan la producción de metano, pero conllevan un mayor volumen de reactor y un mayor coste de inmovilizado (Nelson, 2010). Por el contrario, trabajar a tiempos de retención bajos disminuye la eficiencia de tratamiento del sustrato y aumenta el riesgo de lavado de los microorganismos. Por lo general, se trabaja con un TRH que oscila entre los 10 y 25 días (Sarker y otros., 2019).
- **Inhibidores:** El inhibidor principal de este proceso es el amonio (NH_4^+), cuya presencia se encuentra ligada a la temperatura de operación y a la relación C/N: trabajar a altas temperaturas supone un aumento de la concentración de este compuesto, al igual que operar con relaciones de C/N bajas. Por otro lado, la presencia de AGVs también produce la disminución de la actividad de las bacterias metanogénicas; su aparición se relaciona con valores bajos de pH, por lo que la capacidad buffer del medio de reacción es fundamental para neutralizar su acumulación (Dobre y otros, 2014).

1.1.2. Situación actual y perspectivas globales

La transición hacia el empleo de energías limpias y renovables ha promovido el uso del biogás como forma de generación de energía eléctrica verde a nivel mundial (Figura 5). Hasta el año 2015 puede observarse un continuo crecimiento en este campo, donde los datos reportados en los últimos 10 años muestran que Europa es el mayor productor de energía generada a partir de biogás, alcanzando los 61 807 GWh en 2018, seguida por Estados Unidos.

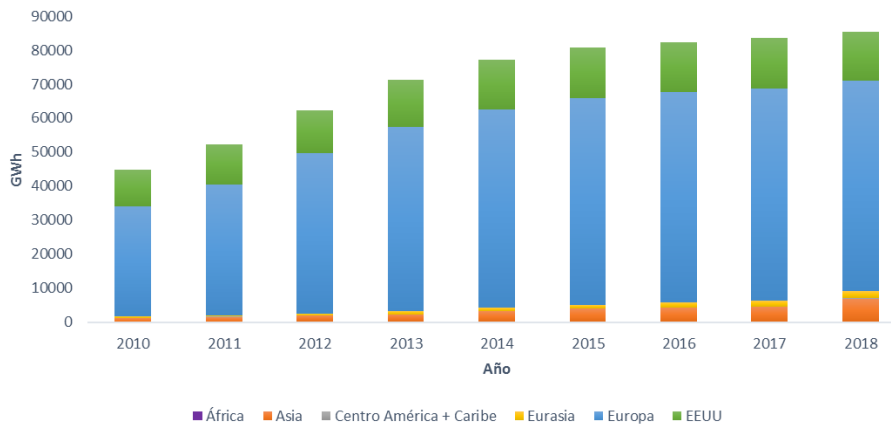


Figura 5. Evolución de la producción de energía eléctrica procedente de biogás en el mundo (IRENA, 2019)

Este crecimiento continuo viene principalmente impulsado por las políticas actuales en materia de energía. Las alarmantes predicciones acerca del cambio climático y sus consecuencias futuras hicieron que en el año 2015 se elaborase el Acuerdo de París, donde se estableció uno de los primeros acuerdos jurídicos universales en referencia al cambio climático. Teniendo este acuerdo como base, en los últimos años se han ido impulsando diferentes estrategias hasta llegar al Pacto Verde Europeo, elaborado en septiembre de 2020 y que tiene objetivo reducir las emisiones de gases de efecto hasta al menos el 55% de las registradas en el año 1990; para alcanzar este objetivo, el aumento de la eficiencia energética y el uso de energías renovables es un aspecto fundamental (European Commission, 2020).

Dentro de estas energías renovables se encuentra el biogás, registrándose a finales de 2019 un total de 18 943 plantas de generación de esta mezcla gaseosa en Europa (Figura 6A), incrementándose un 4% respecto del año anterior (EBA, 2020). La mayoría de ellas se encuentran situadas en Alemania, aunque también destaca la apertura de nuevas plantas en Reino Unido y Francia a lo largo del 2019 (EBA, 2020).

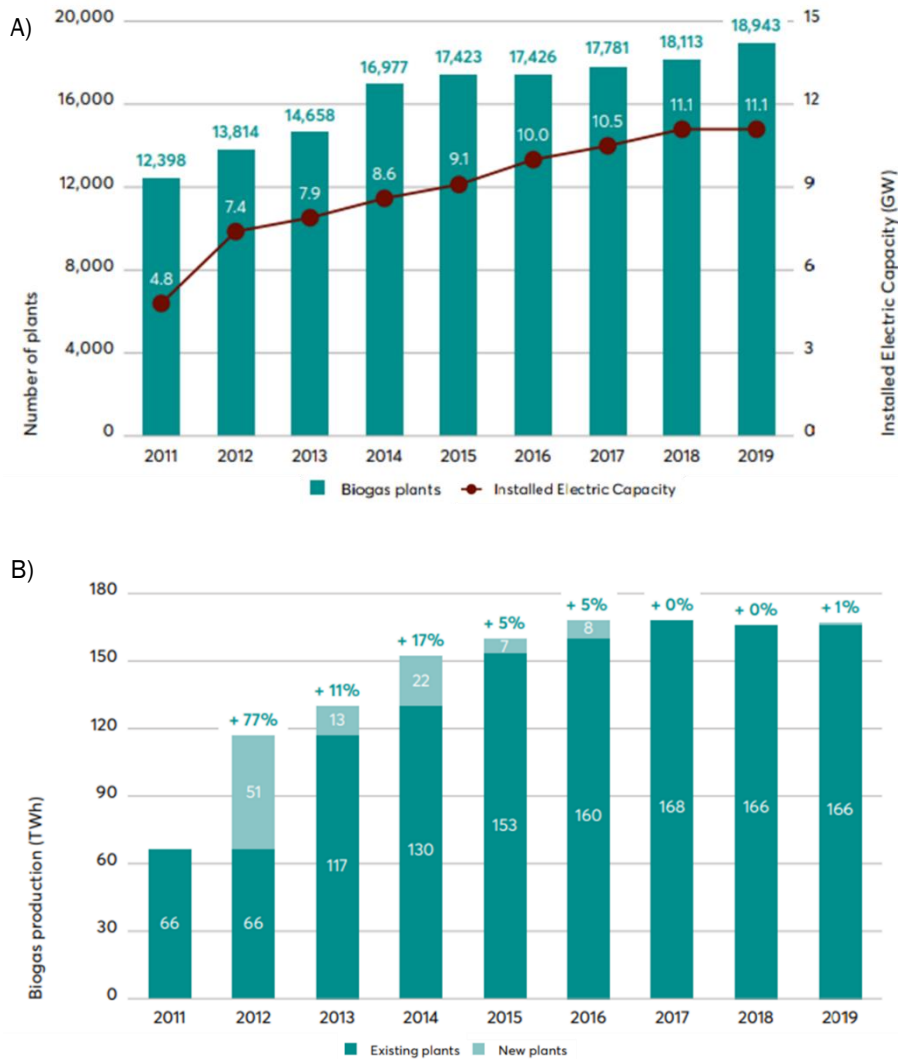


Figura 6. Evolución del número de plantas de generación de biogás y la energía eléctrica instalada (A) y la producción de biogás (B) en Europa en los últimos 10 años (EBA, 2020)

Gran parte del biogás generado en estas plantas se ha destinado a la producción de energía eléctrica, con una capacidad media de 100-500 kW por planta (Scarlat y otros, 2018). Por ello, el aumento en el número de plantas europeas ha ido ligado al aumento de la capacidad de generación de este tipo de energía, registrándose una capacidad total instalada de 11,1 GW en 2019 (Figura 6A).

Sin embargo, a pesar del crecimiento observado entre los años 2011 y 2015 en todos estos aspectos, en los últimos 5 años puede comprobarse que la producción de biogás se ha estabilizado (Figura 6B). La generación de energía eléctrica a partir de este biocombustible tampoco ha variado entre 2018 y 2019, un cambio de tendencia negativo respecto a años anteriores. La reducción de incentivos

económicos debida al bajo coste de otras fuentes de energía renovable es la principal causa de esta disminución en la demanda de biogás (Rodríguez y otros, 2020), de forma que estudiar alternativas a los usos energéticos convencionales, como son las biorrefinerías y la generación de productos de alto valor añadido, es fundamental para volver a incentivar el crecimiento de este mercado.

1.1.3. Usos convencionales

El empleo del biogás como forma de producción de energía es la aplicación más extendida. Puesto que esta mezcla gaseosa procede de la degradación de materia orgánica es considerado un biocombustible renovable y, debido a que su componente principal es el metano, sus aplicaciones energéticas son muy similares a las que presenta el gas natural, siendo necesario que presenten distintos grados de pureza respecto al CH₄, como se muestra en la Figura 7. De todos ellos, la producción de calor y electricidad son los usos más comunes en la actualidad, pero existe un creciente interés por el desarrollo de tecnologías que faciliten su implantación en el resto de los ámbitos.

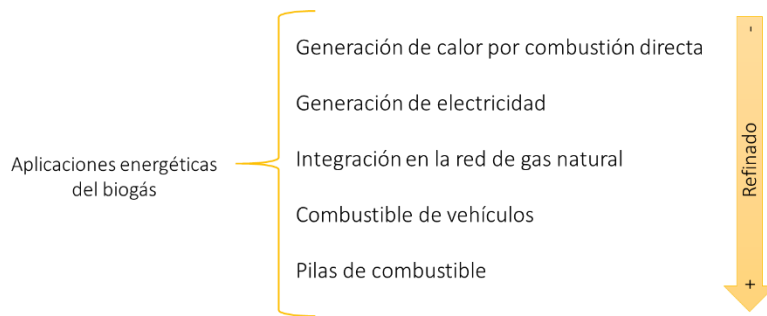


Figura 7. Aplicaciones energéticas del biogás (Cuesta Santianes y otros, 2017)

La aplicación energética más desarrollada es la generación de energía eléctrica a través de biogás, empleando para ello turbinas o motores de combustión. Éstos últimos destacan por ser la tecnología más empleada, pudiendo emplearse tanto motores de gasolina como de diésel, eliminando previamente impurezas que puedan afectar al rendimiento. Por otro lado, las turbinas se caracterizan por ser una forma de producción de energía más respetuosa con el medio ambiente, de fácil y rápida

implantación, pero cuya potencia y rendimiento se ve afectada por parámetros como la humedad o la presión (Cuesta Santianes y otros, 2017).

Seguida de la generación de electricidad, el uso más común es la generación de calor por combustión directa, abasteciendo a las calefacciones y generando agua caliente tanto en zonas residenciales como industriales. El principal problema que se presenta esta aplicación es la necesidad de que el lugar de la combustión se encuentre próximo a la zona de consumo debido al bajo poder calorífico de biogás (Tabla 2), lo que conlleva grandes pérdidas de calor en su distribución (Lisowyj y otros, 2020).

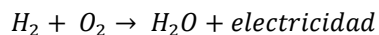
Tabla 2. Propiedades del biogás (FAO y otros, 2011)

| | |
|-----------------------------------|--|
| Contenido energético | 6-6,5 kWh m ⁻³ |
| Equivalente de combustible | 0,6-0,65 L petróleo m ⁻³ biogás |
| Límite de explosión | 6-12% de biogás en aire |
| Temperatura de ignición | 650-750 °C |
| Densidad | 1,2 kg m ⁻³ |

Cabe destacar que una alternativa de gran interés es el empleo del biogás en sistemas de cogeneración, donde se produce calor y electricidad de forma simultánea, de forma que esta última puede ser introducida en las redes de suministro eléctrico mientras que el calor generado puede ser aprovechado en los sistemas de calefacción urbanos (Lisowyj y otros, 2020).

Otra aplicación de interés viene dada por la gran cantidad de metano presente en el biogás, de forma que este puede ser purificado para obtener biometano y ser integrado en la red de gas natural o empleado como combustible de vehículos. Esta última opción es una de las aplicaciones más prometedoras de cara al futuro, donde el empleo del biogás sería equivalente a los actuales modelos de coches que funcionan con gas natural, puesto que sólo se requiere un proceso de refinado previo que permita alcanzar una composición del 95% de CH₄ (Kadam y otros, 2017). También dentro de la industria del automóvil, aunque aún se encuentra en fase de desarrollo, aparece el uso del biogás en pilas de combustible, sistemas electroquímicos capaces de conseguir que la energía de una reacción se transforme en energía eléctrica sin necesidad de recargas (Cuesta Santianes y otros, 2017). Su

fundamento es el contrario al de la electrólisis del agua: la reacción entre el hidrógeno y el oxígeno permite obtener electricidad con una eficacia mayor al empleo de combustibles fósiles y emitiendo exclusivamente vapor de agua.



Para emplear biogás en este proceso, es necesaria su transformación a hidrógeno, lo que se consigue mediante los procesos de reformado con vapor, oxidación parcial y autorreformado (Tabla 3). De todos ellos, los dos últimos son los que presentan una mayor eficacia energética, mientras que el reformado produce una mayor cantidad de H₂ por unidad de combustible (Cuesta Santianes y otros, 2017).

Tabla 3. Procesos de producción de hidrógeno a partir de metano

| | REACCIÓN | PROCESO |
|-----------------------------|---|---|
| REFORMADO CON VAPOR DE AGUA | $CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$ | Mezcla de CH ₄ con vapor de agua a alta temperatura |
| OXIDACIÓN PARCIAL | $CH_4 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow CO + 2H_2$ | Reacción del CH ₄ con una cantidad de O ₂ inferior a la estequiométrica |
| AUTO-REFORMADO | $CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$ $CH_4 + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 4H_2$ $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ $CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$ | Combinación de los anteriores |

1.1.4. Productos de valor añadido partir de biogás

En la actualidad, existe un gran interés científico por buscar formas de empleo del biogás diferentes a las aplicaciones energéticas. Una de las alternativas que se encuentra en desarrollo es la generación de productos de valor añadido. Puesto que el componente principal de esta mezcla gaseosa es el CH₄, desarrollar biotecnologías basadas en la bioconversión de este compuesto a través de microorganismos que puedan emplearlo como fuente de carbono y energía supone una gran alternativa a los usos convencionales y una forma de incentivar el empleo en el sector del biogás. Este tipo de bacterias degradadoras de CH₄, denominadas metanotróficas, son capaces de generar una gran variedad de compuestos de alto valor (Tabla 4) que pueden ser empleados en varios ámbitos (Cantera y otros, 2018).

Tabla 4. Productos de alto valor añadido derivados de la actividad de los metanótrofos (Cantera y otros, 2018)

| | Tipo de producto | Propiedades de interés | Campos de aplicación |
|------------------------------|--------------------|--|--|
| Ectoína | Iminoácido cíclico | Estabilizante de enzimas, complejos de ADN-proteína y ácidos nucleicos | Medicina, nutrición y cosmética |
| Proteína unicelular (SCP) | Proteína | Alto contenido en aminoácidos esenciales | Nutrición |
| Biodiesel | Lípidos | Pueden ser transesterificados para formar biocombustibles | Combustibles |
| Polisacáridos extracelulares | Polímeros | Propiedades adhesivas y coloidales | Industria alimentaria, farmacéutica, textil... |
| Bioplásticos | Polímeros | Propiedades mecánicas similares a los plásticos derivados del petróleo | Envasado, medicina, agricultura... |

La producción de bioplásticos en forma de PHAs, llevada a cabo por microorganismos capaces de sintetizar este biopolímero en condiciones de limitación de nitrógeno, suscita un gran interés y se prevé que sea el sustituto de los plásticos derivados del petróleo, puesto que sus propiedades mecánicas son similares, además de ser biodegradables. El principal problema que presenta la producción a gran escala de este biopolímero es el alto coste asociado al proceso de producción, donde la fuente de carbono empleada supone un 50% del coste total (Raza y otros, 2018).

Buscar fuentes de carbono que abaraten este proceso de producción es fundamental para poder competir contra los plásticos convencionales. Una alternativa de interés es emplear el CH₄ presente en el biogás como fuente de carbono para que bacterias metanotróficas produzcan PHAs bajo condiciones de limitación de nutrientes (Pérez y otros, 2020). Emplear un producto de la digestión anaerobia con el fin de obtener productos de alto valor añadido pertenece al grupo de procesos sostenibles con los que se busca trabajar en las biorrefinerías. Este tipo de industria surge con la idea emplear biomasa para obtener biocombustibles, energía y productos químicos, buscando competir con la refinería actual basada en el uso del petróleo (Cherubini,

2010). En concreto, la versatilidad que presenta el biogás hace que su aplicación dentro de las biorrefinerías sea fundamental, ya que puede ser empleado tanto para producir energía y calor como en aplicaciones menos convencionales. Dentro de estas últimas, la valorización de sus productos surge como una de las alternativas con mayor potencial y con la que se busca incrementar el valor de las materias primas de partida, reduciendo la cantidad de sustrato empleada (Hagman y otros, 2018).

1.2. Metanótrofos para la degradación del CH₄

Los metanótrofos se caracterizan por ser microorganismos capaces de oxidar el metano, empleándolo como fuente de carbono y energía, generalmente bajo condiciones aerobias, aunque también existen especies capaces de acoplar este proceso a la reducción de compuestos como sulfato, nitrato, nitrito, etc. en ausencia de oxígeno. La mayoría de los metanótrofos pertenecen al filo de las bacterias gram negativa, concretamente a los grupos γ y α -proteobacterias, que en el medio ambiente pueden encontrarse en humedales, sedimentos marinos, aguas subterráneas, suelos de vertederos, etc. Por lo general, los microorganismos metanótrofos tienden a situarse en la interfase de zonas aerobias y anaerobias, donde hay flujos considerables de CH₄ y O₂ (López y otros, 2019; Strong y otros, 2015).

1.2.1. Clasificación

Atendiendo a las características morfológicas y fisiológicas, entre otras, los metanótrofos pueden clasificarse en tres grandes grupos (Tabla 5): tipo I (MOB I, γ -proteobacterias), tipo II (MOB II, α -proteobacterias) y tipo X (MOB X), siendo considerados estos últimos un subgrupo de los MOB I.

Tabla 5. Clasificación y características de los metanótrofos (López y otros, 2019; Strong y otros, 2015)

| | MOB I | MOB II | MOB X |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Ruta de asimilación del carbono | Ribulosa Monofosfato (RuMP) | Serina | Ribulosa Monofosfato (RuMP) |
| Ácidos grasos fosfolípidos | Cadenas de 14-16 carbonos | Cadenas de 18 carbonos | Características comunes a MOB I y MOB II |
| Disposición de la membrana | Haces de discos vesiculares | Alineada a lo largo de la periferia de la célula | |
| Capacidad para fijar N ₂ | Ciertos géneros | Sí | |
| Géneros | <i>Methylomonas</i> <i>Methylobacter</i> <i>Methylosarcina</i> <i>Methylococcus</i> | <i>Methylocystis</i> <i>Methylosinus</i> <i>Methylocella</i> <i>Methylocapsa</i> | <i>Methylococcus</i> |

1.2.2. Rutas metabólicas de oxidación aerobia del metano

El proceso de degradación del CH₄ por parte de los metanótrofos comienza con su conversión en metanol (CH₃OH), gracias a la acción de la enzima metano monooxigenasa (MMO). Esta enzima, que actúa como catalizador en esta hidroxilación, aparece en dos formas distintas: particulada (pMMO) y soluble (sMMO). La primera de ellas se encuentra en la membrana citoplasmática de la mayoría de metanótrofos, mientras que la sMMO aparece en el citoplasma y es característica de los MOB II, puesto que se han identificado muy pocos MOB I capaces de sintetizarla (López y otros, 2019).

Obtenido el metanol, la enzima metanol deshidrogenasa (MeDH) cataliza la oxidación de este a formaldehído, que es empleado tanto para la producción de biomasa y metabolitos (siguiendo la ruta de la serina o de la RuMP) como para su mineralización hasta formar CO₂ (Figura 8).

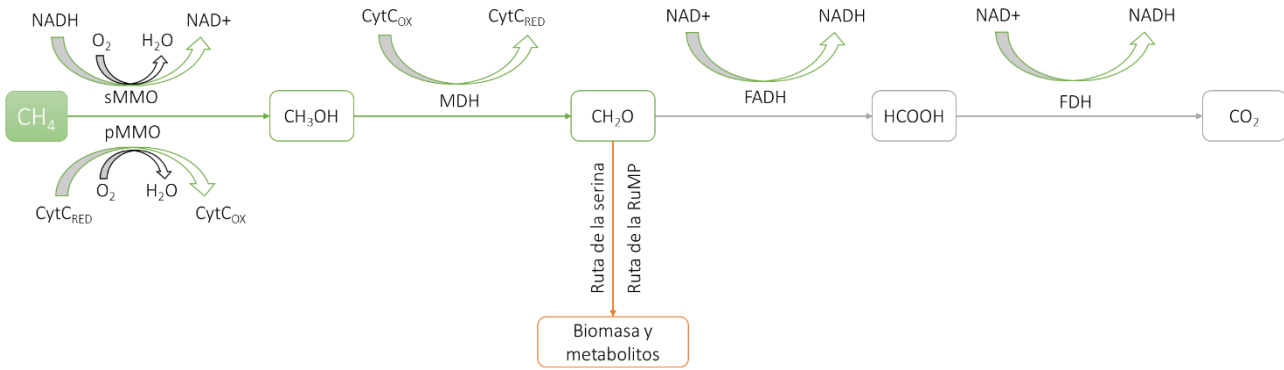
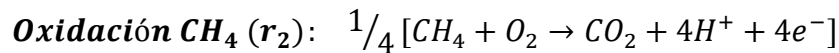
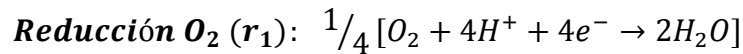
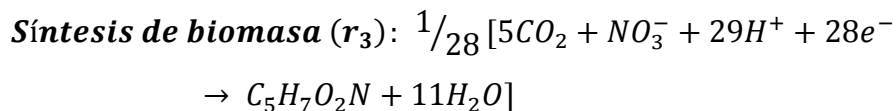


Figura 8. Ruta de la oxidación aerobia del metano (Strong y otros, 2015)

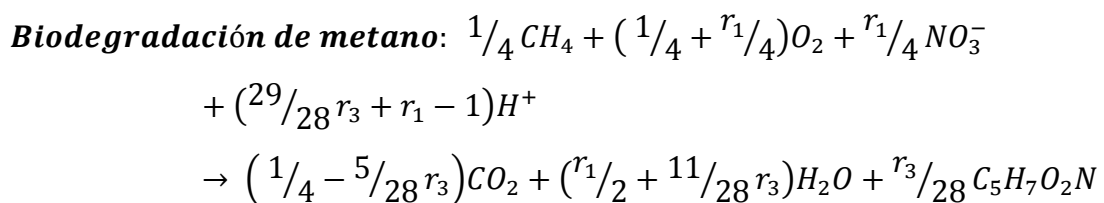
Respecto a la ruta metabólica que permite el crecimiento de la biomasa, la estequiometría de esta reacción puede expresarse en función de la fracción de electrones requeridos (López y otros, 2019; Rostkowski y otros, 2013). Al producirse la oxidación del CH_4 , una fracción de los electrones obtenidos es empleada para reducir el O_2 a H_2O (r_1), mientras que la fracción restante se destina al crecimiento de biomasa (r_2). Por lo tanto, en este proceso el oxígeno actúa como aceptor final de electrones para producir energía, mientras que el metano actúa como donante de electrones.



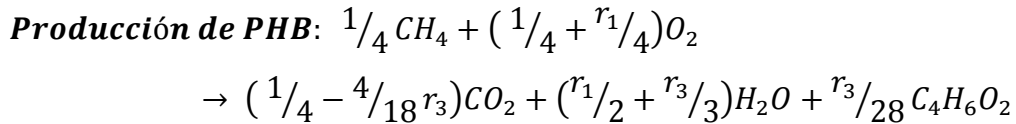
También debe tenerse en cuenta la influencia de los macro y micronutrientes dentro del proceso. En el caso de emplear nitrato (NO_3^-) como fuente de nitrógeno, la reacción de síntesis de biomasa vendrá dada por la siguiente expresión (r_3).



La reacción estequiométrica de biodegradación del metano llevada a cabo por los metanótrofos se obtiene de la combinación de r_1 , r_2 y r_3 :



De esta forma, puede comprobarse que las necesidades de oxígeno dependerán de la fuente de nitrógeno empleado, y de ello a su vez la generación de biomasa en relación al metano degradado. Si se emplea NO_3^- como fuente de nitrógeno, el rendimiento de la biomasa (Y_{XS} , g biomasa $\text{g}^{-1} \text{CH}_4$) será de $113r_1/28:4$, mientras que la síntesis de PHB, que se lleva a cabo en ausencia de nitrógeno, presenta un rendimiento (g PHB $\text{g}^{-1} \text{CH}_4$) de $86r_1/18:4$ (Rostkowski y otros, 2013).



Otros factores, como son el ratio de $\text{O}_2:\text{CH}_4$, pH o temperatura, también deben tenerse en consideración, puesto que para que pueda llevarse a cabo la oxidación del metano debe mantenerse un ratio superior a 1:5:1, al igual que debe trabajarse con las condiciones óptimas de pH y temperaturas. El rango de valores óptimos de pH y temperatura para el crecimiento de metanótrofos son 6,8-7,5 y 25-30°C (condiciones mesofílicas), respectivamente (López y otros, 2019).

1.2.3. Metanótrofos tipo II

Los MOB II se caracterizan por ser α -proteobacterias capaces de degradar CH_4 siguiendo la vía de la serina, y presentan ciertas ventajas respecto a los metanótrofos de tipo I a la hora de emplearlos en aplicaciones biotecnológicas. Por un lado, la asimilación del metano en este ciclo se caracteriza por presentar altos flujos de acetil-CoA, lo que facilita su uso para la producción de biocombustibles o derivados lipídicos. Además, puesto que son α -proteobacterias, son capaces de utilizar el CH_4 y el CO_2 , lo que hace que resulte interesante trabajar con biogás con este tipo de microorganismos.

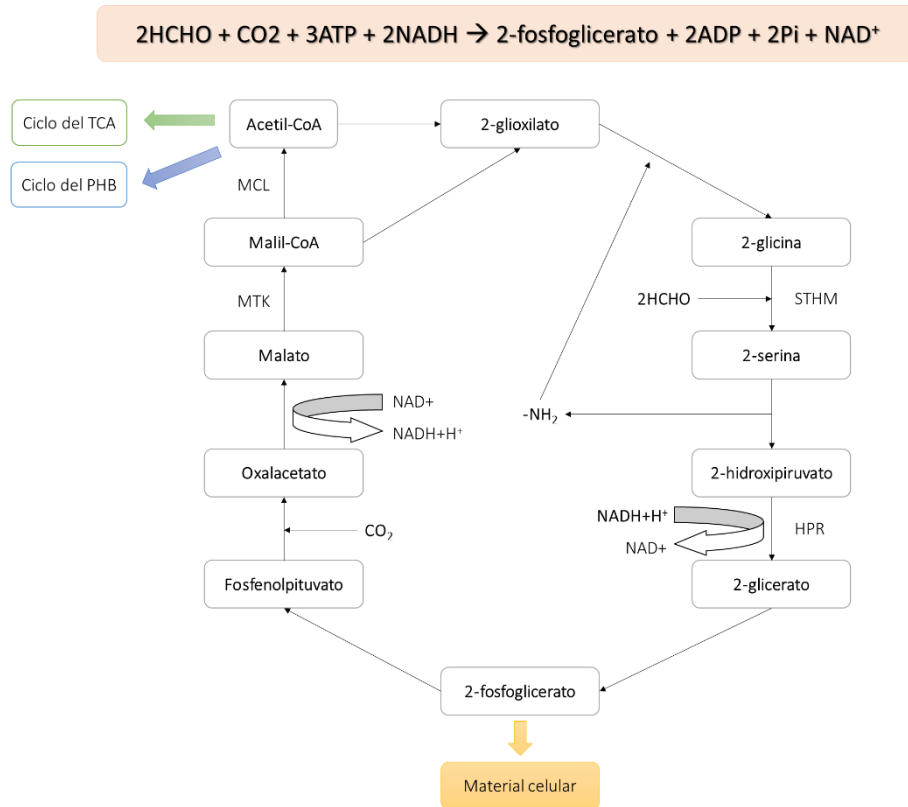


Figura 9. Ciclo de la serina en MOB II (Hanson & Hanson, 1996)

El inicio del ciclo de la serina (Figura 9) viene dado por la acción de la serina hidroximetil transferasa (STHM), que reacciona con la glicina para formar la serina. Tras una serie de reacciones donde participan la hidroxipiruvato reductasa (HPR) y la malato tioquinasa (MTK) se obtiene el malil-CoA, que se transforma tanto en el glioxilato, que continúa el ciclo, como en acetil-CoA por acción de la malil-CoA liasa (MCL). Este último compuesto se involucra en dos rutas distintas en función de si existe o no limitación de nutrientes: el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) se lleva a cabo en caso de que no se dé dicha limitación, mientras que el ciclo de síntesis del PHB se inicia bajo condiciones limitantes de nutrientes. Esta desviación del acetil-CoA hacia una ruta u otra viene dada por la presencia de la coenzima A, ya que es liberada al producirse el ciclo del TCA y actúa como inhibidor de una de las enzimas principales que participan en la síntesis de biopolímeros como el PHB (Rodríguez y otros, 2020).

Esta última ruta metabólica presente en los MOB II suscita un gran interés, puesto que supone una forma de producir polímeros biodegradables y biocompatibles. Especies como *Methylocystis*, *Methylosinus* y *Methylocella* son capaces de acumular

hasta un 50% de su peso seco en forma de PHB en condiciones de limitación de nitrógeno (Kalyuzhnaya y otros, 2015). Concretamente, la especie *Methylocystis hirsuta* destaca por su alta capacidad para acumular PHB. Trabajos con esta cepa reportan valores de acumulación superiores al 45% de su peso seco (López y otros, 2018), superiores al de otras especies de este mismo género. En un estudio sobre la influencia del ratio $\text{CH}_4:\text{O}_2$ en esta cepa, Rodríguez y otros (2020) observaron máximas capacidades de acumulación a un ratio 1:2. Además, la escasa influencia que tiene la presencia de H_2S y CO_2 en la fase gaseosa tanto en el crecimiento de la biomasa como en la síntesis de PHB (López y otros, 2018) supone un punto a favor al empleo el biogás como fuente de carbono.

Dentro de este proceso, la selección de la fuente de nitrógeno juega un papel fundamental en el desarrollo de la biomasa. Por lo general, el medio mineral empleado para trabajar con bacterias oxidantes del metano presenta en su composición nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+), siendo este último el que reporta mayores tasas de crecimiento, pero su similitud estructural con el metano da lugar a inhibición competitiva de la enzima MMO, fundamental en el proceso de oxidación del metano (Tays y otros, 2018). Es por ello que emplear nitrato como fuente de nitrógeno se presenta como una buena alternativa, siendo necesario tener en cuenta que la presencia de nitrógeno en exceso puede causar la formación de sustancias inhibitoras del crecimiento, como es el caso del nitrito (NO_2^-) (Stein y otros, 2011). Esto se debe a que los metanótrofos, a pesar de llevar a cabo procesos pertenecientes al ciclo del nitrógeno (Figura 10), no son capaces de realizar el proceso de desnitrificación de forma completa (Strong y otros, 2015). Por ello, el nitrato contenido en el medio mineral es reducido a nitrito, cuya acumulación (<10 nM NO_2^-) en el caldo de cultivo conduce a una inhibición de la actividad metanotrófica (Rodríguez y otros, 2020).

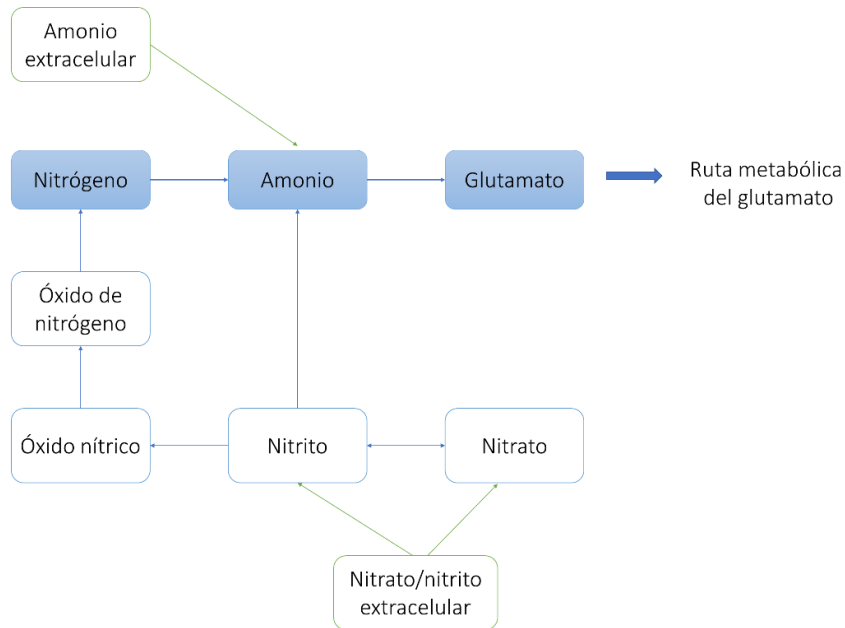
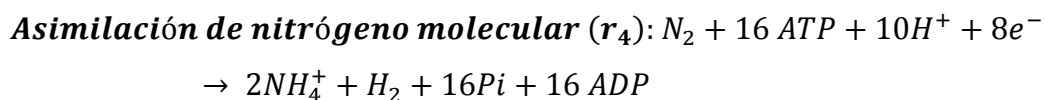


Figura 10. Esquema de la ruta metabólica del nitrógeno (Cai y otros, 2016)

Cabe destacar que los MOB II también pueden emplear el nitrógeno atmosférico como fuente de N, ya que son capaces de asimilar este N₂ gaseoso para formar amonio, el cual puede ser empleado para continuar con las rutas metabólicas (Murrell y otros, 1983). Esta propiedad es característica de los microorganismos diazótrofos, cuya actividad se ve afectada por la presencia de O₂ dada la inhibición que causa sobre la enzima nitrogenasa a determinadas concentraciones (Murrell & Dalton, 1983). Este complejo enzimático es indispensable para la reducción de los protones a H₂ (r₄) en ausencia de nitrógeno en el medio (Takeda, 1988).



1.3. Producción de biopolímeros a partir de biogás - Polihidroxibutirato (PHB)

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) se caracterizan por ser biopoliésteres sintetizados por ciertos microorganismos como fuente de carbono y energía. Aparecen en forma de inclusiones lipídicas en el interior de la estructura celular, presentando una forma granular de entre 0,2 y 0,5 µm, y son producidos por bacterias gram negativas, como es el caso de los metanótrofos. La generación de PHAs puede darse en condiciones aerobias o anaerobias, y su acumulación se produce principalmente en condiciones

limitantes de nutrientes aunque también puede darse bajo condiciones favorables de crecimiento, dependiendo del tipo de bacteria (Raza y otros, 2018).

Sus propiedades mecánicas hacen que sean los sustitutos de plásticos derivados del petróleo más prometedores, presentando la gran ventaja de ser biodegradables, pero su alto precio de mercado, que varía entre 4-20€ kg⁻¹ PHA (Pérez y otros, 2020), dificulta su competitividad frente a la industria de los plásticos convencionales. Puesto que entre un 40-50% de dicho coste viene dado por la fuente de carbono empleada, generalmente glucosa o ácidos grasos volátiles, es fundamental buscar alternativas que abaraten el proceso. El uso del biogás, rico en CH₄, surge como una fuente de bajo coste que puede ser empleada por las bacterias oxidantes del metano para sintetizar este biopolímero. Además, la posibilidad de combinar dicha producción junto con la generación de energía le aporta un mayor valor a este proceso. En países donde el precio de la energía no es elevado, emplear el biogás que no es aprovechado con este fin para sintetizar PHAs supone reducir su coste de producción hasta los 4,1 € kg⁻¹ PHA, al igual que en países donde los costes energéticos son elevados la producción de biopolímeros se presenta como un proceso rentable combinándolo con sistemas de cogeneración (Pérez y otros, 2020).

1.3.1. Tipos y propiedades de los PHAs

Los PHAs presentan la forma general que se muestra en la Figura 11, de forma que el grupo funcional que presente el radical R y la longitud de la cadena determinan el tipo de polímero. Esta última característica marca su clasificación, distinguiéndose así entre biopolímeros de cadena corta (scl, de longitud inferior a 5 átomos de carbono), media (mcl, cadenas de entre 5 y 14 átomos de carbono) y larga (lcl, de longitud superior a 14 átomos de carbono).

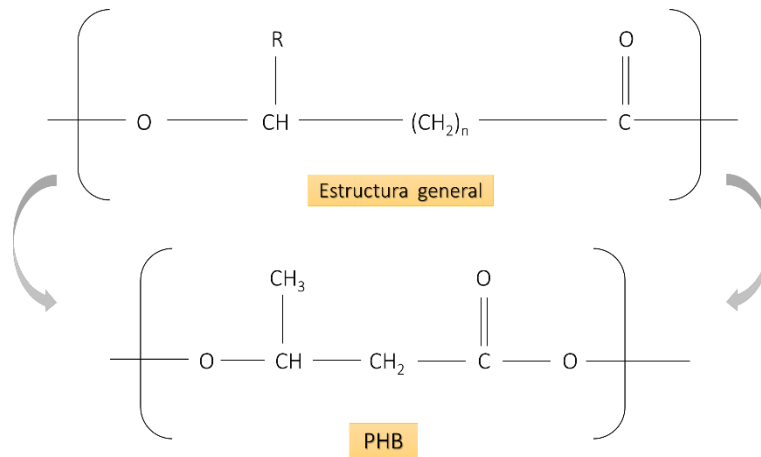


Figura 11. Estructura general de los PHAs y el homopolímero polihidroxibutirato (PHB)

Las propiedades y composición química de estos compuestos varían según el tipo de PHA formado. De forma general, se caracterizan por presentar propiedades mecánicas similares a los termoplásticos derivados del petróleo: son piezoeléctricos, elastómeros, resistentes a la luz UV, insolubles en agua, solubles en compuestos clorados, etc. Además, son biodegradables y biocompatibles, aunque presentan una baja estabilidad térmica y pobres propiedades mecánicas (Tabla 6) (Poltronieri y otros, 2017). De los diferentes tipos, el polihidroxibutirato (PHB) destaca por su similitud con el polipropileno, pudiendo actuar como barrera para gases y presentando buena resistencia frente a la humedad (Raza y otros, 2018).

Tabla 6. Rango de valores de diferentes propiedades de los PHAs (Bugnicourt y otros, 2014)

| | |
|---|---|
| TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA | 2 °C |
| TEMPERATURA DE FUSIÓN | 160-175 °C |
| GRADO DE CRISTALINIDAD | 40-60% |
| MÓDULO DE YOUNG | 1-2 GPa |
| RESISTENCIA A LA TRACCIÓN | 15-40 MPa |
| ALARGAMIENTO A LA ROTURA | 1-15% |
| ÍNDICE DE TRANSMISIÓN DE VAPOR DE AGUA | 2,36 g mm m ⁻² d ⁻¹ |
| ÍNDICE DE TRANSMISIÓN DE O ₂ | 55,12 cc mm m ⁻² d ⁻¹ |

1.3.2. Síntesis de PHB a partir de biogás

La generación de PHB por parte de los metanótrofos tipo II es llevada a cabo a través de una ruta metabólica alternativa a la de la serina, empleando el acetil-CoA obtenida en ella (Figura 12). Este ciclo se inicia gracias a la acción de la enzima β -cetotilasa, que transforma el acetil en acetoacetyl-CoA, pasando después a obtenerse la hidroxiacetyl-CoA al actuar la correspondiente enzima reductasa. Finalmente, la enzima PHA sintasa cataliza la formación de PHA a través de la esterificación del 3-hidroxybutiril-CoA a PHA.

Tabla 7. Producción de PHB con diferentes cultivos puros (López y otros, 2019)

| Cepa empleada | Nutriente limitado | Máximo contenido de PHB (%) | Máximo rendimiento de PHB (g PHB g ⁻¹ CH ₄) | Referencia |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|--|-------------------------|
| <i>M. parvus</i> | N | 68 | 0,67 (teórico) | Asenjo y otros, 1986 |
| <i>Methylocystis sp. GB25</i> | P | 51 | - | Wendlandt y otros, 2001 |
| <i>M. hirsuta</i> | N | 45-50 | 0,42-0,46 | López y otros, 2018 |
| <i>M. parvus OBBP</i> | N | 49,4 | - | Sundstrom y otros, 2015 |

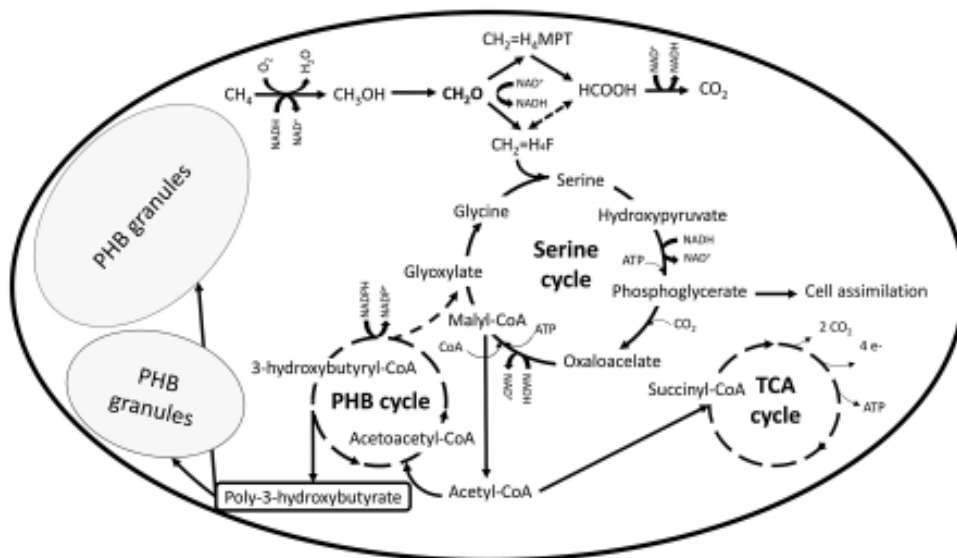


Figura 12. Ciclo de la serina y ruta metabólica para la síntesis del PHB en MOB II (López y otros, 2019)

En el caso de las MOB II, el único tipo de PHA que pueden producir al emplear el metano como fuente de carbono y energía es el PHB, donde la limitación de nutrientes como nitrógeno, fósforo o magnesio es fundamental para que pueda llevarse a cabo esta ruta metabólica (Raza y otros, 2018) (Tabla 7). Es necesario tener en cuenta la función del PHB dentro de la célula, que es actuar como almacén de energía y ser empleado para poder continuar el crecimiento celular cuando la fuente de nitrógeno se encuentre disponible de nuevo. Trabajos previos con la cepa *Methylocystis parvus* demostraron que el PHB acumulado se consume cuando hay disponibilidad de nitrógeno, siendo empleado por la célula para sintetizar proteínas sin que se lleve a cabo la duplicación celular, siempre que no exista aporte de CH₄. Por el contrario, el aporte simultáneo de CH₄ y N da lugar a crecimiento celular con mayores tasas de crecimiento que cuando existe PHB almacenado. En este proceso el metano es empleado como fuente de energía y el PHB como fuente de carbono (Pieja y otros, 2011).

1.3.3. Aplicaciones de los PHAs

Las características que presentan este tipo de biopolímeros hacen que puedan ser empleados en diversas áreas, desde la medicina hasta la agricultura o producción de envases, como se muestra en la Figura 13.

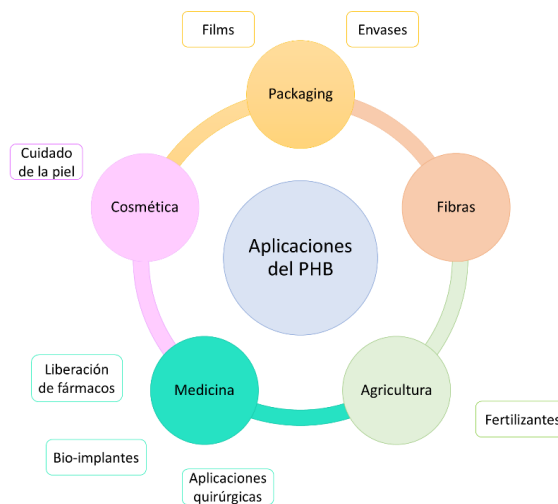


Figura 13. Aplicaciones de los PHAs a nivel industrial

Su similitud con los plásticos de baja densidad como el polietileno, que se caracterizan por ser fácilmente moldeables, hacen que puedan emplearse para formar fibras o films. Su flexibilidad y su impermeabilidad permiten su uso en multitud de envases, como botellas, tapones, etc. proporcionando envases desechables y biodegradables. Además, la combinación de PHB junto con otro tipo de compuestos mejora sus prestaciones, como puede ser la adición de resinas de poli acetato de vinilo para mejorar sus propiedades físicas (Poltronieri y otros, 2017).

Por otro lado, destaca su aplicación en la agricultura en forma de fertilizante, aprovechando su biodegradabilidad: al introducir el fertilizante en el interior de una cobertura de PHAs y colocarse en el suelo, su liberación se hace de forma gradual, lo que reduce los costes de fertilización y aumenta su eficacia (Poltronieri y otros, 2017).

Uno de los campos más prometedores de aplicación de estos biopolímeros es la medicina. El PHB, junto con el PHBV, pueden emplearse como matrices en las que llevar a cabo la proliferación *in vitro* de células humanas, puesto que existen estudios que demuestran que se consigue una buena adhesión entre células de diferentes partes del cuerpo y estos polímeros. También destaca su aplicación dentro de la liberación de fármacos gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, empleando para ello esferas de PHAs de tamaño micro y nano en cuyo interior se encuentra el fármaco que se desea suministrar (Raza y otros, 2018).

Finalmente, otro campo en desarrollo donde se emplean PHAs es en la producción de cosméticos, puesto que sus efectos son similares a los ácidos carboxílicos empleados en el cuidado de la piel. De esta forma, aquellos PHAs que presenten al menos un grupo carboxilo en posición α pueden ser empleados en este tipo de productos gracias a sus beneficios en la piel (Kornhauser, 2010).

Cabe destacar que el interés por desarrollar y trabajar con este tipo de bioplásticos se ha ido incrementando en los últimos años. A pesar de representar apenas el 1% de los más de 368 millones de plásticos generados anualmente, existe un creciente interés por el desarrollo y aplicación de los bioplásticos (European Bioplastics, 2020). En el caso concreto de los PHAs, en el año 2020 suponen un 1,7% de la capacidad

de producción global de los bioplásticos (Figura 14), y se espera que en los próximos cinco años este valor se vea incrementado.

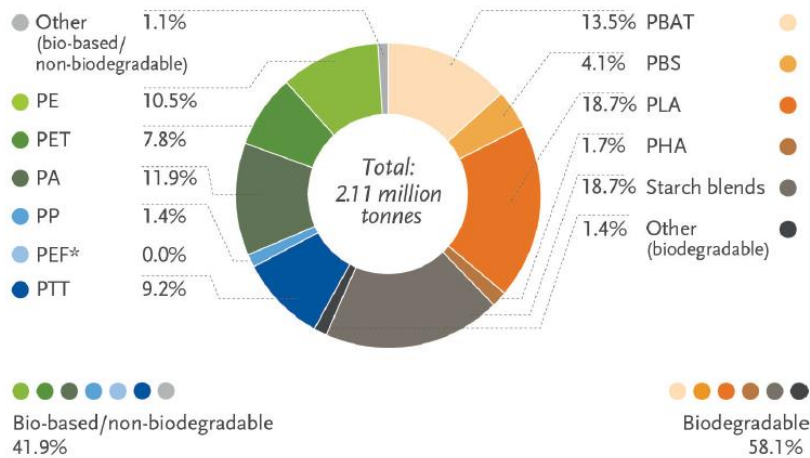


Figura 14. Capacidad de producción global de bioplásticos en 2020 (European Bioplastics, 2020)

1.4. Tecnologías para la bio-conversión del metano

La degradación del CH₄ llevada a cabo mediante procesos biotecnológicos se basa en la oxidación enzimática de este compuesto por la acción de la MMO presente en los metanótrofos. Para ello, pueden emplearse tanto reactores de lecho empacado como de biomasa suspendida, que se caracterizan ambos por contener una fase acuosa en la que se encuentran los compuestos necesarios para el crecimiento y mantenimiento celular, al igual que actúa como medio en el que se llevan a cabo las reacciones necesarias para la degradación del CH₄ (López y otros, 2019).

Las condiciones de operación empleadas, junto con su gran efectividad y bajo impacto ambiental, han hecho que en los últimos años aumente el interés por desarrollar y mejorar este tipo de tecnologías. El mayor reto que presentan las tecnologías de bioconversión de metano es mejorar la transferencia de materia entre la fase líquida y gaseosa debido a la baja solubilidad del CH₄ y O₂ en agua, cuyas constantes de Henry son $1,4 \cdot 10^{-5}$ y $1,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$ respectivamente (Sander, 2015). Actualmente, conseguir altas eficacias de biodegradación de metano conlleva trabajar con tiempos de residencia altos para aumentar los tiempos de contacto entre la fase gas y la fase líquida, lo que implica altos volúmenes de trabajo e incrementa los costes de inversión; es por ello que es fundamental desarrollar

diferentes estrategias que permitan trabajar con reactores más compactos y una alta transferencia de materia (López y otros, 2019).

1.4.1. Biorreactores de biomasa suspendida

A pesar de que los biorreactores de lecho empaquetado son los más empleados para el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles (COVs), las bajas capacidades de eliminación reportadas para compuestos poco solubles en agua y el hecho de que los microorganismos se encuentren retenidos en la biopelícula formada sobre el relleno dificultando su extracción hacen que no sea la configuración más adecuada para la obtención de productos de valor añadido que se generan de forma intracelular (Koller, 2020; J. Rocha-Rios y otros, 2013). Por ello, los reactores de biomasa suspendida se presentan como la mejor opción, ya que la extracción de productos como el PHB puede realizarse de manera relativamente sencilla, al igual que puede operarse con ellos empleando diferentes estrategias para poder optimizar el proceso.

Este tipo de reactores se caracterizan por presentar flujo turbulento, lo que permite incrementar la transferencia de materia. Los más empleados, por su fácil control y monitorización, son los reactores de tanque agitado y las columnas de burbujeo, que se caracterizan por mantener la biomasa suspendida en el medio de reacción, ya sea por métodos mecánicos o por el propio burbujeo de la fase gaseosa (de forma neumática) (López y otros, 2019).

- **Reactores de tanque agitado (STRs)**

Los STRs son tanques que presentan agitación mecánica continua para asegurar condiciones de mezcla perfecta en su interior y mantener la biomasa suspendida (Figura 15). Además, esta agitación permite romper las burbujas del gas introducido por la parte inferior para aumentar su

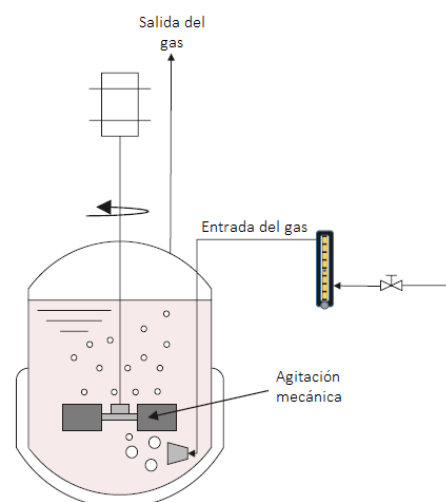


Figura 15. Esquema de un STR (López y otros, 2019)

área superficial, consiguiéndose así mejorar la transferencia del CH_4 de la fase gas a la líquida, reportándose eficacias de eliminación (RE) de entre el 50-60% para tiempos de residencia de 4-10 min (José Rocha-Rios y otros, 2009).

El principal inconveniente de este tipo de reactor son los altos requerimientos energéticos debido a la agitación, lo que encarece los costes de operación del proceso, y el posible estrés mecánico al que puede someterse al caldo de cultivo.

- **Columnas de burbujeo (BCBs)**

Las BCBs son tanques cilíndricos que carecen de agitación mecánica, de forma que la turbulencia es generada por la fase gaseosa al ser introducida a través de difusores porosos con un tamaño de poro de $<2 \mu\text{m}$ (Figura 16). Reducir el tamaño de burbuja hace que el área superficial que éstas presentan sea mayor, lo que permite aumentar la transferencia de materia gas-líquido en el sistema. Este sistema presenta costes de operación más bajos al carecer de agitación mecánica con respecto a los STRs, aunque también pueden presentar algunas desventajas como una peor circulación de líquido y por tanto menor distribución de nutrientes, coalescencia de burbujas, etc. (Koller, 2020).

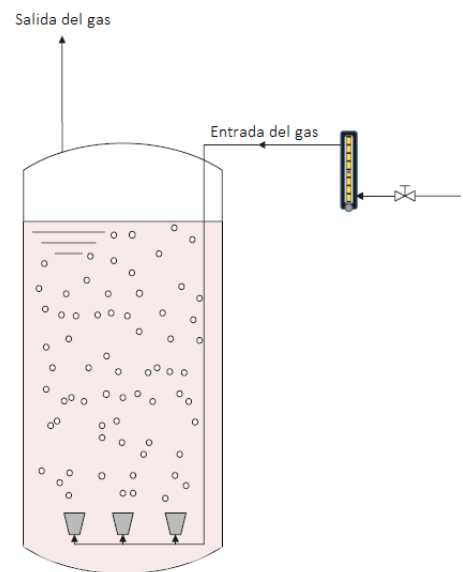


Figura 16. Esquema de una BCB (López y otros., 2019)

Con el fin de aumentar la transferencia de materia en este tipo de sistemas sin encarecer el coste del proceso, la implementación de una recirculación interna de gas o la adición de una segunda fase no acuosa con afinidad por el CH_4 y O_2 se presentan como dos alternativas prometedoras (López y otros, 2019). Recircular parte de la corriente gaseosa de salida es un método poco estudiado pero donde se ha demostrado que mejora la eficacia de eliminación del sistema, reportándose un aumento del $38 \pm 4\%$ al $79 \pm 1\%$ para un ratio de recirculación de 15 (García-Pérez y otros, 2018).

1.4.2. Otras configuraciones

Con el fin de incrementar la transferencia de materia gas-líquido, es fundamental estudiar nuevas configuraciones de biorreactores que presenten mejores prestaciones que los convencionales. La reducción de las necesidades energéticas que se consigue con los reactores airlift y la mejora de la transferencia de materia en los reactores de flujo de Taylor hace que se presenten como dos alternativas prometedoras para llevar a cabo la biodegradación del metano y que también facilitan la recuperación de la biomasa.

- **Reactor Airlift**

Esta configuración es muy similar a la de la columna de burbujeo, careciendo también de agitación mecánica (Figura 17). En este caso, la turbulencia se consigue al presentar un tubo concéntrico en el interior del biorreactor con el que se consigue generar un gradiente de densidad, favoreciendo la transferencia de materia entre la fase gaseosa y líquida (López y otros, 2019).

En los últimos años su diseño se ha visto modificado con el fin de aumentar las prestaciones de este biorreactor, generalmente implementando recirculaciones internas y externas. Estas novedosas configuraciones, denominada *forced circulation loop biorreactor* (FCLB), se caracterizan por presentar dos zonas distintas. En una de ellas, ambas fases se ponen en contacto para después separar las corrientes líquidas y gaseosas (López y otros, 2019).

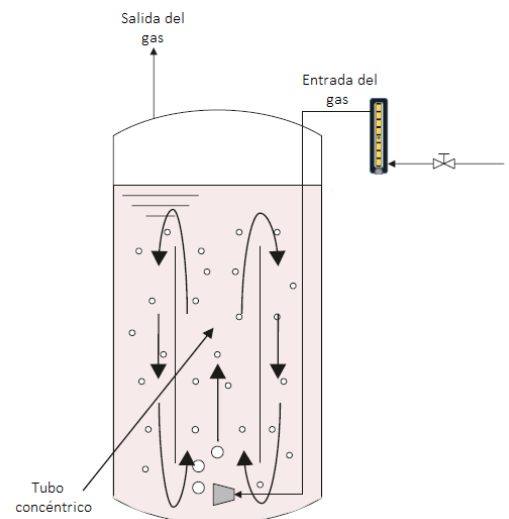


Figura 17. Esquema de un reactor Airlift (López y otros, 2019)

- **Reactor de flujo de Taylor**

Esta configuración es la que más difiere del resto y pertenece al grupo de reactores monolíticos, donde se consigue incrementar la transferencia de materia empleando una estructura formada por varios canales, unidos o separados, con bajas pérdidas de carga y generando flujos de baja dispersión axial (J. Rocha-Rios y otros, 2013). En este tipo de reactores se compone de varios tubos capilares de entre 1-5 mm dispuestos entre sí de forma paralela, dentro de los cuales se pueden generar diversos patrones de flujo entre los que destaca el conocido como flujo de Taylor por presentar una mejor transferencia de la fase gaseosa a la fase líquida. Este patrón se consigue al generar un tren de burbujas cuando se pone en contacto la fase gaseosa con el líquido recirculante en co-corriente (Figura 18), reportándose coeficientes de transferencia de masa similares a los obtenidos en los STRs pero con menores requerimientos energéticos (J. Rocha-Rios y otros, 2013).

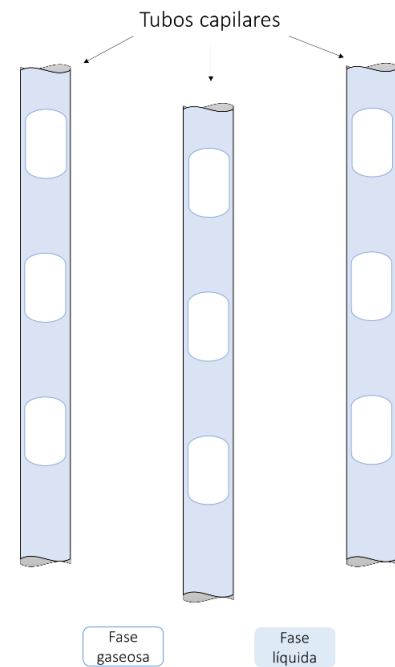


Figura 18. Esquema de patrón de flujo de Taylor en el interior de tubos capilares

Pruebas llevadas a cabo a escala laboratorio demuestran que las eficacias de eliminación para compuestos de baja solubilidad, como el CH_4 o el O_2 , se ven incrementadas hasta en un 40% con un patrón de flujo de Taylor con respecto a una misma configuración que no presenta este patrón (J. Rocha-Rios y otros, 2013). El principal problema que presentan este tipo de sistemas es la acumulación de biomasa por el interior de los canales, pudiendo provocar su obstrucción (Ebrahimi y otros, 2005).

1.5. Estrategias de operación para la producción de PHB

Junto con la selección de la fuente de carbono y el inconveniente supone la baja solubilidad del CH_4 en agua, otro de los aspectos fundamentales que determina la productividad del proceso es la estrategia de operación empleada. Puesto que los metanótrofos tipo II se caracterizan por acumular PHAs en condiciones limitantes de

nitrógeno, es necesario establecer un equilibrio entre los periodos de suministro de nutrientes y de inanición para conseguir maximizar tanto la productividad de biomasa como del PHB, siendo posible trabajar tanto en una como en dos etapas.

1.5.1. Operación en una etapa

Los sistemas en una única etapa pueden ser operados en batch, fed-batch y en continuo. La operación en batch, donde los nutrientes son introducidos al inicio del proceso sin ser posteriormente renovados, es la opción menos empleada ya que la densidad celular y la producción de PHB se encuentran limitadas por la concentración de sustrato inicial empleada (Blunt y otros, 2018). Para maximizar ambos valores, trabajar en fed-batch se presenta como la opción más prometedora, siendo posible alcanzar altas densidades de cultivo sin que exista limitación de nutrientes; es la estrategia que reporta las mayores productividades volumétricas de producción de scl y mcl-PHAs (Blunt y otros, 2018). En esta forma de operación, iniciada en batch, la introducción de medio mineral fresco se determina en función de los requerimientos del sistema. En el caso de trabajar con microorganismos donde la acumulación de PHAs no se encuentra asociada al crecimiento celular, que es el caso de los MOB II, debe elaborarse una estrategia de operación donde se combinen periodos de alimentación y hambruna, de forma que dentro del biorreactor se consiga la máxima acumulación de PHB sin comprometer el crecimiento de la biomasa.

Una estrategia similar a la operación en fed-batch es el trabajo con ciclos, donde se consigue aumentar la productividad del proceso al reducirse las paradas asociadas a los procesos en discontinuo (Blunt y otros, 2018). Esta forma de operación se caracteriza por reemplazar parte del caldo de cultivo por medio fresco, manteniéndose así un volumen de trabajo constante, de forma que puede ser considerada una operación en semicontinuo donde los periodos de inanición vienen marcados por la ausencia de entradas y salidas en el biorreactor. Rodríguez y otros (2021) reportó diferentes estrategias para llevar a cabo esta forma de operación en un STR, trabajando con *M. parvus* como cepa acumuladora de PHB en ciclos de 24h, 24:24h y 24:48h (Tabla 8) iniciados con una etapa en batch de 72h para partir con

una cierta acumulación de PHB y concentración de biomasa en el sistema. Los ciclos de 24:24h son los que reportaron una mayor producción de PHB sin comprometer la estabilidad del sistema, aunque las capacidades de eliminación (EC) obtenidas ($\sim 25 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) fueron inferiores a los trabajos previos realizados en condiciones similares (Muñoz y otros, 2018). Una EC similar se obtuvo en las primeras tres etapas de los ciclos de 24h, pero los valores de PHB acumulado reportados fueron inferiores ($< 7,5\%$); además, las condiciones de limitación de nitrógeno de las últimas dos etapas (6h:18h y 4h:20h) supusieron el deterioro del caldo de cultivo. Por otro lado, trabajar con ciclos de 24:48h reporta los máximos valores de acumulación respecto a las otras dos estrategias, pero la baja capacidad de eliminación alcanzada por el sistema hace que no se presente como una estrategia viable por la baja utilización del sustrato.

Tabla 8. Estrategias de operación en ciclos reportadas por Rodríguez y otros (2021)

| | Periodos de alimentación : inanición (h:h) | Duración (d) | Carga de nitrógeno diaria (mg d ⁻¹) | EC promedio (g CH ₄ m ⁻³ h ⁻¹) | Máxima acumulación de PHB (%w/w peso seco) |
|---------------|--|--------------|---|--|--|
| Ciclos 24h | 11:13 | 7 | 75 | 25,2±0,6 | 0,4±0,0 |
| | 8:16 | 7 | 84 | 25,5±1,6 | 7,5±0,7 |
| | 6:18 | 7 | 41 | 25,3±2,1 | 8,0±1,0 |
| | 4:20 | 7 | 27 | 8,8±1,4 | <4,5 |
| Ciclos 24:24h | 24:24 | 24 | 68 | 24,9±1,5 | 21,6±2,8 |
| Ciclos 24:48h | 24:48 | 20 | 68 | 7,7±1,2 | 35,5±1 |

La operación en continuo surge como la opción más adecuada al reportar valores de productividad teóricos mayores a los procesos discontinuos. Esta forma de operar se caracteriza por presentar un aporte continuo de medio mineral fresco, extrayéndose caldo de cultivo en igual proporción del interior del reactor, alcanzándose unas condiciones estacionarias de concentración de sustrato, biomasa y productos que facilita elaborar una estrategia de control y estudiar la fisiología del proceso (Blunt y otros, 2018). Un parámetro de gran importancia a la hora de operar es la velocidad de dilución (D), que viene dada por el cociente entre el volumen útil del sistema y el caudal de trabajo y cuyo valor deberá ser inferior a la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa para evitar el lavado del reactor.

Al trabajar con microorganismos donde la producción de PHB no se encuentra asociada al crecimiento celular, es imprescindible trabajar con concentraciones de nitrógeno inferiores a las demandadas por el sistema para que se den condiciones limitantes dentro del reactor y pueda llevarse a cabo la síntesis de PHB por parte de los microorganismos. En un trabajo previo en el que se operó un STR de forma continua con *M. parvus*, se obtuvieron acumulaciones de PHB promedio de $2,2 \pm 2,2\%$, $1,8 \pm 1,3\%$ y $2,2 \pm 1,0\%$ para un aporte de nitrógeno respecto del valor estequiométrico del 80%, 60% y 40%, respectivamente, correspondiéndose al aporte de nitrógeno diario empleado en las tres últimas etapas de los ciclos de 24h previamente presentados, con una EC promedio de $26,4 \pm 0,5 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (Rodríguez y otros, 2021). La comparación de estas dos estrategias muestra que la operación en ciclos permite obtener una mayor acumulación de PHB en el sistema, alcanzándose capacidades de eliminación similares.

Otra estrategia de operación en continuo es la reportada por Rodríguez y otros, 2020 en la que se operó una columna de burbujeo con recirculación interna de gas internac con *M. hirsuta*. En ésta, 500 ml de caldo de cultivo eran reemplazados por medio fresco, operando así con una velocidad de dilución de $0,2 \text{ d}^{-1}$. En este caso se alcanzaron capacidades de eliminación mayores, con un valor promedio de $40,5 \pm 1,4 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, y se reportaron valores de acumulación de PHB del $14,5 \pm 2,9\%$ del peso seco, inferior a los reportados en los ciclos de 24:24h anteriormente nombrados.

1.5.2. Operación en dos etapas

Supone un reto llevar a cabo la producción de PHAs al operar en una sola etapa al trabajar con MOB II, puesto que no puede llevarse a cabo la optimización simultánea del crecimiento de la biomasa y la producción de PHB en un único reactor. El crecimiento requiere del aporte de nitrógeno, mientras que la síntesis de PHB se inicia con su limitación, lo que hace necesario establecer un compromiso entre la productividad de la biomasa y del PHB para que el sistema pueda operar correctamente en estas condiciones (Koller y otros, 2015). Por ello, la alternativa más atractiva para conseguir maximizar ambos parámetros es trabajar en dos etapas, separando el crecimiento de la biomasa de la síntesis y acumulación del PHB,

solucionándose así el principal problema que presenta el operar en una sola etapa, donde tanto la concentración de biomasa como de PHB acumulado es inferior a los valores óptimos que podrían llegar a alcanzarse (Koller y otros, 2015).

Esta estrategia de operación implica la separación física de las dos fases del proceso, de forma que un primer biorreactor es destinado a alcanzar altas concentraciones de biomasa para que en el segundo se lleve a cabo la síntesis del PHB, siendo posible así operar con diferentes condiciones en cada uno de los reactores (Kaur y otros, 2015).

La operación en continuo en dos etapas se presenta como una estrategia prometedora por las altas productividades que pueden llegar a alcanzarse trabajando con altas velocidades de dilución, sin comprometer la síntesis de PHB en el sistema (Koller y otros, 2015). El trabajo reportado por Du y otros (2001) presenta esta estrategia operando con *Ralstonia eutropha* en dos STRs operando en distintas condiciones. En el primer reactor, destinado a alcanzar altas densidades de cultivo, se suministró medio con limitación de glucosa y exceso de nitrógeno (F1) para favorecer el crecimiento de la biomasa, mientras que al segundo reactor se le suministra el caldo de cultivo procedente del anterior biorreactor, además de presentar una segunda alimentación (F2) de medio fresco con condiciones limitantes de nitrógeno (Figura 19). Esta forma de operar reportó una productividad máxima de $1,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, correspondiéndose a una acumulación del 47,6% del peso seco de la biomasa (Du y otros, 2001).

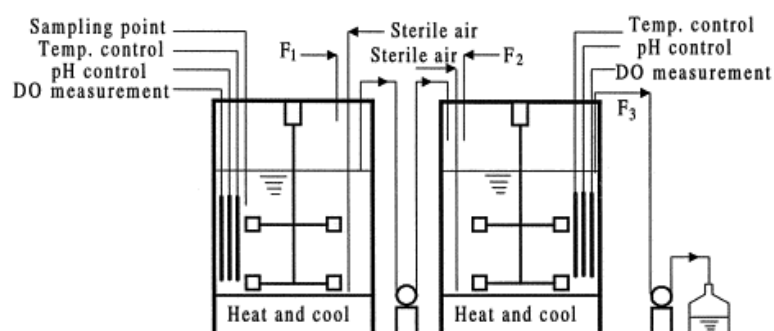


Figura 19. Esquema experimental de producción de PHB en dos etapas (Du y otros, 2001)

1.6. Justificación del trabajo fin de grado

El biogás se caracteriza por ser una mezcla gaseosa formada principalmente por CH_4 , obtenida en la degradación de materia orgánica por diferentes tipos de microorganismos bajo condiciones anaerobias (Scarlat y otros., 2018). Este proceso es llevado a cabo en el interior de digestores anaerobios empleando como sustrato la fracción orgánica presente en residuos urbanos, agroindustriales, aguas residuales, etc. En la actualidad, la aplicación más extendida y desarrollada es la producción de energía, destacando la generación de calor y electricidad tanto de forma individual o mediante sistemas de cogeneración, al igual que llevar a cabo su purificación para la obtención de biometano y ser empleado de forma similar al gas natural (Cuesta Santianes y otros, 2017).

Gracias a las políticas actuales en materia de energía la producción de biogás se ha visto incrementada en los últimos años, reportándose en 2019 un total de 18 943 plantas en operación y una capacidad eléctrica instalada de 11,1 GW (EBA, 2020). A pesar de esta tendencia creciente, los últimos años se observa un estancamiento del sector, lo que supone un punto de inflexión acerca de si los usos actuales a los que se destina el biogás han llegado a sus máximas prestaciones. Esta ralentización de la demanda del biogás, causada principalmente por la falta de incentivos económicos (Rodríguez y otros, 2020), ha hecho necesaria la búsqueda de nuevas formas de uso y aprovechamiento del biogás más rentables. El concepto de la biorrefinería, donde se busca producir de forma sostenible aquellos productos asociados a la refinería convencional basada en el petróleo, supone un incentivo para emplear el biogás en la obtención de productos de alto valor añadido.

Para ello, el uso de bacterias metanotróficas, capaces de degradar el CH_4 presente en el biogás y producir una gran variedad de compuestos de alto valor añadido, ha suscitado un gran interés en los últimos años (Cantera y otros, 2018). Dentro de estos productos asociados a la degradación del metano se encuentran los PHAs, biopolímeros biodegradables que se espera que sean los sustitutos de los plásticos convencionales y que presentan aplicaciones en diversos campos, como son la medicina, la cosmética, la agricultura, etc. El principal problema que presenta su producción es el alto coste asociado a las fuentes de carbono empleadas, que suponen un 50% del coste total (Raza y otros, 2018). Es por ello por lo que es fundamental encontrar nuevas fuentes de carbono que consigan abaratar el

proceso, como puede ser emplear las altas cantidades de metano presentes en el biogás.

La degradación del metano por parte de los metanótrofos se produce gracias a que son capaces de emplear este compuesto como fuente de carbono y energía (Strong y otros, 2015). De los diferentes tipos de bacterias degradadoras de metano, los metanótrofos tipo II llevan a cabo este proceso a través de la ruta de la serina y son los únicos capaces de sintetizar PHB en condiciones limitantes de nitrógeno empleando el CH_4 como fuente de carbono, reportándose acumulaciones de hasta el 50% (Kalyuzhnaya y otros, 2015).

La selección de la fuente de nitrógeno juega un papel fundamental dentro del desarrollo de la biomasa. A pesar de que el NH_4^+ es el compuesto que reporta mayores tasas de crecimiento, el efecto negativo que tiene sobre la actividad de la enzima MMO (Tays y otros, 2018) hace necesario buscar alternativas, como es el empleo del NO_3^- . En este caso, es importante considerar que altas concentraciones de este compuesto en el medio de cultivo pueden llevar a que la cepa desnitrifique parcialmente, generando NO_2^- cuya acumulación provoca la inhibición del sistema (Rodríguez, y otros, 2020).

Puesto que el crecimiento de la biomasa y la acumulación de PHB se encuentra asociada a diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno en el caldo de cultivo, trabajar con un solo reactor dificulta operar bajo las condiciones de operación óptimas que favorezcan ambos procesos (Koller y otros, 2015). Es por ello que el empleo de sistemas en dos etapas, donde se lleva a cabo la separación física de las fases de crecimiento y acumulación, surge como una gran alternativa que permite maximizar tanto la concentración de biomasa como la cantidad de PHB acumulado (Kaur y otros, 2015). Además, su combinación con la operación en continuo, donde se opera bajo condiciones estacionarias de concentración de sustrato, biomasa y productos y se reportan habitualmente los mayores valores de productividad teóricos (Blunt y otros, 2018), hace que esta estrategia de operación sea muy prometedora.



2. OBJETIVOS

En el presente trabajo fin de grado se plantea la producción de PHB empleando la cepa *Methylocystis hirsuta* en un innovador sistema de dos etapas, empleando biogás como fuente de carbono y nitrato como fuente de nitrógeno. Para ello, se ha operado con un reactor de tanque agitado, destinado a la generación y crecimiento de la biomasa, y una columna de burbujeo con recirculación interna donde se operó bajo condiciones limitantes de nitrógeno para favorecer la acumulación del biopolímero.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron:

- Evaluar el efecto de la concentración de NO_3^- sobre la acumulación de PHB y la estabilidad del proceso de biodegradación de CH_4 en continuo en metanótrofos tipo II
- Determinar las condiciones óptimas de operación en continuo que permitan tanto el crecimiento de la biomasa como la síntesis de PHB en cada reactor.
- Evaluar la influencia de la velocidad de dilución sobre la concentración de la biomasa y producción de PHB en el sistema.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Para llevar a cabo los diferentes ensayos se empleó la cepa *Methylocystis hirsuta* CSC1 (DSM 18500) adquirida de la colección de cultivo Leibniz-Institut DSMZ (Alemania). En el medio mineral empleado (NMS) para su cultivo se empleó nitrato (NO_3^-) como fuente de nitrógeno. La composición de las diferentes soluciones y los volúmenes empleados para la preparación del medio NMS se detallan en la Tabla 9. Composición del medio mineral NMS y la solución buffer. El pH del medio se ajustó a 6.8 mediante la adición de una solución de buffer fosfato tras ser autoclavado a 121°C durante 21 min.

Tabla 9. Composición del medio mineral NMS y la solución buffer

Solución I (Macronutrientes 10 \times) \rightarrow 100 mL L $^{-1}$

| | |
|---|-------------------|
| KNO_3 | 10,0* g L $^{-1}$ |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10,8 g L $^{-1}$ |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,0 g L $^{-1}$ |

Solución II \rightarrow 0,1 mL L $^{-1}$

| | |
|---------|-----------------|
| Fe-EDTA | 3,8 g L $^{-1}$ |
|---------|-----------------|

Solución III \rightarrow 0,5 mL L $^{-1}$

| | |
|---|-----------------|
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g L $^{-1}$ |
|---|-----------------|

Solución IV (Elementos traza) \rightarrow 1 mL L $^{-1}$

| | |
|--|-------------------|
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,3 g L $^{-1}$ |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1,0 g L $^{-1}$ |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,5 g L $^{-1}$ |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,4 g L $^{-1}$ |
| H_3BO_3 | 0,015 g L $^{-1}$ |
| CoCl_2 | 0,03 g L $^{-1}$ |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,02 g L $^{-1}$ |
| $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 g L $^{-1}$ |

Solución V (Buffer)** \rightarrow 10 mL L $^{-1}$

| | |
|--|------------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 82,8 g L $^{-1}$ |
| KH_2PO_4 | 26 g L $^{-1}$ |

*Mientras no se especifique lo contrario

**Adicionada tras la esterilización del medio una vez alcanzada temperatura ambiente

Para la elaboración de patrones y análisis del PHB se utilizaron el copolímero PHB-PHV (88%PHB-12%PHV) (Sigma-Aldrich, EEUU), 1-propanol (C_3H_8O , 99,7%), ácido clorhídrico (HCl, 37% w/v), ácido benzoico ($C_7H_6O_2$, $\geq 99,5\%$) y cloroformo ($CHCl_3$, $\geq 99\%$). Todas las sales empleadas en la elaboración del medio mineral fueron adquiridas en PanReac AppliChem (Barcelona) exceptuando el KNO_3 , procedente de Cofarcas S.A. (Burgos). Por otro lado, los gases empleados fueron CH_4 ($\geq 99,995\%$), O_2 ($\geq 99,5\%$) y biogás sintético (70/30% v/v $CH_4:CO_2$), todos ellos suministrados por Abelló Linde S.A. (Barcelona).

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimiento experimental

- Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo crecido de *M. hirsuta* (Figura 20) almacenado a 4°C. Se tomaron 5 mL de dicho cultivo para inocular las botellas serológicas de 125 mL que contenían 45 mL de NMS bajo condiciones estériles, mientras que el espacio de cabezas (75 mL) estaba formado por una mezcla de $O_2:CH_4$ en una proporción de 2:1. Este cultivo fue incubado aproximadamente durante ~10 días con una agitación de 250 rpm a 30°C (Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) reemplazando cada dos días el espacio de cabezas una vez se consumió todo el metano. Para ello, se pasó oxígeno puro durante 5 min para después intercambiar 25 mL de este gas por CH_4 puro, filtrando ambos gases con filtros de 0,22 μm .



Figura 20. Inóculo de *Methylocystis hirsuta*

- **Sistema experimental**

El montaje empleado para llevar a cabo la operación en dos etapas consistió en un quimiostato y una columna de burbujeo (BCB) conectados en serie en este mismo orden, destinándose el primero de ellos al crecimiento de la biomasa y el segundo a la acumulación de PHB (Figura 21).

El quimiostato empleado fue el biorreactor Biostat® A (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Alemania), formado por un vaso de vidrio de borosilicato con un volumen útil de 2,5 L y una torre de control con tres bombas peristálticas y diversos sensores que permitían el control continuo de pH, nivel y temperatura. El quimiostato, equipado con un impulsor de flujo radial (turbina de disco Rusthon), fue operado a 600 rpm para asegurar una mezcla completa y la ruptura de las burbujas de gas para favorecer el transporte gas-líquido. Además, dispone de una camisa térmica para mantener la temperatura a 30°C. Por otro lado, la parte superior del reactor estaba equipada con cuatro conexiones a tuberías, destinadas a la entrada de medio fresco y de NaOH 4N para control de pH, a la toma de muestra y a la salida del efluente del reactor, junto con las conexiones de entrada y salida del gas, el sensor digital de pH y la sonda de nivel. La mezcla gaseosa, con una concentración de O₂:CH₄ del ~18%:9% v/v, se elaboró mediante la unión en una cámara de mezcla de las corrientes de aire comprimido y de biogás sintético suministrado mediante un controlador de flujo másico (GFC17, Aalborg™, EE. UU.). A la salida de la cámara de mezcla, la corriente gaseosa fue dividida en dos y regulada mediante dos rotámetros para suministrar en ambas etapas un caudal de 42 mL min⁻¹, correspondiente a un tiempo de residencia (EBRT) de 60 min. La mezcla gaseosa, filtrada previamente con un filtro de 0,22 μm, se burbujeó de forma continua en el sistema a través de un difusor de acero inoxidable con un tamaño de poro de 2 μm (Supelco, EE. UU.) situado en el fondo del reactor. Respecto a la fase acuosa, este sistema se operó con medio NMS con un valor de pH de 7,07±0,12, variando la concentración de N en cada una de las estrategias llevada a cabo.

Por otro lado, la segunda etapa se llevó a cabo en una columna de burbujeo de PVC con un volumen de trabajo de 2,5L (Plasthermar, España). Esta presentaba cuatro conexiones en la tapa, destinadas a la entrada y salida de las corrientes líquidas y gaseosas, y otra en la parte inferior del reactor, empleada para la toma de muestra



del caldo de cultivo. Como se ha indicado previamente, el flujo de la mezcla de aire y biogás sintético procedente de la cámara de mezcla se reguló con un rotámetro y se mantuvo a 42 mL min^{-1} (EBRT = 60 min). Esta corriente se hizo pasar por un filtro de aire para garantizar las condiciones de esterilidad. La entrada al sistema de la mezcla gaseosa se realizó a través de un set de tres difusores con microporos de acero inoxidable, como el descrito en el anterior sistema, colocados en la parte inferior del reactor. Con el fin de maximizar el aprovechamiento de la fuente de carbono y aumentar la transferencia de materia entre las fases líquida y gaseosa, se implementó un sistema de recirculación interna. La corriente de recirculación se hacía pasar por un condensador encamisado con agua a 10°C para evitar problemas de condensación dentro de esta línea. Además, la agitación en el interior del reactor se complementó con un agitador magnético (Agimatic S, JP Selecta, España) a 500 rpm. Inicialmente, la columna de burbujeo se operó con medio sin nitrógeno (NFMS) para mantener las condiciones limitantes y favorecer así la acumulación de PHB. Una vez iniciada la operación, el efluente del Biostat fue introducido en este reactor empleando una de las bombas presentes en la torre de control anteriormente descrita, mientras que la corriente de salida fue regulada con una bomba Watson Marlon 120S (50 rpm), que se activaba durante 15 min cada hora del día empleando un temporizador. La temperatura de operación de la columna se mantuvo constante a 25°C en una sala climatizada y se trabajó con un pH de $7,12 \pm 0,07$ a lo largo de la experimentación.

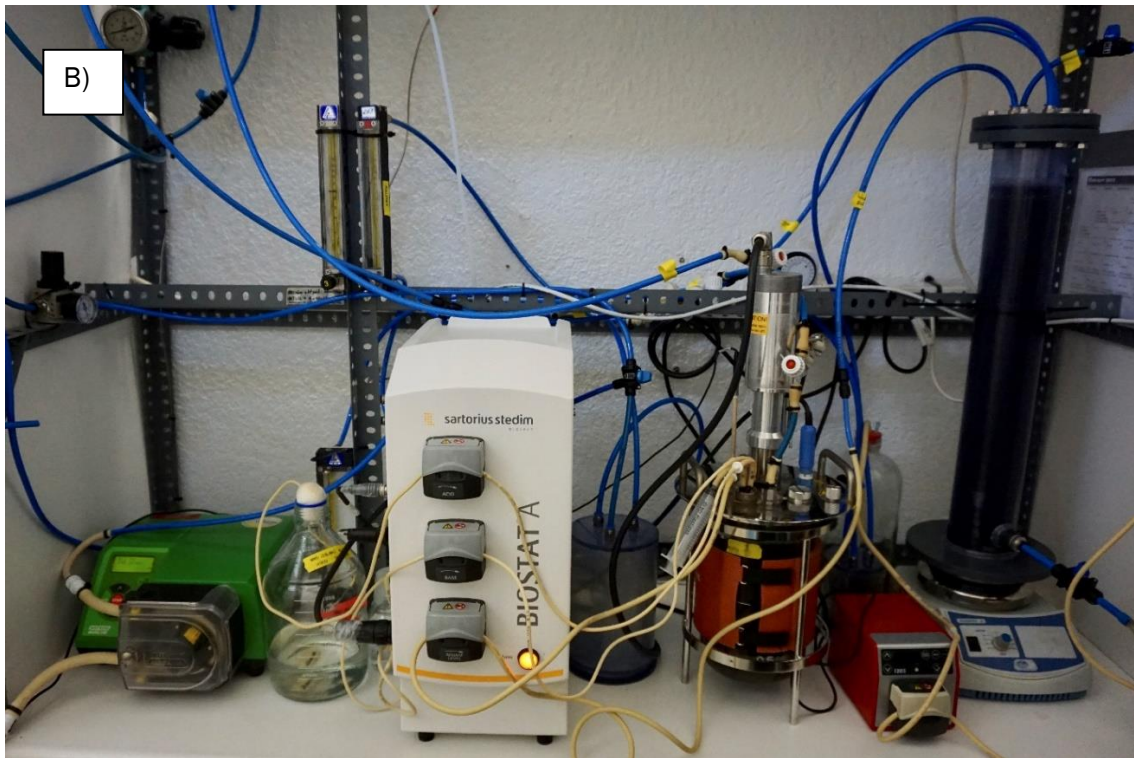
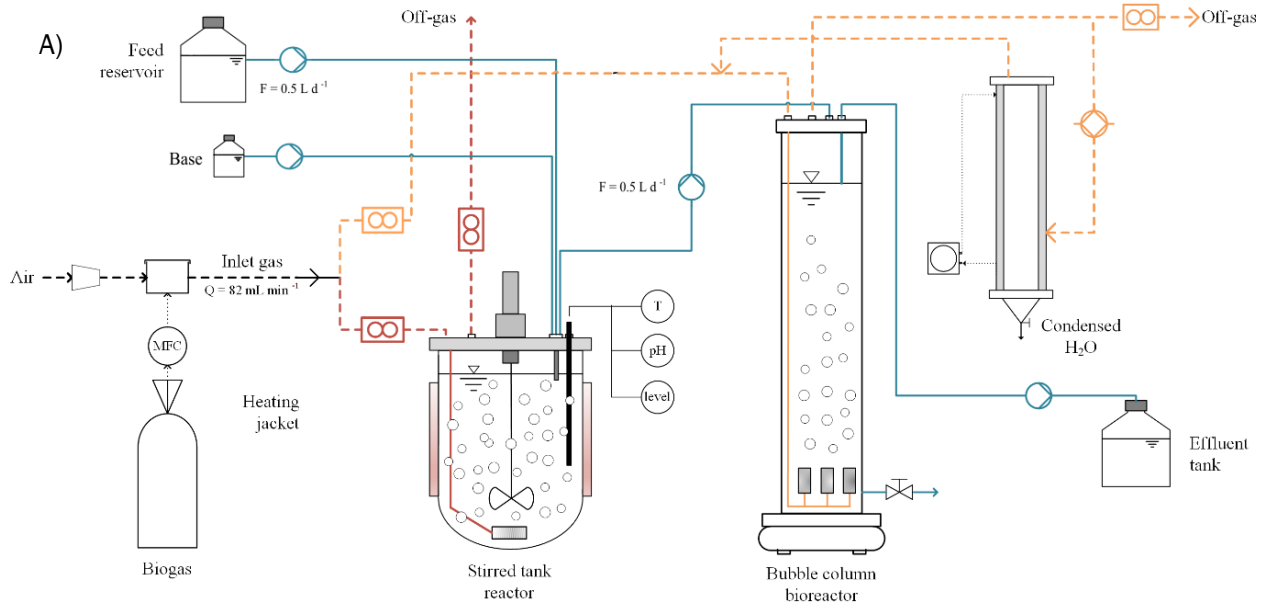


Figura 21. Esquema (A) e imagen (B) del sistema experimental

- **Estrategias de operación**

En la Tabla 10 se presenta un resumen con las principales características de los tres ensayos llevados a cabo en este trabajo fin de grado.

Test 1: Operación en continuo con alta carga de nitrógeno

Esta primera experiencia se inició con una etapa en batch en el Biostat previa a la operación en continuo. Para ello, el biorreactor fue inoculado al 2% v/v con 50 mL de *M. hirsuta* bajo condiciones estériles, en 2425 mL de NMS con una concentración de 2 g KNO₃ L⁻¹ y 25 mL de solución buffer fosfato, para obtener una concentración de biomasa inicial de 8 mg L⁻¹. Consumido todo el nitrógeno (N-NO₃⁻) presente en el sistema, tras 9 días de operación, se llevó a cabo el acople de la columna con un volumen inicial 2 L de NFMS. Una vez alcanzados los 2,5L que se mantendrían a lo largo de la experimentación gracias a la entrada de caldo de cultivo procedente del quimiostato, se operó con un caudal de 0,5 L d⁻¹ en ambos reactores, resultando en una velocidad de dilución (D) de 0,008 h⁻¹. De esta forma, 500 mL de caldo de cultivo del Biostat fueron reemplazados diariamente por medio mineral fresco con una concentración de 2 g KNO₃ L⁻¹, al igual que 500 mL de la BCB fueron reemplazados por el caldo de cultivo procedente del Biostat. Así, el único aporte de N-NO₃⁻ que recibía la columna era el presente en el caldo de cultivo del quimiostato.

Test 2: Operación en continuo con baja carga de nitrógeno

La estrategia de operación empleada fue análoga a la presentada en el Test 1. El Biostat fue inoculado al 2% v/v con *M. hirsuta* (concentración inicial de 11 mg L⁻¹) en 2425 mL de medio NMS esta vez con una concentración de 1,35 g KNO₃ L⁻¹, bajo condiciones estériles. Tras una primera etapa en batch de 6 días de duración, donde se consumió prácticamente todo el N-NO₃⁻ presente en el sistema, se llevó a cabo el acople de la columna de burbujeo con 2L de medio NFMS, comenzando así la operación en continuo con un caudal de 0,5L d⁻¹ y alcanzándose un volumen de trabajo de 2,5L en ambos sistemas. A diferencia del caso anterior, donde la concentración de KNO₃ del NMS fue la misma tanto en el batch como en la operación

en continuo, el medio fresco con el que se renovaba el caldo de cultivo del Biostat presentaba una concentración de $1,045 \text{ g KNO}_3 \text{ L}^{-1}$. Tras 14 días de operación en continuo con una D de $0,008 \text{ h}^{-1}$, se aumentó la velocidad de dilución de ambos sistemas a $0,011 \text{ h}^{-1}$, correspondiente a un caudal de $0,65 \text{ L d}^{-1}$, aumentando así el aporte diario de N-NO_3^- al quimiostato. Esta segunda etapa de operación se mantuvo durante 7 días.

Test 3: Operación en continuo con media carga de nitrógeno

Para este último ensayo se optó por reducir el tiempo de operación en batch con el fin de evitar alcanzar condiciones limitantes de nitrógeno en el quimiostato y con ello inducir la acumulación de PHB en esta etapa. El Biostat fue inoculado bajo condiciones estériles con 50 mL de *M. hirsuta* en 2425 mL de NMS, lo que representó una concentración inicial de biomasa de 22 mg L^{-1} . Para evitar la aparición de nitrito (NO_2^-) posiblemente asociada al exceso de N-NO_3^- en el sistema, la concentración de nitrato en esta primera etapa fue de $0,62 \text{ g KNO}_3 \text{ L}^{-1}$. Esta etapa tuvo una duración de 3 días, lo que permitió alcanzar la fase de crecimiento exponencial de la biomasa e iniciarse el aporte externo de N-NO_3^- en el sistema mediante adición de medio mineral. Tras este periodo de tiempo, la columna de burbujeo se acopló al Biostat, inicialmente con 2 L de NFMS, alcanzando los 2,5L de volumen de trabajo al comenzar la operación en continuo con un caudal de $0,5 \text{ L d}^{-1}$. El medio NMS fresco introducido en el Biostat en esta etapa en continuo presentaba una concentración de $1,56 \text{ g KNO}_3 \text{ L}^{-1}$. El aporte de medio mineral se mantuvo en $0,5 \text{ L d}^{-1}$ hasta el día 14 de operación, donde se incrementó el caudal de operación a $0,75 \text{ L d}^{-1}$ ($D=0,013 \text{ h}^{-1}$) y se pasó a operar con una concentración de KNO_3 en NMS de 1 g L^{-1} para mantener el mismo flujo másico de nitrógeno diario que en la etapa anterior. Esta segunda etapa de operación se mantuvo durante 10 días.

Tabla 10. Resumen de las tres estrategias de operación empleadas

| | Duración etapa en batch (d) | NMS batch (g KNO ₃ L ⁻¹) | NMS continuo (g KNO ₃ L ⁻¹) | | Aporte N diario etapa en continuo (g N d ⁻¹) | |
|--------|-----------------------------|---|--|---------|--|---------|
| | | | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 1 | Etapa 2 |
| Test 1 | 9 | 2,00 | 2,00 | | 0,14 | |
| Test 2 | 6 | 1,35 | 1,045 | | 0,07 | 0,09 |
| Test 3 | 3 | 0,62 | 1,56 | 1,00 | 0,11 | |

- **Muestreo y monitorización diaria**

Se llevó a cabo un seguimiento diario tanto de la fase gas como de la fase líquida en ambos sistemas. Respecto a la fase gas, se determinaron las concentraciones de CH₄, CO₂ y O₂ tanto en la entrada como en la salida de ambos reactores, así como el caudal de salida y la caída de presión en cada uno de ellos. Por otro lado, ~30 mL de caldo de cultivo se extrajeron del interior de cada sistema para llevar a cabo la monitorización diaria del pH, densidad óptica a 600 nm (1,5 mL), análisis de PHAs (triplicados de 1,5 mL) y sólidos suspendidos totales (en duplicado, 5-10 mL), junto con el análisis de la concentración de carbono orgánico total y nitrógeno total disuelto (TOC/TN, 15 mL) y de aniones (1,0 mL, Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻ y SO₄²⁻).

3.2.2. Métodos analíticos

El análisis de las muestras gaseosas se realizó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Bruker 430 GC-TCD (Bruker Corporation, Palo Alto, EE. UU.) con un detector de conductividad térmica (TCD). Este se encontraba equipado con las columnas CP-PoraBOND Q (25m x 0,53 mm x 10 μm) y CP-Molsieve 5Å (15m x 0,53 mm x 15 μm), ambas adquiridas en Agilent (Santa Clara, EE. UU). Las temperaturas empleadas en el inyector, horno y detector fueron de 150°C, 45°C y 200°C, respectivamente, empleando helio (He) como gas portador a una velocidad de 13,7

mL min⁻¹. La inyección de las muestras gaseosas se llevó a cabo con una jeringa de gases de 100 μ L (Hamilton Company, NV, EE. UU.) y la medida se realizó por duplicado, despresurizando previamente las muestras de la entrada, con un tiempo de análisis de 5 min por muestra. Por otro lado, la medida de caudal se llevó a cabo por desplazamiento de volumen de líquido, empleando una probeta de 250 mL cronometrando durante dos minutos el caudal de salida, mientras que la caída de presión a la entrada de ambos sistemas fue monitoreada mediante un sensor de presión digital (PN7097, Ifm Electronic, Alemania).

Respecto al análisis del caldo de cultivo, la medida de pH se realizó empleando el pH-metro Basic 20 pH (Crison, España). La evolución del crecimiento de la biomasa se llevó a cabo tanto por medición de la densidad óptica como por la medida de sólidos suspendidos totales (TSS) del caldo de cultivo. Para la primera de ellas se empleó el espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Alemania), midiendo a 600 nm y empleando como blanco el medio NMS con la concentración correspondiente a cada una de las experiencias llevadas a cabo. Por otro lado, para el análisis de TSS se siguió el método estándar (APHA, 2018) donde las muestras eran filtradas a vacío, secándose el filtro en una estufa a 105°C durante aproximadamente 24h; tras enfriarse a temperatura ambiente en un desecador durante 15 min, eran pesadas para determinar la cantidad de sólidos suspendidos por la diferencia de la masa del filtro antes y después de este proceso. La medida de aniones de interés, como el NO₃⁻ y NO₂⁻, fue llevada a cabo por cromatografía líquida de intercambio iónico (HPLC-IC) con un detector de conductividad (Waters 432, Waters Corporation, EE. UU.), siendo las muestras previamente filtradas con filtros de nylon de 0,22 μ m. Este equipo llevaba incorporado la columna IC-PAK Anion HC (4,6 mm x 150 mm) y una pre-columna IC-PAK (Waters, EE. UU.). Por otro lado, el carbono orgánico total (TOC) y nitrógeno total (TN) disueltos en el caldo de cultivo fueron monitoreados diariamente filtrando las muestras con filtros de 0,47 μ m y siendo posteriormente medidas con el equipo TOC-L_{CSH/CSN} acoplado a la unidad TNM-1 (Shimadzu, Japón).

Para realizar la extracción y análisis de PHB se siguió el protocolo descrito por Chen y otros, 2020, que consistió en una propanólisis ácida con HCl para después medir las muestras en un cromatógrafo de gases Agilent 7820A (GC) acoplado a un

espectrómetro de masas 5977E (MS) y equipado con la columna DB-WAX (Agilent Technologies, EE. UU.). En tubos Eppendorfs de 1,5 mL se centrifugaron por triplicado las muestras de cada sistema durante 10 min a 10 000 rpm. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se prepararon para la digestión con dos disoluciones, una de 1-propanol y HCl en proporción 80:20 %v/v y otra de ácido benzoico en 1-propanol, que se emplearía como patrón interno. Para ello, se adicionó 1 mL de la primera disolución en cada tubo Eppendorf y, tras pipetear la suspensión resultante en tubos HATCH, se añadieron 10 µl de patrón interno y 2 mL de CH₃Cl en cada tubo. Con estas muestras se pasó a la etapa de digestión, donde permanecieron dentro de un termo-reactor durante 4 horas a 100°C. Trascurrido este tiempo y tras enfriarse las muestras a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de agua MiliQ en cada tubo y se agitaron. Pasados unos 5-10 min en reposo, se extrajo la fase orgánica, siendo filtrada con filtros de 0,22 µm antes de ser introducida en los viales del GC-MS. La cuantificación en el GC-MS se realizó inyectando 1 µm de muestra en el equipo, encontrándose el inyector a 250°C y siendo el tiempo de análisis por muestra de 31 min. La temperatura inicial del horno era de 40°C, que se mantenía durante cinco minutos para después iniciarse la rampa de temperatura a una velocidad de 10 °C min⁻¹ hasta alcanzar los 200°C. Esta temperatura se mantuvo durante 2 min para después llevar a cabo un último incremento de temperatura hasta los 240°C a una velocidad de 5°C min⁻¹.

3.2.3. Cálculos

Para determinar la cantidad de N-NO₃⁻ a aportar con el medio mineral, se calculó la demanda de nitrógeno teórica por parte del sistema. Para ello, se supuso un rendimiento de 0,45 g biomasa g⁻¹ CH₄ al trabajar con nitrato como fuente de N (Asenjo y otros, 1986) y un contenido teórico de nitrógeno en la biomasa de 0,09 g N g⁻¹ biomasa (previamente validado en el laboratorio donde se realizó este trabajo fin de grado), y el cálculo se realizó en función de la capacidad de eliminación alcanzada por el sistema (EC, g CH₄ m⁻³ h⁻¹).

$$Demanda N \left(\frac{g N}{m^3 \cdot h} \right) = EC \left(\frac{g CH_4}{m^3 \cdot h} \right) \cdot 0,45 \frac{g biomasa}{g CH_4} \cdot 0,09 \frac{g N}{g biomasa} \quad (Ec. 1)$$

A través del seguimiento de la evolución de la biomasa durante las etapas en batch se pudo conocer la tasa de crecimiento de la cepa.

$$\mu (t^{-1}) = \frac{1}{C} * \frac{dC}{dt} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde la derivada de concentración frente al tiempo hace referencia a la productividad volumétrica del sistema, que permite además conocer la velocidad másica de producción de biomasa.

$$\text{Velocidad producción biomasa} \left(\frac{g \text{ biomasa}}{d} \right) = V_{\text{reactor}} * \frac{dC}{dt} \quad (\text{Ec. 3})$$

Los indicadores que se emplearon para determinar el desempeño de los reactores fueron la capacidad de eliminación de CH₄ (EC), la eficacia de eliminación de CH₄ (RE) y la producción de CO₂ (PCO₂).

La EC se determinó a través del cociente de la diferencia de concentración de metano (g·m⁻³) a la entrada y a la salida del sistema entre el volumen del reactor (m³), multiplicado todo ello por el caudal de operación de gas (m³·h⁻¹).

$$EC \left(\frac{g \text{ CH}_4}{m^3 * h} \right) = \frac{[CH_4]_{in} - [CH_4]_{out}}{V_{\text{reactor}}} * Q_{\text{gas}} \quad [\text{Ec. 4}] \quad (\text{Ec. 4})$$

Estas mismas concentraciones permiten determinar también la eficacia de eliminación del sistema.

$$RE (\%) = \frac{[CH_4]_{in} - [CH_4]_{out}}{[CH_4]_{in}} * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

De forma análoga a la EC, empleando las concentraciones de CO₂ a la entrada y salida de cada sistema (g·m⁻³), puede conocerse la velocidad volumétrica de producción de dióxido de carbono (PCO₂) en el interior del reactor.

$$PCO_2 \left(\frac{g \text{ CO}_2}{m^3 * h} \right) = \frac{[CO_2]_{out} - [CO_2]_{in}}{V_{\text{reactor}}} * Q_{\text{gas}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Para conocer el porcentaje de PHB acumulado en función de la biomasa presente en el sistema, se realiza el cociente entre los gramos de PHB cuantificados en el GC-MS en la fase orgánica (2 mL) y los gramos de biomasa en la muestra, calculados con el producto del volumen (L) de muestra analizada (1,5 mL) por la concentración de biomasa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

$$PHB \text{ acumulado (\%)} = \frac{g \text{ PHB}}{V_{\text{muestra}} \cdot [\text{Biomasa}]} \cdot 100 = \frac{g \text{ PHB}}{1,5 \text{ mL} \cdot 1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{L}}\right) \cdot [\text{Biomasa}]} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Para conocer la productividad de PHB del sistema se calcula el producto de la concentración de PHB por el caudal de operación de la fase líquida, todo ello dividido entre el volumen útil del reactor.

$$Prod_{PHB} \left(\frac{g \text{ PHB}}{\text{m}^3 \cdot d}\right) = \frac{\frac{g \text{ PHB}}{V_{\text{muestra}}}}{V_{\text{reactor}}} \cdot Q_{\text{liq}} = \frac{\frac{g \text{ PHB}}{1,5 \text{ ml}} \cdot 1000 \left(\frac{\text{mL}}{\text{L}}\right)}{V_{\text{reactor}}} \cdot Q_{\text{liq}} \cdot 1000 \left(\frac{\text{L}}{\text{m}^3}\right) \quad (\text{Ec. 8})$$

4. RESULTADOS

4.1. Test 1: Operación en continuo con alta carga de nitrógeno

4.1.1. Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos

- Arranque STR (batch)

Una vez se inoculó el STR con la cepa *M. hirsuta* se llevó a cabo una primera etapa en batch de nueve días de duración con una concentración inicial de N-NO₃⁻ de 2 g L⁻¹. Tras dos días de fase de latencia donde apenas se observó aumento de la densidad celular del cultivo (Figura 22A), da comienzo la fase exponencial alcanzando una concentración final de 2,28 ± 0,00 g biomasa L⁻¹ en esta primera etapa. La mayor velocidad de crecimiento de biomasa, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de la misma, se observó entre los días 3 y 8 de operación, con una velocidad específica de crecimiento máxima (Ec. 2) de 0,87 d⁻¹ (R²=0,99), correspondiente a una productividad volumétrica de 0,32 g biomasa L⁻¹ d⁻¹ (R²=0,99). Al operarse con un volumen útil de 2,5L, la producción de biomasa (Ec. 3) en esta etapa fue de 0,80 g biomasa d⁻¹. Junto con el aumento de la concentración de biomasa en el caldo de cultivo del STR se inició tanto la eliminación de CH₄ como la producción de CO₂ (Figura 22 A). En los tres primeros días de operación ambos parámetros fueron incrementando su valor para después estabilizarse. Respecto a la capacidad de eliminación (Ec. 4), el sistema se mantuvo en un valor promedio de 29,65 ± 1,25 g CH₄ m⁻³ h⁻¹ a lo largo de la etapa en batch, llegándose a alcanzar una eficacia de eliminación (Ec. 5) del 59,4% en el día 8. Por el contrario, la producción de CO₂ (Ec. 6) fue más fluctuante, alcanzando un valor máximo de 68,12 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ en el séptimo día de operación. En el día 9, último de la etapa en batch, se observó una caída en ambos parámetros, reportándose un valor de EC y PCO₂ de 10,51 g CH₄ m⁻³ h⁻¹ y 28,10 g CO₂ m⁻³ h⁻¹, respectivamente (Figura 22 A). A pesar de ello, el ratio de mineralización del metano (PCO₂ EC⁻¹, g CO₂ g⁻¹ CH₄) se mantuvo constante a lo largo de esta etapa (2,00 ± 0,44).

- **Etapa I (continuo, $D = 0,008 \text{ h}^{-1}$)**

En el día 9 se comenzó a operar en continuo, observándose durante los seis primeros días una concentración de biomasa estable de $2,23 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ en el caldo de cultivo del STR (Figura 22 A). Además, la alimentación de N-NO_3^- en el reactor hizo que tanto la capacidad de eliminación como la producción de CO_2 se recuperaran tras operar durante el último día en batch bajo condiciones limitantes de nitrógeno. El valor de EC se mantuvo estable hasta el día 14 de operación en $32,55 \pm 0,62 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, mientras que la PCO_2 volvió a ser más fluctuante, con un valor promedio de $72,36 \pm 6,02 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ entre los días 10 y 15. El ratio de mineralización del metano fue mayor al reportado en la etapa anterior $2,50 \pm 0,45 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$.

El deterioro del caldo de cultivo presente en el CSTR se inició en el día 16 de operación, disminuyendo el crecimiento de la biomasa y con ello su concentración en el interior del reactor, finalizándose el experimento con una concentración de biomasa de $1,80 \pm 0,02 \text{ g biomasa L}^{-1}$. También se observó a partir del día 15 una caída en la EC alcanzando un valor de $6,85 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, y disminuyendo con ello la eficacia de eliminación de un valor promedio de $53,43 \pm 2,46\%$ entre los días 10 y 15 a un $11,39\%$ en el día 17. A la par que la EC, disminuyó también la producción de CO_2 , finalizando el experimento con un valor de $20,62 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

Por otro lado, con el inicio de la operación en continuo se introdujo en la columna de burbujeo el caldo de cultivo procedente del CSTR. Con ello, se observó el aumento de biomasa en el interior de este reactor hasta el día 16 de operación, donde se alcanzó una concentración de $2,57 \pm 0,02 \text{ g biomasa L}^{-1}$ (Figura 22 B). Junto con este aumento de biomasa, la EC se vio incrementada entre los días 9 y 12 hasta alcanzar un valor estable de $19,47 \pm 3,08 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Por el contrario, la producción de CO_2 presentó un aumento continuo hasta los dos últimos días del experimento, operándose con valor promedio a lo largo de toda la etapa de $52,13 \pm 1,72 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. El ratio PCO_2/EC fue de $2,16 \pm 0,56 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$.

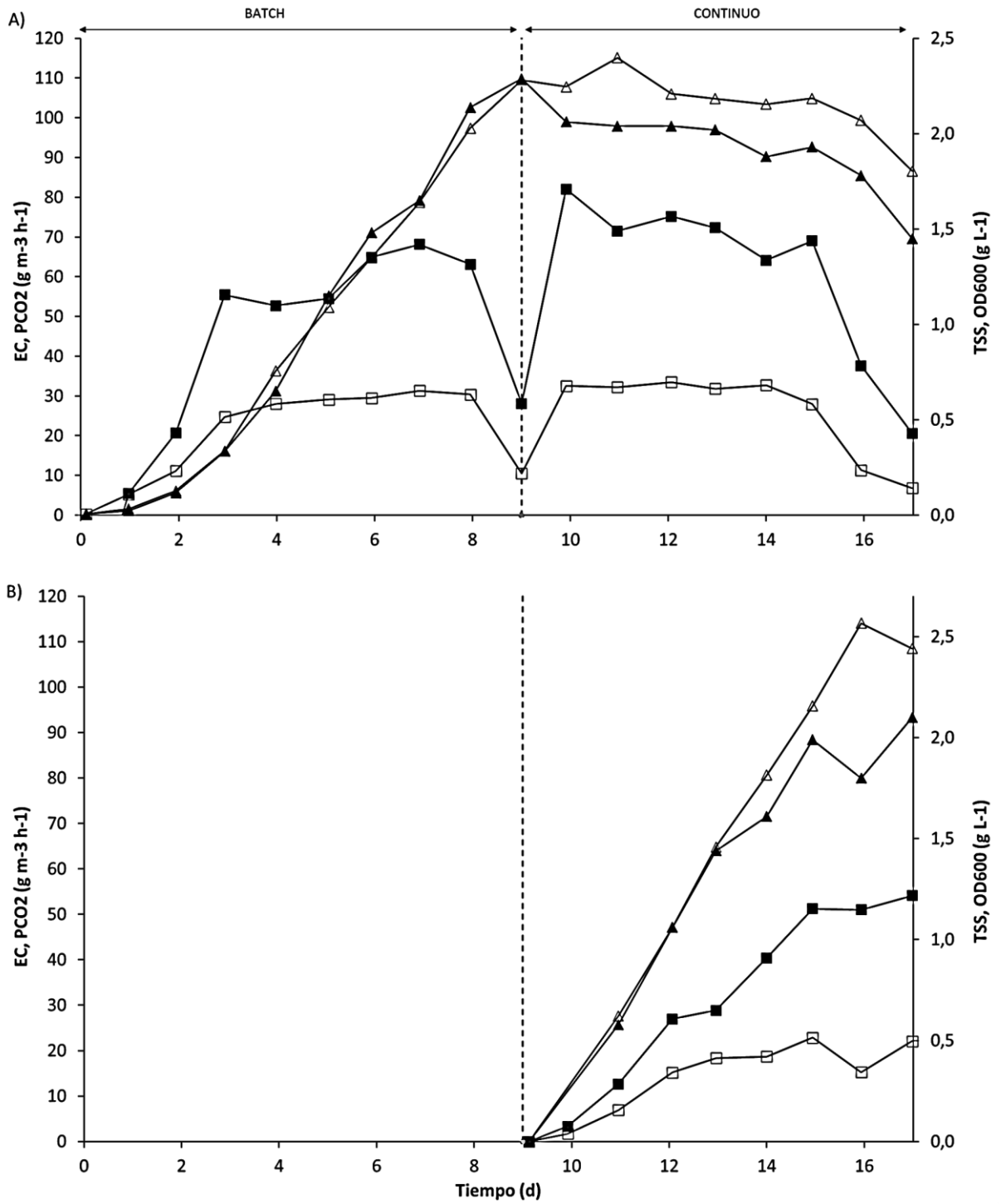


Figura 22. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO₂ (\blacksquare) en el interior del STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1

4.1.2. Nitrógeno total, N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻

- **Arranque STR (batch)**

Tras dos días de operación en batch en el STR el cultivo comenzó a consumir el N-NO₃⁻ presente en el medio hasta su total desaparición en el día 8 (Figura 23 A). En este periodo de tiempo (entre los días 3 y 8), donde ya no existió limitación biológica de la degradación de metano como en días anteriores, se llegó a alcanzar una tasa de consumo de 42,6 g N- NO₃⁻ L⁻¹ d⁻¹ (R²=0,99). En esta etapa prácticamente no se registró la presencia de nitrito (N-NO₂⁻) en el caldo de cultivo, siendo 2 mg L⁻¹ (día 3) el valor más alto observado.

- **Etapa I (continuo, D = 0,008 h⁻¹)**

Con la entrada de medio fresco al iniciarse la etapa en continuo en el STR (Figura 23 A) pudo observarse que la concentración de N- NO₃⁻ aumentó diariamente siguiendo una tendencia lineal, reportándose una tasa de acumulación de 12,12 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ d⁻¹ (R²=0,99). Cuando esta acumulación sobrepasó los 54,08 mg L⁻¹ N- NO₃⁻ (día 14) la cepa comenzó a desnitrificar, lo que se tradujo en la aparición de NO₂⁻ en el caldo de cultivo. La concentración de este anión aumentó de 1,00 mg L⁻¹ N-NO₂⁻ en el día 14 hasta alcanzar los 31,07 mg L⁻¹ N- NO₂⁻ en el día 17, coincidiendo con la disminución de EC, PCO₂ y concentración de biomasa en el caldo de cultivo del STR. Por otro lado, a lo largo de toda la experimentación se observó una concentración de nitrógeno residual de 38,19 ± 1,78 mg L⁻¹.

En el caso de la columna de burbujeo (Figura 23 B) no se detectó la presencia ni de nitrato ni de nitrito a lo largo de toda la etapa en continuo. A pesar de que los resultados de TN mostraron un aumento continuo de la concentración de N en el interior del reactor, este se debió exclusivamente a la acumulación de nitrógeno orgánico residual. Por lo tanto, todo el N-NO₃⁻ presente en los 500 mL diarios de caldo de cultivo del STR que pasaba a la BCB era consumido por la biomasa presente en éste.

Cabe destacar que en ambos reactores se operó con un valor de pH estable a lo largo de la experimentación sin necesidad de control externo. En el caso del CSTR se trabajó con un valor promedio de 7,07±0,24 durante la etapa en batch y 7,19±0,04

en la etapa en continuo. En el caso de la columna, se registró un valor promedio de $7,15 \pm 0,12$ durante la etapa en continuo.

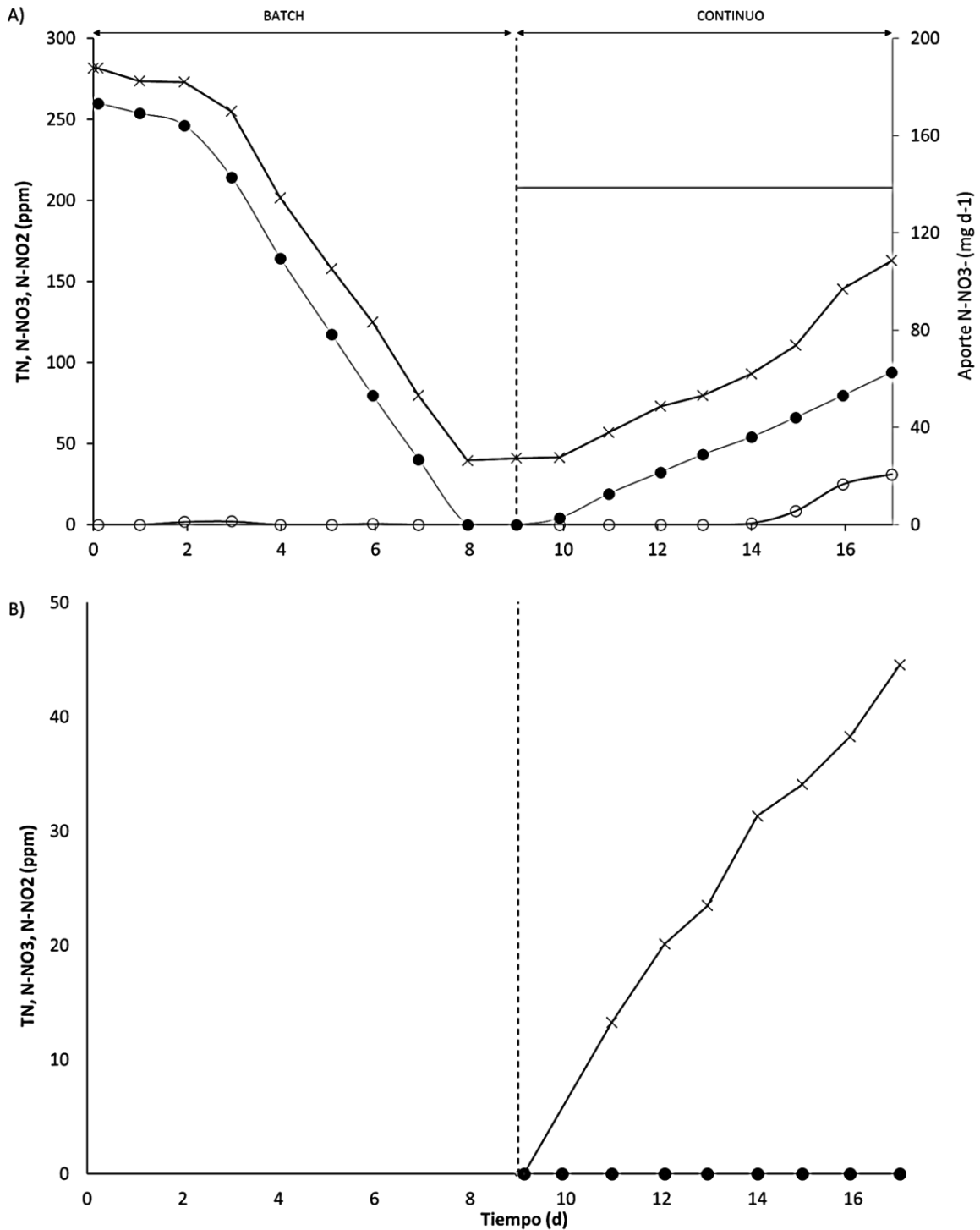


Figura 23. Evolución de la concentración de TN (x), N- NO₃⁻ (•) y N- NO₂⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1

4.1.3. Productividad de PHB

- **Arranque STR (batch)**

La síntesis de PHB tuvo lugar en el STR durante la etapa en batch a pesar de la presencia nitrato. De este modo, en el día 4 de operación comenzó a observarse cierta acumulación, concretamente la biomasa acumuló un 1,75% (Ec. 7) de PHB en presencia de $164,19 \text{ mg L}^{-1} \text{ N- NO}_3^-$ (Figura 24 A). Este valor aumentó en los siguientes días de operación hasta alcanzarse una acumulación del $15,08 \pm 0,60\%$, la máxima observada durante el arranque (día 9).

- **Etapa I (continuo, $D = 0,008 \text{ h}^{-1}$)**

Con el comienzo de la operación en continuo se detectó la presencia de PHB en ambos reactores. En el caso del CSTR (Figura 24 A) parte del PHB acumulado previamente se consumió tras dos días de operación en esta nueva etapa; sin embargo, a partir del día 11 se observó un cambio de tendencia con aumento en el contenido de PHB, alcanzándose una acumulación del $30,71 \pm 1,23\%$ en el último día de operación, la máxima obtenida a lo largo de la experimentación.

En el caso de la BCB (Figura 24 B) la acumulación de PHB vino propiciada tanto por la ausencia de nitrógeno en el reactor como por la acumulación proveniente del STR. Pasados dos días desde el comienzo de la segunda etapa se alcanzó una acumulación del 30,24%, valor que se mantendría estable durante los siguientes cuatro días de operación ($30,57 \pm 0,98\%$) (desde día 12 a 16). Durante este periodo de tiempo se reportó la máxima productividad volumétrica (Ec. 8) con un valor de $126,68 \pm 18,18 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. En los últimos dos días de operación parte de este PHB acumulado fue consumido, finalizándose el experimento con un porcentaje de PHB del $22,58 \pm 0,98\%$ y una productividad volumétrica del $110,24 \pm 1,77 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

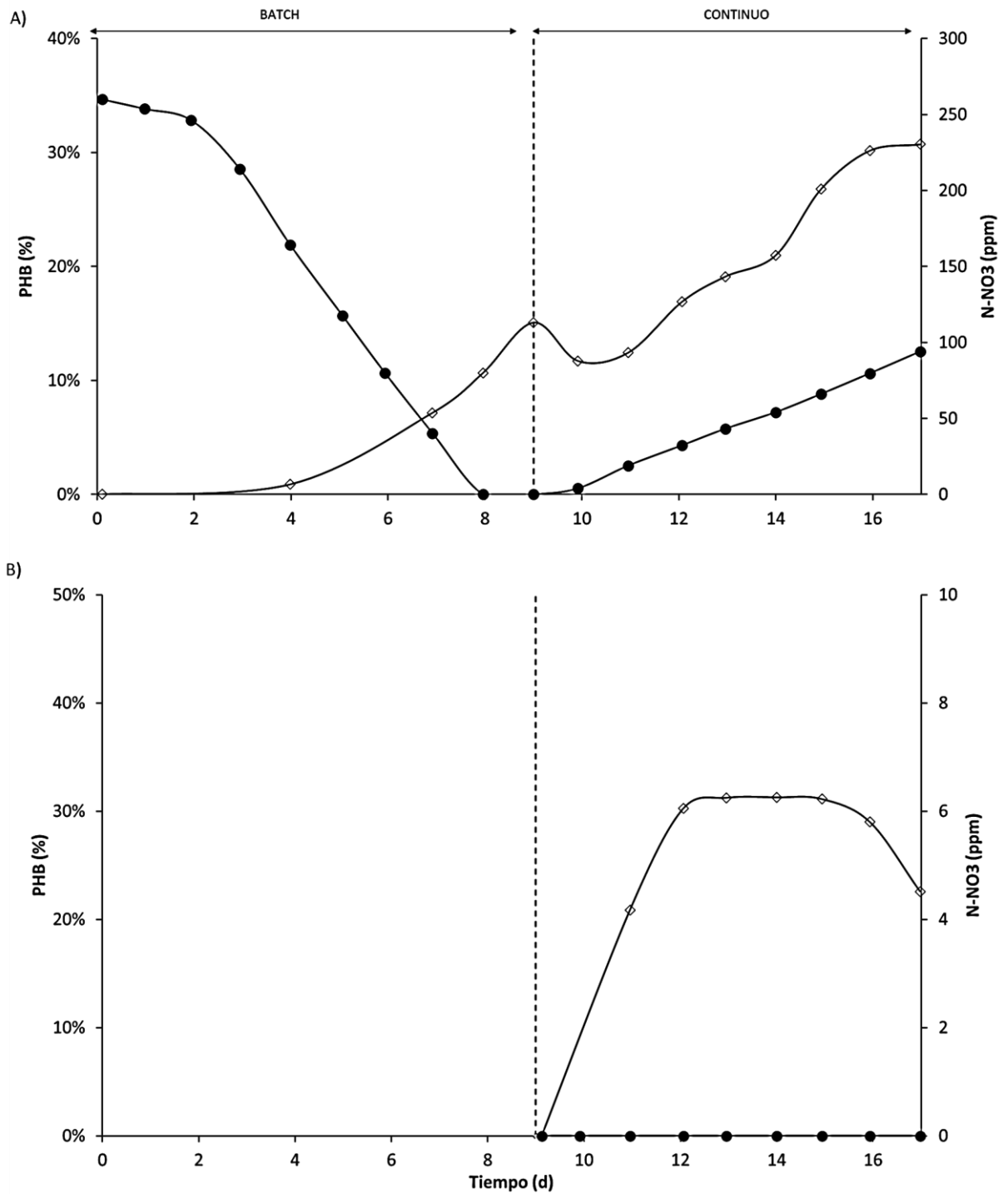


Figura 24. Evolución del porcentaje de PHB (◇) y la concentración de N- NO₃⁻ (●) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 1

4.2. Test 2: Operación en continuo con baja carga de nitrógeno

4.2.1. 1.2.1 Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos

- **Arranque STR (batch)**

Inoculado el STR con la cepa *M. hirsuta*, se llevó a cabo una primera etapa en batch de seis días de duración donde prácticamente se consumió todo el N-NO_3^- presente en el sistema. De forma análoga al experimento anterior, se dio una primera fase de adaptación del cultivo (días 1 y 2) seguida de una fase de crecimiento exponencial de la biomasa (Figura 25 A). En esta fase, que se dio entre los días 2 y 5 de operación, se llegó a alcanzar una productividad volumétrica de $0,29 \text{ g biomasa L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($R^2=0,99$) resultando en una producción de $0,74 \text{ g biomasa d}^{-1}$. La velocidad específica de crecimiento máxima fue de $0,81 \text{ d}^{-1}$ ($R^2=0,99$) y se finalizó la etapa en batch con una densidad de cultivo de $1,197 \pm 0,003 \text{ g L}^{-1}$.

Por otro lado, tanto la capacidad de eliminación de CH_4 como la producción de CO_2 se estabilizaron entre los días 3 y 6 de operación alcanzando un valor promedio de EC y PCO_2 de $25,04 \pm 0,33 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (correspondiente a una RE del $43,91 \pm 0,45\%$) y $52,68 \pm 2,26 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura 25 A). El valor de pH del caldo de cultivo en el STR también se mantuvo estable durante toda esta etapa ($6,90 \pm 0,17$), al igual que el ratio de $\text{PCO}_2 \text{ EC}^{-1}$ ($1,75 \pm 0,78 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$).

- **Etapas I (continuo, $D = 0,008 \text{ h}^{-1}$)**

En el sexto día de operación se produjo el cambio de etapa, en la que se siguió observando un aumento de la concentración de biomasa que acabó estabilizándose en $1,71 \pm 0,03 \text{ g biomasa L}^{-1}$ entre los días 10 y 13 (Figura 25 A). Esto indica que durante los primeros días de esta etapa la producción de biomasa fue mayor que la cantidad de biomasa diaria extraída del STR, llegándose posteriormente a un equilibrio entre lo extraído y lo generado en el reactor durante el estado estacionario. Respecto a los valores de EC y PCO_2 , cabe destacar que ambos se mantuvieron estables hasta el día 12 de operación ($26,59 \pm 0,74 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $54,36 \pm 2,32 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ respectivamente), valores muy similares a los alcanzados durante la etapa en batch. El ratio $\text{PCO}_2 \text{ EC}^{-1}$ resultante en esta primera etapa en continuo tuvo un valor

promedio de $1,99 \pm 0,13 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$. Finalmente, en los dos últimos días (días 13 y 14) se produjo la caída de EC y PCO_2 , finalizando la etapa con una capacidad de eliminación de CH_4 de $18,83 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, correspondiente a una eficacia de eliminación del 29,20%, y una producción de CO_2 de $37,31 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. También se observó una ligera disminución de la densidad del caldo de cultivo, de forma que se llegó al día 14 de operación con una concentración de biomasa de $1,64 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$.

En la columna de burbujeo (Figura 25 B) se registró un aumento continuo de la densidad del caldo de cultivo en el reactor, alcanzándose una concentración máxima de biomasa al final de la etapa de $1,68 \pm 0,02 \text{ g biomasa L}^{-1}$. Los valores de EC y PCO_2 variaron a lo largo de los ocho días, dándose sus valores máximos en momentos distintos del experimento. La mayor capacidad de eliminación se reportó en los días 12 y 13 de operación, con un valor promedio de $10,45 \pm 0,41 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($\text{RE} = 17,36 \pm 0,54\%$), coincidiendo con la menor producción de CO_2 ($4,63 \pm 0,89 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Por el contrario, fue en los días 9 y 10 cuando este último parámetro alcanzó su máximo valor, de $11,96 \pm 1,35 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, coincidiendo con el menor valor de EC reportado ($6,07 \pm 0,54 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$). La menor capacidad de eliminación se registró en el día 14 de operación, último de esta etapa, con un valor de $4,18 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($\text{RE} = 7,57\%$). El ratio de $\text{PCO}_2 \text{ EC}^{-1}$, debido a las fluctuaciones observadas en estos dos parámetros, varió entre 0,4 y 2 $\text{g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$.

- **Etapa II (continuo, $D = 0,011 \text{ h}^{-1}$)**

El paso a la segunda etapa, donde se aumentó la velocidad de dilución del sistema, propició la disminución de biomasa presente en el STR (Figura 25 A). De esta forma, a lo largo de los siete días de operación con esta configuración se observó una tendencia decreciente en la evolución de la concentración de la biomasa, sin alcanzar un valor estacionario, finalizando el experimento con un valor de $0,631 \pm 0,003 \text{ g biomasa L}^{-1}$. Los valores de EC y PCO_2 también disminuyeron con el cambio de etapa, observándose en los últimos tres días un valor promedio de $6,80 \pm 1,44 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($\text{RE} = 11,21 \pm 5,51\%$) y $11,85 \pm 2,40 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Las condiciones empleadas en esta etapa resultaron en una ligera disminución del ratio de mineralización del metano ($1,86 \pm 0,21 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$).



Sin embargo, este cambio de etapa tuvo un impacto positivo durante los primeros días de operación en la BCB (Figura 25 A). La concentración de biomasa se estabilizó en $1,72 \pm 0,00$ g biomasa L^{-1} entre los días 14 y 16, aunque en los días siguientes este valor disminuyó hasta una concentración de $0,54$ g biomasa L^{-1} en el último día de operación. Respecto a la capacidad de eliminación de este biorreactor, se observó una cierta recuperación hasta situarse en $10,33 \pm 1,88$ g CH_4 $m^{-3} h^{-1}$, un valor promedio similar al valor máximo reportado en la etapa anterior. Por el contrario, la producción de CO_2 presentó un aumento continuo hasta el día 18 de operación, alcanzándose los $37,40$ g CO_2 $m^{-3} h^{-1}$. Ambos parámetros disminuyeron los dos últimos días del experimento, que finalizó con un valor de EC y PCO_2 de $5,11$ g CH_4 $m^{-3} h^{-1}$ y $10,57$ g CO_2 $m^{-3} h^{-1}$, respectivamente. En cuanto al ratio de mineralización se observó una gran variación en los valores obtenidos ($0,2-4,4$ g CO_2 (g CH_4) $^{-1}$), similares a los de la etapa anterior.

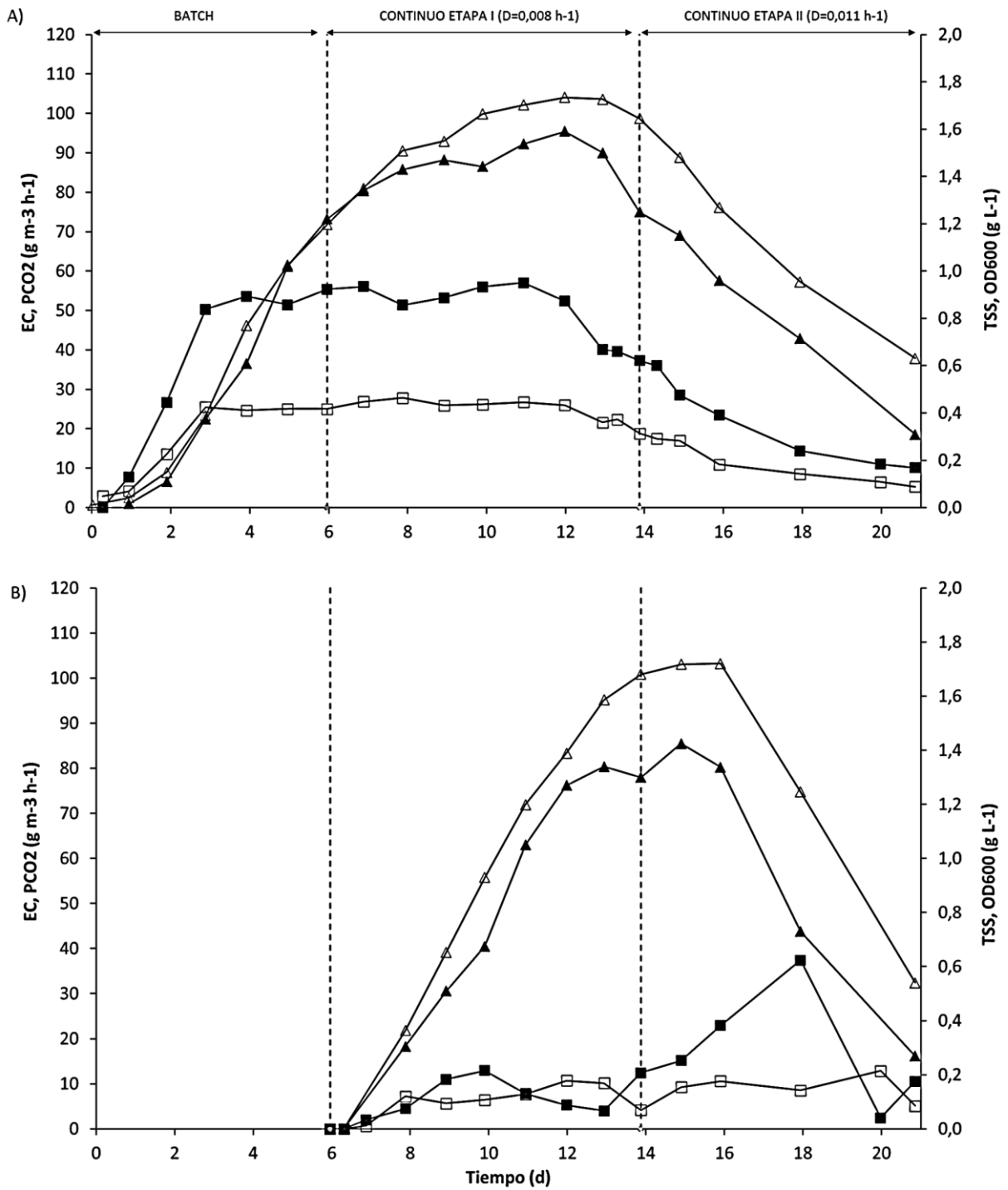


Figura 25. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO2 (\blacksquare) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2

4.2.2. Nitrógeno total, N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻

- **Arranque STR (batch)**

Junto con el crecimiento de la biomasa en el STR se inició el consumo de N- NO₃⁻ presente en el caldo de cultivo (Figura 26 A) hasta finalizar la etapa con 18,3 mg L⁻¹ N- NO₃⁻, consumiéndose así el 91% del nitrógeno presente en el reactor. Entre los días 2 y 6 de operación se dio la mayor tasa de consumo, con un valor de 36,18 mg N-NO₃⁻ L⁻¹ d⁻¹ (R²=0,99). Además, durante estos seis días de operación no se detectó presencia de nitrito y el pH se mantuvo en un valor estable (6,92±0,17).

- **Etapa I (continuo, D = 0,008 h⁻¹)**

Tras el inicio de la primera etapa en continuo, se consumió todo el N-NO₃⁻ presente en el STR (Figura 26 A). A pesar de la entrada diaria de medio fresco, prácticamente no se detectó la presencia de nitrógeno en forma de nitrato a lo largo de esta etapa en continuo, observándose solamente de forma esporádica (6,8 mg L⁻¹ N-NO₃⁻ en el día 8). Por lo tanto, todo el N-NO₃⁻ alimentado diariamente era consumido por la biomasa presente en el caldo de cultivo, sin apreciarse actividad desnitrificante. La diferencia entre los resultados obtenidos por el análisis de aniones y TN revelaron que la concentración de nitrógeno orgánico residual era de 36,66±4,26 mg L⁻¹ N. El valor de pH se mantuvo estable a lo largo de esta etapa, con un valor promedio de 7,07±0,05.

La ausencia de N- NO₃⁻ en el STR durante esta etapa hizo que no llegara nitrógeno en forma de nitrato a la columna (Figura 26B). Por lo tanto, los resultados proporcionados por el TN se debieron exclusivamente a la presencia de nitrógeno orgánico residual, a excepción del día 12 donde se observó un valor de 1,8 mg L⁻¹ N-NO₃⁻. Tampoco se detectó la presencia de nitrito durante esta etapa. El valor promedio de pH fue de 7,05±0,23.

- **Etapa II (continuo, D = 0,011 h⁻¹)**

Con el aumento de la velocidad de dilución en la segunda etapa, se pasó de operar con un aporte de nitrógeno diario de 72,5 mg d⁻¹ N a 95 mg d⁻¹ N, lo que propició la acumulación de nitrógeno en forma de NO₃⁻ en el STR (Figura 26 A). Esta acumulación presentó una tendencia lineal, con una tasa de acumulación de 11,05



mg N L⁻¹ d⁻¹. De forma análoga al experimento anterior, la acumulación de N-NO₃⁻ en el caldo de cultivo favoreció la aparición de nitrito (<2 mg L⁻¹ N- NO₂⁻).

La acumulación de N-NO₃⁻ en el STR originó la llegada de este compuesto a la columna (Figura 26 B), que fue consumido en su totalidad entre los días 15 y 16 de operación. Sin embargo, a partir del día 17 el N-NO₃⁻ empezó a acumularse, finalizando la experimentación con 36,8 mg L⁻¹ N- NO₃⁻. Además, se observó la presencia de nitrito, con un valor estable de 1,37±0,28 mg L⁻¹ N- NO₂⁻ a lo largo de toda la etapa, y una gran acumulación de nitrógeno orgánico residual en el sistema, que llegó a alcanzar una concentración de 31,03 mg L⁻¹ N (día 21).

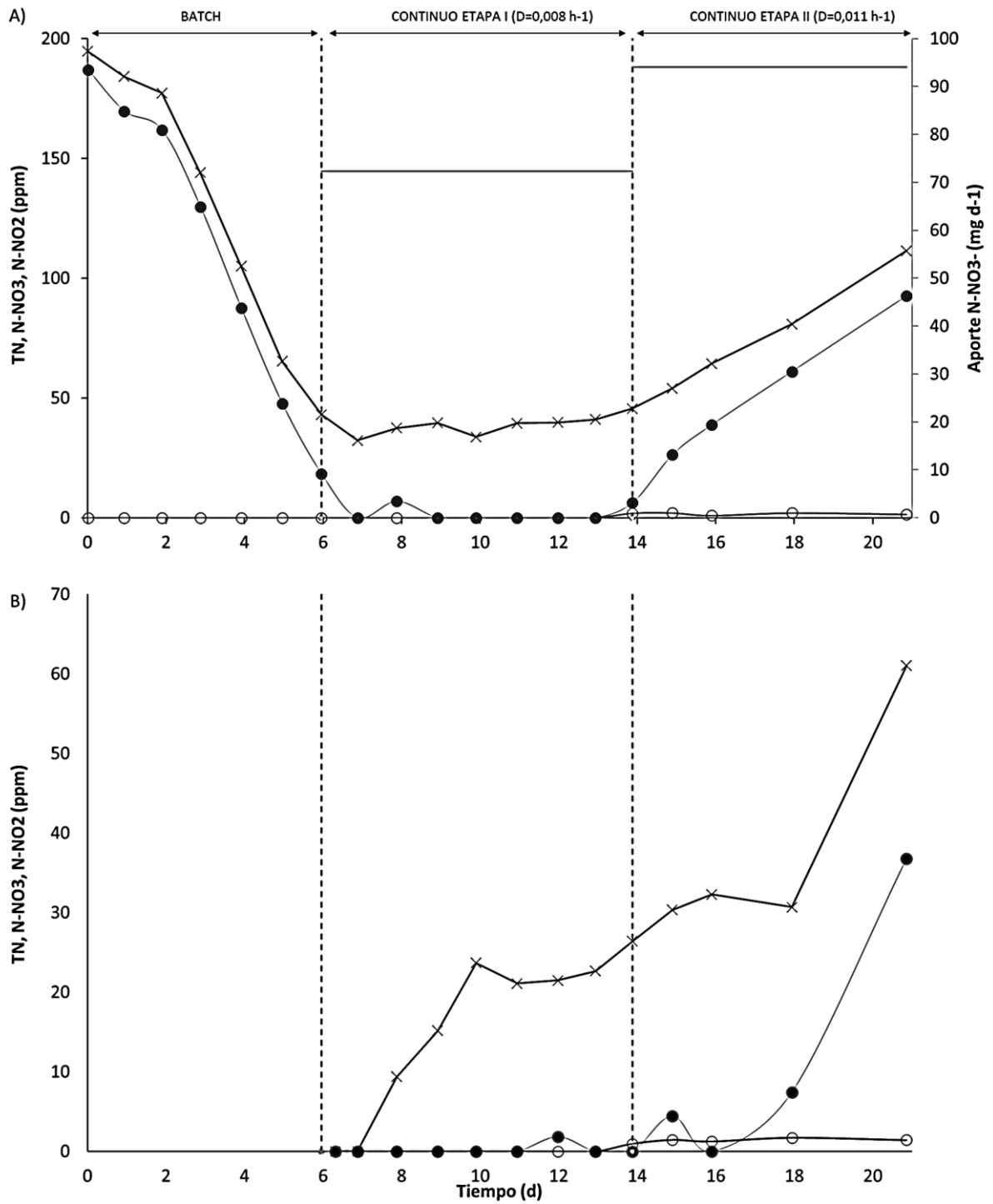


Figura 26. Evolución de la concentración de TN (x), N- NO₃⁻ (•) y N- NO₂⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2

4.2.3. Productividad de PHB

- **Arranque STR (batch)**

Respecto a la síntesis y acumulación de PHB en el STR (Figura 27 A), desde el inicio de la etapa en batch se observó la presencia de este compuesto (1,95%). Este valor fue incrementando a medida que disminuía la cantidad de N-NO_3^- presente en el sistema, finalizando el batch con una acumulación del 14,75% en el día 6 de operación.

- **Etapa I (continuo, $D = 0,008 \text{ h}^{-1}$)**

La ausencia de nitrógeno en ambos sistemas durante la primera etapa en continuo favoreció la acumulación de PHB a lo largo de las dos etapas. En el STR (Figura 27 A) se partió con una cierta acumulación que se vio incrementada en gran medida durante los siguientes tres días de operación, duplicándose prácticamente el porcentaje de PHB acumulado (34,95%) respecto al inicio de la etapa. Este incremento comenzó a ralentizarse a partir del día 10, lo que hizo que se pasara a operar con un valor promedio de PHB del $38,54 \pm 1,42\%$ hasta producirse el cambio de etapa.

En el BCB (Figura 27 B), tras dos días de operación se observó una acumulación de PHB del 31,43%, valor ligeramente superior al contenido que se registró en el STR en el arranque de la etapa. Este porcentaje aumentó hasta alcanzar un valor estable del $46,73 \pm 0,98\%$ entre los días 10 y 13 de operación, correspondiéndose con una productividad volumétrica de $119,49 \pm 27,24 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. La acumulación más alta se dio en el día 12 de operación, con un valor del 47,83% de PHB.

- **Etapa II (continuo, $D = 0,011 \text{ h}^{-1}$)**

En el inicio de la segunda etapa (día 14), donde se aumentó la velocidad de dilución y por tanto el aporte de nitrógeno, se observó un ligero descenso en el porcentaje de PHB acumulado en el STR (Figura 27 A). Así, durante los siete días que se mantuvo esta estrategia de operación se consumió parte del PHB acumulado en la etapa anterior, hasta finalizar el experimento con un porcentaje acumulado del 28,78%.



En el caso de la BCB, el cambio de etapa se inició tras una ligera caída del valor de PHB acumulado, de forma que se partió con un 43,50% de PHB en el reactor (Figura 27 B). Entre los días 15 y 16 de operación se observó una cierta recuperación y se registró una acumulación promedio del $45,91 \pm 0,74\%$, correspondiente a una productividad volumétrica de $205,20 \pm 3,07 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, la máxima alcanzada en todo el experimento. Este porcentaje disminuyó hasta el 2,53% en el último día de experimentación, coincidiendo esta caída con el descenso y el deterioro de biomasa observado en el mismo periodo de tiempo (Figura 25 B).

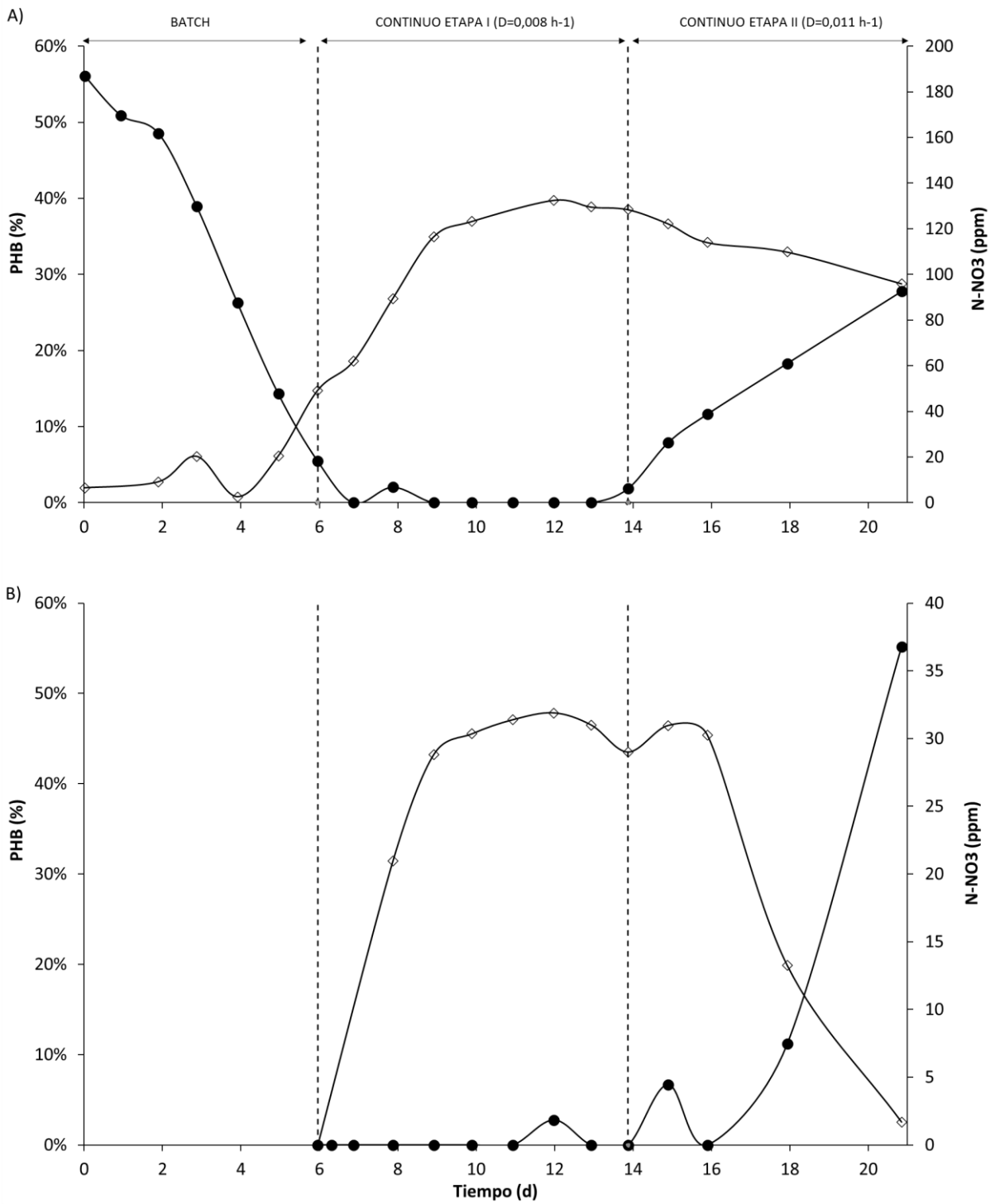


Figura 27. Evolución del porcentaje de PHB (◇) y la concentración de N- NO₃⁻ (●) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 2

4.3. Test 3: Operación en continuo con carga media de nitrógeno

4.3.1. Capacidad de eliminación, producción volumétrica y concentración de sólidos

- **Arranque STR (batch)**

Una vez se inoculó el STR con la cepa *M. hirsuta* se llevó a cabo una etapa en batch de tres días de duración donde se inició tanto el consumo de nitrógeno como el crecimiento de la biomasa. Tras un día de fase lag el cultivo comenzó a crecer hasta alcanzar una concentración $0,365 \pm 0,003$ g biomasa L⁻¹ al final de la etapa (Figura 28 A). Durante estos tres días, se observó mejoría tanto de la capacidad de eliminación de CH₄ como de la producción de CO₂, llevándose a cabo el cambio de etapa con $20,21$ g CH₄ m⁻³ h⁻¹ y $34,41$ g CO₂ m⁻³ h⁻¹, respectivamente.

Con el cambio a la operación en continuo (Figura 28 A) se observó una primera fase de aproximadamente cuatro días de duración donde se produce un aumento de la densidad del cultivo, lo que indica que la producción de biomasa fue superior a lo extraído en el efluente del STR. A partir del día 7 y hasta el día 15 la concentración de biomasa se estabilizó en $1,12 \pm 0,04$ g L⁻¹. A partir del día 15 de operación, se volvió a observar un nuevo aumento de la densidad del caldo cultivo hasta el día 22 de operación, alcanzándose una concentración de $1,686 \pm 0,001$ g biomasa L⁻¹, la cual disminuyó levemente el último día de esta etapa.

- **Etapa I (continuo, D = 0,008 h⁻¹)**

Durante la primera etapa en continuo se registraron valores estables tanto de EC como de PCO₂ (Figura 28 A). La EC presentó un valor promedio de $25,71 \pm 1,21$ g CH₄ m⁻³ h⁻¹, correspondiente a una eficacia de eliminación de $44,43 \pm 1,87\%$, que se mantendría prácticamente estable en toda la etapa. Por otro lado, la producción de CO₂ aumentó inicialmente, estabilizándose en el día 7 de operación en un valor de $51,58 \pm 2,77$ g CO₂ m⁻³ h⁻¹ hasta el día 21. A partir de este día se observó una caída de ambos parámetros que duraría hasta el final de la etapa (día 23), finalizándose así la etapa con una EC y PCO₂ de $17,80$ g CH₄ m⁻³ h⁻¹ y $34,43$ g CO₂ m⁻³ h⁻¹, respectivamente. El ratio de mineralización se mantuvo estable a lo largo de esta primera etapa, obteniéndose un valor promedio de $1,97 \pm 0,09$.

En el caso de la BCB no se llegó a alcanzar un valor estable en ninguno de estos tres parámetros a lo largo de esta etapa, sino que se observaron dos periodos de mejora y deterioro del caldo de cultivo (Figura 28 B). Inicialmente, se observó un aumento de la concentración de biomasa hasta alcanzar un valor de $1,053 \pm 0,001 \text{ g L}^{-1}$ en el día 9 de operación. En los tres días siguientes este valor se redujo hasta casi la mitad ($0,65 \pm 0,01 \text{ g biomasa L}^{-1}$) para después observarse un periodo de mejora hasta el día 18 donde se llega a alcanzar una concentración de $1,64 \pm 0,01 \text{ g biomasa L}^{-1}$, el máximo valor observado en esta etapa. En los días siguientes volvió a observarse una caída en el valor de esta concentración, seguido de un ligero aumento en los dos días previos al cambio de etapa, la cual se inició con $1,04 \pm 0,01 \text{ g biomasa L}^{-1}$.

La capacidad de eliminación y la producción de CO_2 presentaron una evolución paralela a estas variaciones de densidad del cultivo (Figura 28 B). En el primer periodo de aumento de biomasa, entre los días 5 y 10 de operación, se registró un valor de EC estable ($11,05 \pm 0,92 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, correspondiente a una RE de 42,40%) mientras que la PCO_2 aumentó hasta alcanzar un valor de $42,18 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el último día de dicho periodo (día 10). Ambos parámetros cayeron en los dos días siguientes para después aumentar hasta alcanzar los máximos valores observados en esta etapa ($23,76 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el día 17 y $64,06 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el día 19), coincidiendo con la fase de recuperación de la biomasa. Finalmente, los dos parámetros disminuyeron en los días previos al cambio de etapa, operándose con un valor de EC estable entre los días 20 y 23 de $4,07 \pm 0,53 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (RE=7,1±1,1%) mientras que la PCO_2 presentó una caída continua hasta los $17,45 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ en el día 23, el último de la primera etapa en continuo. Estas fluctuaciones en la EC y PCO_2 hicieron que el ratio de mineralización variara entre $1,8\text{-}6,3 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$.

- **Etapa II (continuo, $D = 0,013 \text{ h}^{-1}$)**

Aumentar la velocidad de dilución en la segunda etapa en continuo conllevó una disminución de la densidad del cultivo dentro del STR, pero evitó la caída de la capacidad de eliminación de CH_4 y de la producción de CO_2 iniciada en el final de la etapa I (Figura 28 A). Respecto a la concentración de biomasa, se observó una tendencia decreciente entre los días 23 y 30, aunque finalmente su valor se estabilizó en $0,78 \pm 0,01 \text{ g biomasa L}^{-1}$ en los últimos tres días de operación. Por el contrario, tanto la EC como la PCO_2 presentaron un valor estable a lo largo de los 12



días, con un valor promedio de $16,46 \pm 0,84 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ($RE=27,7 \pm 1,3\%$) y $30,15 \pm 2,21 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, al igual que lo hizo el valor del ratio PCO_2 EC^{-1} ($1,83 \pm 0,08 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$)), que apenas varió con el cambio de etapa.

En el caso de la BCB (Figura 28 B), se observó una caída continua de la concentración de biomasa, finalizándose la experimentación con un valor de $0,52 \pm 0,03 \text{ g biomasa L}^{-1}$. Sin embargo, la capacidad de eliminación de CH_4 y la producción de CO_2 observadas en este sistema aumentaron. La EC pasó de un valor de $3,69 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ (día 23) a estabilizarse en un valor promedio de $12,69 \pm 1,17 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ desde el día 30 hasta el final del experimento. Por otro lado, la PCO_2 presentó un aumento durante esta última etapa en continuo, la cual finalizó con un valor de $41,73 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. El comportamiento del ratio de mineralización del metano fue similar al reportado en la etapa anterior, con valores que fluctuaron entre 2,9 y $4,2 \text{ g CO}_2 (\text{g CH}_4)^{-1}$.

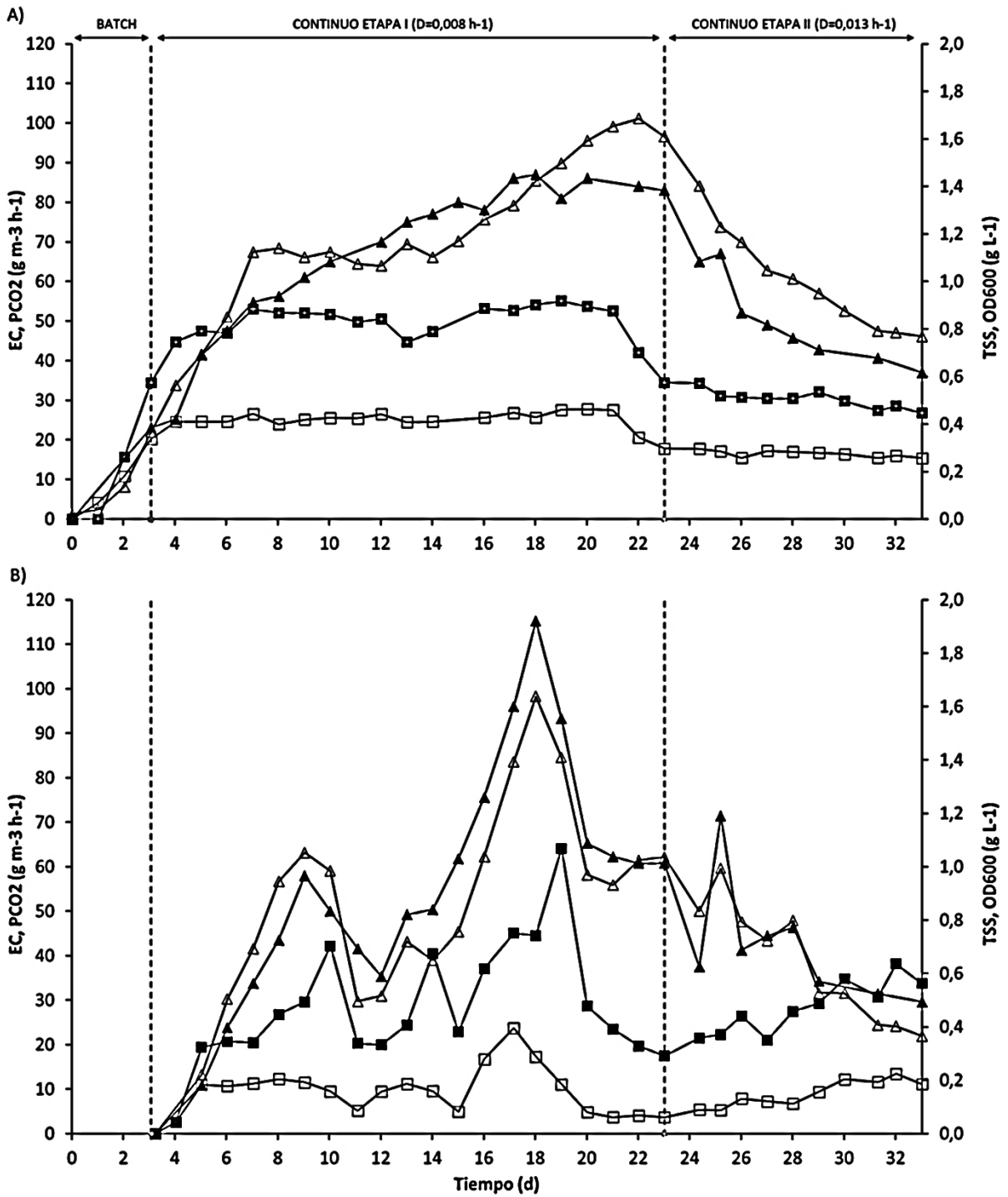


Figura 28. Evolución de la biomasa medida según OD600 (Δ) y TSS (\blacktriangle), EC (\square) y PCO2 (\blacksquare) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3

4.3.2. Nitrógeno total, N-NO₃⁻ y N-NO₂⁻

- **Arranque STR (batch)**

El consumo de nitrógeno se inició tras unas 24 h de fase de latencia, llegando a consumirse un 46% del nitrógeno en forma de nitrato al finalizar este periodo (Figura 29 A). Asimismo, la presencia de N-NO₂⁻ fue despreciable.

- **Etapas I (continuo, D = 0,008 h⁻¹)**

Esta etapa en continuo se inició con 49,51 mg L⁻¹ N- NO₃⁻ en el caldo de cultivo del STR, una concentración que se mantendría estable durante los siguientes cuatro días de operación, por lo que todo el N-NO₃⁻ proporcionado en la alimentación fue consumido por el cultivo metanotrófico presente en el interior del reactor (Figura 29 A). Fue a partir del día 7 cuando el sistema comenzó a demandar una mayor cantidad de N respecto a lo aportado, lo que se tradujo en una disminución de la concentración de N- NO₃⁻ hasta los 18,13 mg L⁻¹ en el día 12 de operación. En los días siguientes se observó un cambio de tendencia y el nitrógeno comenzó a acumularse en el interior del STR, finalizando la etapa con una concentración de 76,03 mg L⁻¹ N-NO₃⁻. Cabe destacar que sólo se registró la presencia de nitrito entre los días 6 y 9 de operación (<2,33 mg L⁻¹ N-NO₂⁻), y en los dos últimos días de esta primera etapa en continuo, la cual finalizó con una concentración de 2,99 mg L⁻¹ N-NO₂⁻. Además, durante esta etapa se detectó una cantidad de nitrógeno orgánico residual que varió entre los 8,60 y 22,59 mg L⁻¹ N.

En la columna de burbujeo, apenas se detectó la presencia de nitrógeno en forma de NO₃⁻ y NO₂⁻ (Figura 29 B). La concentración N-NO₃⁻ presentó valores muy bajos entre los días 3 y 19 de operación, alcanzándose un valor máximo de 6,4 mg L⁻¹ N-NO₃⁻, que fue consumido al día siguiente. Sólo se observó una cierta acumulación de N-NO₃⁻ durante los cuatro últimos días de esta etapa, propiciada por la acumulación que se estaba produciendo en el STR, hasta alcanzar los 19,42 mg L⁻¹ N-NO₃⁻ en el día 23. Por otro lado, similar a lo observado en el STR, apenas se detectó la presencia de nitrito en este reactor, observándose un pico en el día 23 de operación (2,77 mg L⁻¹ N-NO₂⁻). Cabe destacar la gran cantidad de nitrógeno orgánico residual que se originó en la BCB, que llegó a alcanzar un valor promedio de 44,41±1,85 mg L⁻¹ N

durante los últimos cuatro días de operación en esta etapa, duplicando el valor máximo alcanzado en el STR.

- **Etapa II (continuo, $D = 0,013 \text{ h}^{-1}$)**

En esta segunda etapa en continuo se mantuvo el aporte de nitrógeno diario de la etapa I con una menor concentración de nitrato pero una mayor velocidad de dilución (Figura 29 A). Estas condiciones dieron lugar a una estabilización del N-NO_3^- a partir del segundo día de operación, y su concentración se mantuvo en un valor promedio de $72,63 \pm 2,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$, siendo consumido todo el nitrógeno aportado en el sistema con la entrada de medio fresco. Además, tanto la concentración de N-NO_2^- como de nitrógeno orgánico residual se mantuvieron en un valor estable de $1,68 \pm 2,98 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$ y $13,38 \pm 3,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$, respectivamente.

En el caso de la BCB, a pesar de operar con una velocidad de dilución mayor, se continuó observando la acumulación de nitrógeno en forma de nitrato como en los últimos días de la etapa anterior (Figura 29 B). Este aumento de la concentración de N-NO_3^- se produjo hasta el día 28 de operación, donde se alcanzaron $44,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$, iniciándose después un periodo de mayor consumo que duraría hasta día 34, finalizando el experimento con $12,88 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$. Se registraron concentraciones de nitrito estables ($2,00 \pm 0,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$) similares a las observadas en el STR. Además, se continuó dando gran acumulación de nitrógeno orgánico residual, ya observada en la etapa anterior, alcanzando los $70,35 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ en el día 33 de operación.

Durante las tres etapas se operó con un valor de pH estable en los dos reactores. En el caso del STR se obtuvieron valores del $7,05 \pm 0,05$, $7,23 \pm 0,06$ y $7,14 \pm 0,05$ en el batch, primera y segunda etapa en continuo, respectivamente. Similares fueron los valores de pH medidos en la columna, de $7,14 \pm 0,15$ en la primera etapa y $7,21 \pm 0,06$ en segunda.

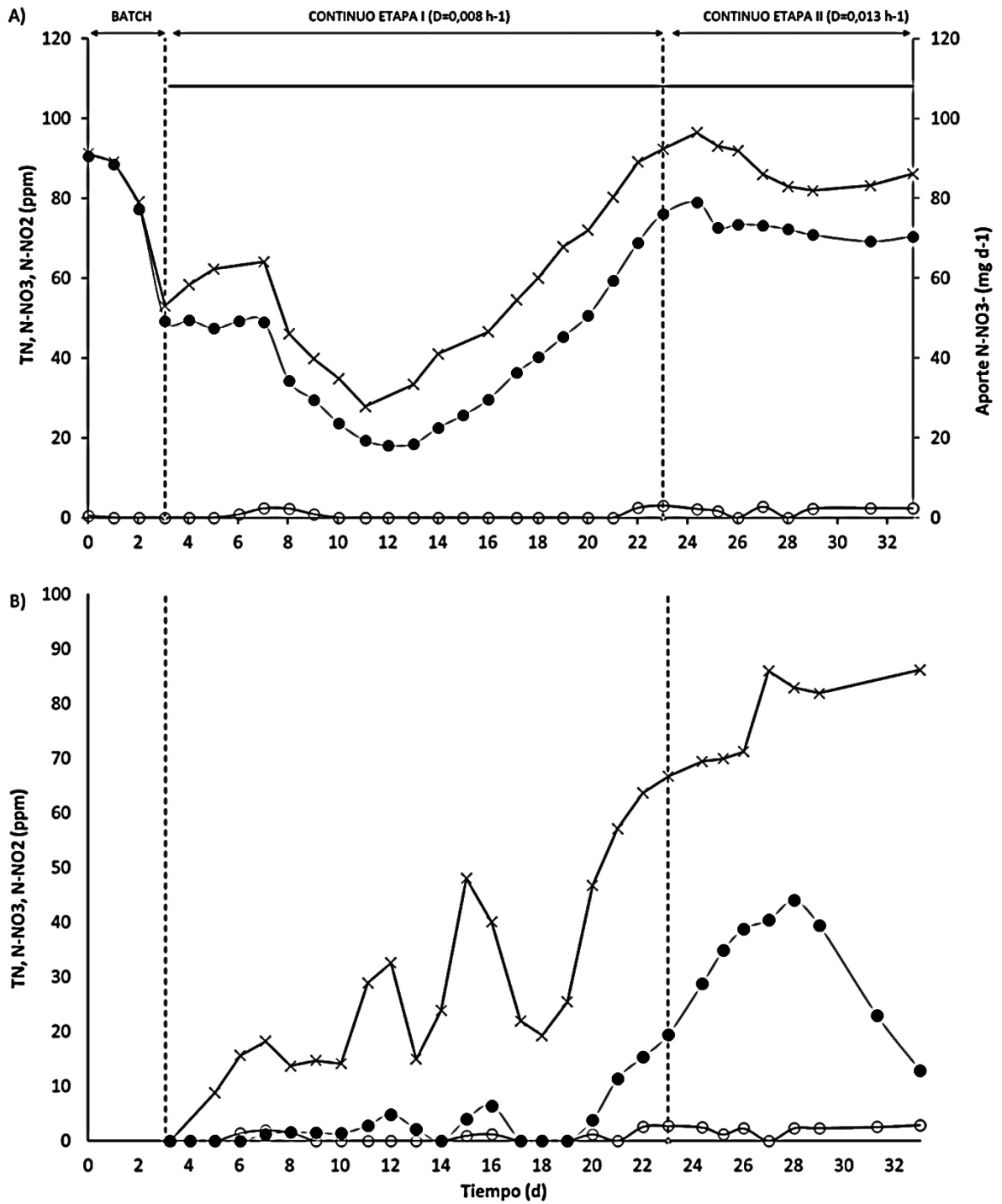


Figura 29. Evolución de la concentración de TN (x), N-NO₃⁻ (•) y N-NO₂⁻ (o) junto con el aporte de nitrógeno diario en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3

4.3.3. Productividad de PHB

- **Arranque STR (batch)**

La acumulación de PHB en el STR se inició durante la etapa en batch (Figura 30 A), alcanzándose un porcentaje del 25,94% en el día 3 de operación.

- **Etapa I (continuo, $D = 0,008 \text{ h}^{-1}$)**

En esta etapa prosiguió la acumulación de PHB, alcanzándose un valor máximo del 42,16% en el día 5 (Figura 30 A). En los cinco días siguientes éste comenzó a caer, reduciéndose su valor hasta el 3,92%. Entre los días 9 y 13 se mantuvo el contenido de PHB en valores bajos ($5,33 \pm 1,27\%$), coincidiendo con el periodo en el que el sistema consumía todo el nitrógeno aportado con la entrada de medio fresco. Inesperadamente, desde el día 13 de operación se observó un cambio de tendencia, donde se reduce el consumo de N-NO_3^- aportado y se observó nuevamente síntesis de PHB hasta alcanzar una acumulación máxima de 48,21% en el día 22 de operación. Sin embargo, en los dos días siguientes este valor cae hasta el 27,94%, coincidiendo con el aumento de la velocidad de dilución.

En el caso de la BCB se observaron dos fases claramente diferenciadas de síntesis y consumo de PHB a lo largo de esta etapa en continuo (Figura 30 B). Por un lado, la entrada de caldo de cultivo procedente del STR, cuya biomasa presentaba una cierta cantidad de PHB, hizo que su acumulación fuera representativa prácticamente desde el inicio de la operación, reportándose un valor del 26,00% en el día 5. Este valor se incrementó en los tres días siguientes hasta alcanzar un 47,14% de acumulación de PHB en el reactor (día 8), el valor máximo de toda la etapa, correspondiente a una productividad volumétrica del $89,11 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Prácticamente todo este PHB fue consumido, llegando a un valor del 3,07% en el día 13 de operación. En los dos días siguientes se observó una ligera recuperación para después volver a caer la acumulación hasta el 2,39% (día 15). Entre los días 15 y 18 de operación, se observó nuevamente acumulación, alcanzándose en el día 18 un porcentaje de PHB acumulado del 26,75% y una productividad volumétrica similar a la máxima alcanzada ($87,68 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). De forma similar a lo ocurrido previamente, este PHB se consumió en los días siguientes hasta alcanzar un 1,94% en el día 21 de



operación, el mínimo valor de toda la etapa. En los dos días siguientes se observó una ligera recuperación, finalizando la etapa con un 5,29% de PHB acumulado en la columna.

- **Etapa II (continuo, $D = 0,013 \text{ h}^{-1}$)**

En el inicio de la segunda etapa, se observó un aumento del porcentaje acumulado tras una ligera caída inicial (Figura 30 A), llegándose a un valor promedio del $40,20 \pm 2,68\%$ hasta el día 33 de operación, último día del experimento.

En la columna continuó aumentando el porcentaje de PHB acumulado hasta observarse un valor estable entre los días 25 y 28 de operación del $8,51 \pm 0,44\%$, correspondiente a una productividad de $21,42 \pm 3,88 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Figura 30 B). Sorprendentemente, este aumento se produjo a la par que el incremento de N-NO_3^- presente en el reactor, al igual que se observó el consumo de ambos entre los días 28 y 33 de operación, finalizando así el experimento con un 2,75% de PHB acumulado en el reactor.

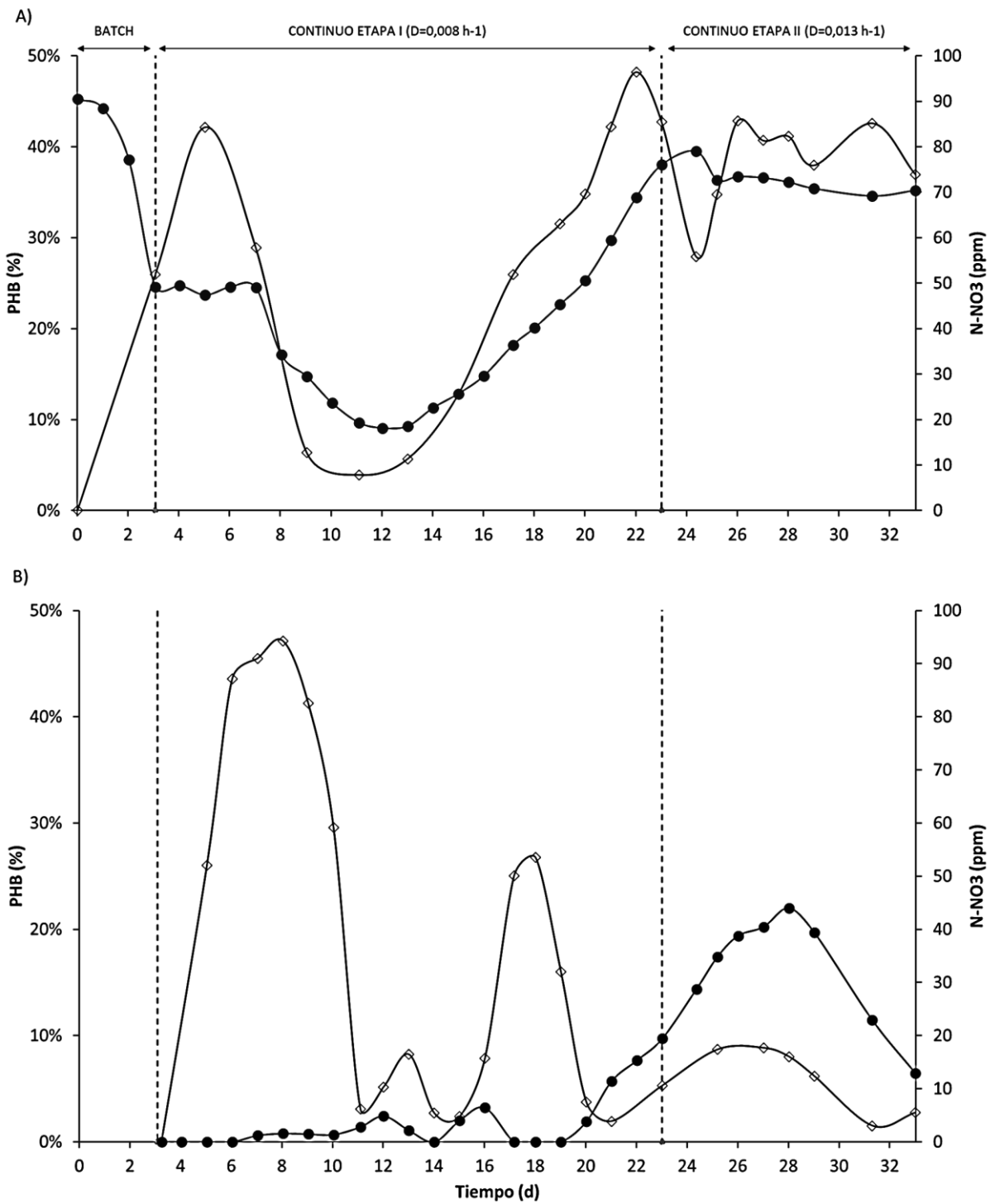


Figura 30. Evolución del porcentaje de PHB (◊) y la concentración de N- NO₃⁻ (•) en el STR (A) y en la columna de burbujeo (B) a lo largo del Test 3



5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Efecto de concentración de N-NO_3^- sobre el desempeño del sistema

La operación en batch llevada a cabo en los Test 1 y 2 sirvió para dilucidar la relación entre el consumo de nitrógeno experimental y el valor teórico calculado a partir de la EC (Ec. 1). En ambos casos, se observó que la demanda de N-NO_3^- por parte del sistema fue $\sim 1,5$ veces superior al valor teórico estimado. Esta discrepancia revela que, además del consumo de nitrógeno por asimilación, tienen lugar otras reacciones disimilatorias, con la consecuente producción de óxidos de nitrógeno (Cai y otros, 2015). Por otro lado, la alta carga de nitrógeno que se empleó inicialmente en los Test 1 y 2, con el fin de evitar que la limitación de nutrientes afectara a la actividad metanogénica, no indujo la acumulación de nitrito a pesar de la aparente actividad desnitrificante.

En el Test 1 los valores de EC y PCO_2 se mantuvieron constantes tras la caída de éstos, observado en los días finales de la etapa en batch, posiblemente causado por la falta de N-NO_3^- en el caldo de cultivo. A lo largo de la operación en continuo la EC en el CSTR presentó un valor promedio de $\sim 30 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, ligeramente inferior a los valores reportados en otros trabajos con STR y una agitación de 600 rpm ($42.5 \pm 5.4 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) (Muñoz y otros, 2018), empleando un consorcio de microorganismos metanotróficos. Para este valor de EC la demanda teórica de nitrógeno (Ec. 1) fue de $34 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, inferior al aporte diario de N-NO_3^- ($55 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Esto provocó que el N-NO_3^- que no era consumido se acumulara favoreciendo la actividad desnitrificante (Bordel y otros, 2019). Cuando se alcanzó una concentración de $25 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, sustancia inhibidora de la actividad metanotrófica (Strong y otros, 2015), se observa un descenso en los valores de EC, PCO_2 y concentración de biomasa. Estos resultados muestran que el cultivo, bajo estas condiciones, presentó una menor tolerancia al N-NO_2^- que la reportada en trabajos previos, donde la inhibición se observa a partir de los $\sim 60 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (Rodríguez y otros, 2020). Respecto a la BCB, no se detectó la presencia ni de N-NO_3^- ni de N-NO_2^- , por lo que el bajo valor de EC promedio alcanzado en este reactor ($\sim 20 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) respecto a los $\sim 40 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ reportados en trabajos análogos (Rodríguez y otros, 2020) no puede relacionarse con la presencia de nitrito en el reactor sino como deficiencias metabólicas debidas a la limitación por nitrógeno.

En el Test 2 se operó con una carga de nitrógeno diaria al CSTR de $29 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en la etapa I. Puesto que se alcanzó un valor promedio de EC de $\sim 25 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, similar al reportado en trabajos anteriores en este mismo reactor operando en continuo ($26,4 \pm 0,5 \text{ g CH}_4 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) (Rodríguez y otros, 2021), la demanda teórica en este caso fue de $24 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A pesar de aportarse una cantidad de N-NO_3^- ligeramente superior a esta demanda estequiométrica, todo el N-NO_3^- introducido diariamente al sistema era consumido, sin observarse presencia de nitrito. Por tanto, la caída en los valores de EC, PCO_2 y concentración de biomasa observada los últimos días de esta etapa no se debió a la presencia de sustancias inhibitoras. Cabe destacar que la ausencia de N-NO_3^- en el CSTR hizo que a la BCB no llegase esta forma del nitrógeno, por lo que el bajo valor de EC observado ($\sim 9 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) puede deberse a las severas condiciones limitantes que se dieron en este reactor, que afectan al crecimiento bacteriano. Con el cambio de velocidad de dilución en la etapa II se aumentó el aporte de nitrógeno a $38 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, que no fue consumido en su totalidad y comenzó a acumularse, provocando que se diese desnitrificación parcial con la consecuente acumulación de nitrito. A pesar de observarse la presencia de N-NO_2^- , su bajo valor ($< 2 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) hace que pueda descartarse como causa del deterioro del caldo de cultivo. La acumulación de N-NO_3^- en el CSTR hizo que este compuesto llegara a la BCB, pero no hubo asociado un aumento en la capacidad de eliminación de CH_4 .

En el Test 3 el aporte de nitrógeno fue de $43 \text{ g N-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ en las dos etapas en continuo. En la etapa I se observa en el CSTR tanto un periodo de consumo como de acumulación de N-NO_3^- que no afectó a la capacidad de eliminación de CH_4 , estable durante toda la etapa ($\sim 25 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$) al igual que la PCO_2 . A pesar de mantenerse el aporte de N-NO_3^- en la etapa II, con el cambio a la etapa II se detuvo la acumulación del N-NO_3^- y se alcanzó un estado estacionario donde todo este nitrógeno aportado era consumido. Bajo estas condiciones la EC se estabilizó en un valor inferior al reportado en la primera etapa en continuo ($\sim 16 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), lo que indicaría que el aporte de N-NO_3^- con el que se operó en este ensayo es el demandado por el sistema para esta capacidad de eliminación de CH_4 . También se observó una disminución en la concentración de la biomasa, lo esperado al aumentar la velocidad de dilución y con ello extraerse una mayor cantidad de biomasa. En el caso de la



BCB, en la etapa I se alternan periodos de mejora y deterioro del caldo de cultivo con respecto a EC, PCO_2 y concentración de biomasa, sin llegarse a alcanzar un estado estacionario. Con el inicio de la etapa II, la llegada de N-NO_3^- a la columna pudo favorecer la recuperación de los valores de EC y PCO_2 , que se estabilizaron en $\sim 12 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $\sim 32 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, sin que la presencia de N-NO_2^- afectara negativamente a las condiciones de la columna.

Finalmente, cabe destacar que en los tres ensayos llevados a cabo se observa un ratio de mineralización en la BCB $> 2 \text{ g CO}_2 (\text{gCH}_4)^{-1}$. Esta mayor producción de CO_2 respecto a los valores estequiométricos puede venir dada por la presencia de predadores en el caldo de cultivo que consumían la biomasa presente en él (Figura A 6). Además, la formación de flóculos hace que la oxidación del CH_4 llevada a cabo por los MOB II se vea dificultada, lo que podría ser la razón por la que se alcanzaron bajas capacidades de eliminación de CH_4 .

5.2. Efecto de concentración de N-NO_3^- sobre la acumulación de PHB

La operación en dos etapas tenía como fin destinar uno de los reactores (concretamente el reactor de columna de burbujeo) a la acumulación de PHB al operarse bajo condiciones limitantes (ausencia de nitrógeno). Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de N-NO_3^- en todos los ensayos, también se observó la síntesis y acumulación de PHB en el STR.

En la etapa en batch de los Test 1 y 2 el consumo de N-NO_3^- tuvo lugar de forma simultánea a la síntesis de PHB, observándose una cierta acumulación cuando la concentración de N-NO_3^- se encontraba por debajo de $\sim 160 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Con el cambio a la operación en continuo se garantizó de nuevo la disponibilidad de N-NO_3^- en el CSTR tras consumirse todo el presente en el batch, pero inesperadamente la síntesis de PHB prevaleció sobre el consumo del N-NO_3^- . En ambos ensayos se observa un incremento del porcentaje de PHB acumulado a la par que se consume el N-NO_3^- aportado al CSTR, finalizando con una acumulación del 30% de PHB la etapa en continuo del Test 1 y del 40% de PHB la etapa I del Test 2. En la etapa II llevada a cabo en este segundo ensayo se observa un cierto consumo del PHB acumulado, hasta alcanzar un 28%. Esta caída coincidió con una alta acumulación

de carbono orgánico en el sistema ($\text{TOC} > 200 \text{ mg L}^{-1}$), pudiendo así deberse a la presencia de metabolitos que pueden inhibir la actividad metanotrófica, como puede ser el formaldehído (Trotsenko y otros, 2008). En el caso del tercer ensayo, el comportamiento inicial observado en el CSTR durante la etapa I fue el esperado, puesto que con la entrada de medio fresco y presencia de CH_4 , el PHB acumulado durante el batch se consumió. Este periodo de consumo de PHB, en el que la concentración de N-NO_3^- fue constante, vino seguido de un periodo de mayor consumo de esta forma del nitrógeno. Sin embargo, cuando la presencia de N-NO_3^- disminuyó hasta los $18 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$, se observó una menor tasa de consumo de N-NO_3^- y se inició de nuevo la síntesis de PHB hasta alcanzar una acumulación del 48%, valor similar a los máximos reportados para esta cepa (López y otros, 2018). A lo largo de la etapa II se alcanzó una acumulación estable ($\sim 42\%$), junto con un consumo total del N-NO_3^- aportado diariamente. Estos altos porcentajes de acumulación de PHB también se alcanzaron en la BCB, cuya síntesis se vio favorecida por la ausencia de N-NO_3^- en los tres ensayos, observándose un valor estable en los Test 1 y 2 (~ 30 y 47% respectivamente). Este estudio pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos reguladores de la síntesis de PHB en microorganismos metanótrofos, donde a pesar de que trabajos anteriores realizados por el grupo reportaron una acumulación de PHB no asociada al crecimiento (López y otros, 2018; Rodríguez y otros, 2020) esto se ve cuestionado tanto en este trabajo como en otros estudios (Rahnama y otros, 2012).

5.3. Influencia de la velocidad de dilución

En el segundo y tercer ensayo se llevó a cabo un aumento en la velocidad de dilución en el sistema de biorreactores. En el caso del Test 2, este aumento conllevó incrementar el aporte de N-NO_3^- al CSTR con el fin de recuperar los valores de EC y PCO_2 con los que se había estado operando en la etapa I. Sin embargo, a pesar de darse un cierto consumo de N-NO_3^- y del PHB acumulado en la etapa I, esto no se vio reflejado en una mejora de las condiciones del sistema y la concentración de biomasa disminuyó a lo largo de toda la etapa II. La no recuperación del sistema pudo deberse a una limitación biológica dados los bajos valores de concentración de biomasa observados los últimos días de experimentación ($< 1 \text{ g biomasa L}^{-1}$).



También se observó una caída significativa de la concentración de biomasa presente en la BCB junto con el porcentaje de PHB acumulado, aunque los valores de EC y PCO_2 no se vieron afectados.

En el Test 3 el cambio a la etapa II consiguió evitar una caída brusca de EC y PCO_2 , al igual que se corrigió la acumulación de $N-NO_3^-$. A pesar de observarse una disminución de la concentración de biomasa, lo esperado al aumentar la cantidad extraída con el efluente, el resto de parámetros se mantuvieron en un valor estable. El cultivo consumía todo el $N-NO_3^-$ aportado con la entrada de medio fresco y tanto la capacidad de eliminación de CH_4 como de producción de CO_2 se estabilizaron ($\sim 17 \text{ g } CH_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $\sim 27 \text{ g } CO_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). También se consiguió mantener una acumulación estable de PHB. En el caso de BCB, se observó un comportamiento similar al del STR, donde la concentración de sólidos disminuyó, pero se recuperaron la EC y PCO_2 , alcanzando valores similares a los observados en la etapa anterior. Por otro lado, se produjo una cierta acumulación de PHB los primeros días tras el cambio de etapa, pero este fue consumido prácticamente en su totalidad.



6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que operar con altas cargas de N-NO_3^- y una velocidad de dilución de $0,008 \text{ h}^{-1}$ permite alcanzar una capacidad de eliminación de CH_4 óptima, pero favorece la actividad desnitrificante y con ello la inhibición del sistema a largo plazo. La EC alcanzada es similar al operar con media y baja carga de nitratos para esta misma velocidad de dilución, pero en ambos casos no se consigue alcanzar unas condiciones estables a largo plazo. Aumentar la velocidad de dilución operando con media carga tampoco reporta unas condiciones estables de operación. Es por ello que las condiciones óptimas para operar en el CSTR se basarían en un aporte de N-NO_3^- de $\sim 43 \text{ g N-NO}_3^- \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ y una velocidad de dilución de $0,013 \text{ h}^{-1}$ ya que, aunque se reduzca la capacidad de eliminación de CH_4 ($\sim 16 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$), se consigue una acumulación estable de PHB que resulta en una productividad de $73,0 \pm 11,0 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Además, esta configuración en la primera etapa del sistema es la que permite a su vez operar bajo condiciones estables en la BCB. Sin embargo, la mayor acumulación de PHB ($\sim 48\%$) y productividad volumétrica ($\sim 140 \text{ g PHB m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) en la columna se observa al operar con una velocidad de dilución de $0,001 \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, los altos valores de acumulación de PHB observados en el CSTR hacen cuestionarnos si operar en dos etapas supone una mejora respecto a los sistemas en una etapa para la producción de PHB. Resultaría interesante que trabajos futuros buscaran optimizar las condiciones de operación de la etapa de acumulación, con el fin de maximizar la productividad del sistema sin comprometer a su estabilidad.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Asenjo, J. A., & Suk, J. S. (1986). Microbial Conversion of Methane into poly- β -hydroxybutyrate (PHB): Growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph. *Journal of Fermentation Technology*.
[https://doi.org/10.1016/0385-6380\(86\)90118-4](https://doi.org/10.1016/0385-6380(86)90118-4)
- Blunt, W., Levin, D. B., & Cicek, N. (2018). Bioreactor operating strategies for improved polyhydroxyalkanoate (PHA) productivity. En *Polymers*.
<https://doi.org/10.3390/polym10111197>
- Bordel, S., Rodríguez, E., & Muñoz, R. (2019). Genome sequence of *Methylocystis hirsuta* CSC1, a polyhydroxyalkanoate producing methanotroph. *MicrobiologyOpen*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.771>
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*.
<https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- 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 Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.026>
- Cai, Y., Zheng, Y., Bodelier, P. L. E., Conrad, R., & Jia, Z. (2016). Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11728>
- Cantera, S., Muñoz, R., Lebrero, R., López, J. C., Rodríguez, Y., & García-Encina, P. A. (2018). Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. En *Current Opinion in Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.021>
- Chen, X., Rodríguez, Y., López, J. C., Muñoz, R., Ni, B. J., & Sin, G. (2020). Modeling of Polyhydroxyalkanoate Synthesis from Biogas by *Methylocystis hirsuta*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b07414>



- Chen, X. Y., Vinh-Thang, H., Ramirez, A. A., Rodrigue, D., & Kaliaguine, S. (2015). Membrane gas separation technologies for biogas upgrading. En *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c5ra00666j>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Cuesta Santianes, M. J., Martín Sanchez, F., Gema, V. C., & Villar Fernández, S. (2017). *Situación actual de la producción de biogás y de su aprovechamiento*. Colección de Informes de Vigilancia Tecnológica madri+d. http://www.madrid.org/media/mtec/17_Situacion_actual_produccion_biogas_y_aprovechamiento.pdf
- Dobre, P., Nicolae, F., & Matei, F. (2014). Main factors affecting biogas production- An overview. *Romanian Biotechnological Letters*.
- Du, G., Chen, J., Yu, J., & Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00266-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00266-8)
- EBA. (2020). *EBA STATISTICAL REPORT 2020*.
- Ebrahimi, S., Picioreanu, C., Xavier, J. B., Kleerebezem, R., Kreutzer, M., Kapteijn, F., Moulijn, J. A., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2005). Biofilm growth pattern in honeycomb monolith packings: Effect of shear rate and substrate transport limitations. *Catalysis Today*. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2005.06.051>
- European Bioplastics. (2020). *BIOPLASTICS MARKET UPDATE 2020*. https://docs.european-bioplastics.org/conference/Report_Bioplastics_Market_Data_2020_short_version.pdf
- European Commission. (2020). Marco sobre clima y energía para 2030 | Acción por el Clima. En *European Commission*.
- FAO, MINENERGIA, PNUD, & GEF. (2011). Manual del Biogás. En *Proyecto CHI/00/G32*.



- García-Pérez, T., López, J. C., 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. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.106>
- Hagman, L., Blumenthal, A., Eklund, M., & Svensson, N. (2018). The role of biogas solutions in sustainable biorefineries. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.180>
- Hamilton, Doug; Graves, Robert; Gould, C. (2019). *Types of Anaerobic Digesters*. <https://farm-energy.extension.org/types-of-anaerobic-digesters/>
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. En *Microbiological Reviews*. <https://doi.org/10.1128/membr.60.2.439-471.1996>
- IDAE. (2007). Biomasa: Digestores anaerobios. En *Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía (IDAE)*.
- IRENA. (2019). Renewable Energy Statistics 2019. *International Renewable Energy Agency*.
- Kadam, R., & Panwar, N. L. (2017). Recent advancement in biogas enrichment and its applications. En *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.167>
- Kalyuzhnaya, M. G., Puri, A. W., & Lidstrom, M. E. (2015). Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>
- Kampman, B., Leguijt, C., Scholten, T., Tallat-Kelpsaite, J., Brückmann, R., Maroulis, G., Lesschen, J. P., Meesters, K., Sikirica, N., & Elbersen, B. (2017). Optimal use of biogas from waste streams - An assessment of the potential of biogas from digestion in the EU beyond 2020. *Optimal use of biogas from waste streams*.
- Kaur, G., & Roy, I. (2015). Lipopolystrategies for large-scale production of Polyhydroxyalkanoates. En *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>



- Koller, M. (2020). The Handbook of Polyhydroxyalkanoates. En *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. <https://doi.org/10.1201/9781003087663>
- Koller, M., & Braunegg, G. (2015). Potential and prospects of continuous polyhydroxyalkanoate (PHA) production. En *Bioengineering*. <https://doi.org/10.3390/bioengineering2020094>
- Kornhauser, A. (2010). Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. <https://doi.org/10.2147/ccid.s9042>
- Lisowyj, M., & Wright, M. M. (2020). A review of biogas and an assessment of its economic impact and future role as a renewable energy source. *Reviews in Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1515/revce-2017-0103>
- López, J. C., Arnáiz, E., Merchán, L., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2018). Biogas-based polyhydroxyalkanoates production by *Methylocystis hirsuta*: A step further in anaerobic digestion biorefineries. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.185>
- López, J. C., Rodríguez, Y., Pérez, V., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2019). CH₄-based polyhydroxyalkanoate production: A step further towards a sustainable bioeconomy. En *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_11
- Meegoda, J. N., Li, B., Patel, K., & Wang, L. B. (2018). A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. En *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102224>
- Muñoz, R., Soto, C., Zuñiga, C., & Revah, S. (2018). A systematic comparison of two empirical gas-liquid mass transfer determination methodologies to characterize methane biodegradation in stirred tank bioreactors. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.03.097>
- Murrell, J. C., & Dalton, H. (1983). Nitrogen fixation in obligate methanotrophs. *Journal of General Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-11-3481>



- Neczaj, E., & Grosser, A. (2019). Biogas production by thermal hydrolysis and thermophilic anaerobic digestion of waste-activated sludge. En *Industrial and Municipal Sludge: Emerging Concerns and Scope for Resource Recovery*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815907-1.00031-3>
- Nelson, R. (2010). Methane Generation from Anaerobic Digesters: Considering Different Substrates. *Environmental Biotechnology*.
- Nsair, A., Cinar, S. O., Alassali, A., Qdais, H. A., & Kuchta, K. (2020). Operational Parameters of Biogas Plants: A Review and Evaluation Study. En *Energies*.
<https://doi.org/10.3390/en13153761>
- Pérez, V., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2020). Comparative Evaluation of Biogas Valorization into Electricity/Heat and Poly(hydroxyalkanoates) in Waste Treatment Plants: Assessing the Influence of Local Commodity Prices and Current Biotechnological Limitations. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01543>
- Pérez, V., Mota, C. R., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from biogas in waste treatment facilities: Assessing the potential impacts on economy, environment and society. *Chemosphere*.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126929>
- Pieja, A. J., Sundstrom, E. R., & Criddle, C. S. (2011). Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II Methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-11>
- Poltronieri, P., & Kumar, P. (2017). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications. En *Handbook of Ecomaterials*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_70-1
- Rahnama, F., Vasheghani-Farahani, E., Yazdian, F., & Shojaosadati, S. A. (2012). PHB production by *Methylocystis hirsuta* from natural gas in a bubble column and a vertical loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.014>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. En *International*

Biodeterioration and Biodegradation.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

Rocha-Rios, J., Kraakman, N. J. R., Kleerebezem, R., Revah, S., Kreutzer, M. T., & van Loosdrecht, M. C. M. (2013). A capillary bioreactor to increase methane transfer and oxidation through Taylor flow formation and transfer vector addition. *Chemical Engineering Journal*.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.065>

Rocha-Rios, José, Bordel, S., Hernández, S., & Revah, S. (2009). Methane degradation in two-phase partition bioreactors. *Chemical Engineering Journal*.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.028>

Rodríguez, Yadira; García, Silvia; Pérez, Rebeca; Lebrero, Raquel; Muñoz, R. (2021). *Optimization of nitrogen feeding strategies for improving polyhydroxybutyrate production from biogas by Methylocystis parvus OBBP in a stirred tank reactor.*

En revisión

Rodríguez, Y., Firmino, P. I. M., Arnáiz, E., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2020).

Elucidating the influence of environmental factors on biogas-based polyhydroxybutyrate production by *Methylocystis hirsuta* CSC1. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135136>

Rodríguez, Y., Firmino, P. I. M., Pérez, V., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2020). Biogas valorization via continuous polyhydroxybutyrate production by *Methylocystis hirsuta* in a bubble column bioreactor. *Waste Management*.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.06.009>

Rodríguez, Y., Pérez, V., López, J. C., Bordel, S., Igor Firmino, P., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2020). Coupling Biogas with PHA Biosynthesis. En *The Handbook of Polyhydroxyalkanoates*. <https://doi.org/10.1201/9780429296611-16>

Rostkowski, K. H., Pfluger, A. R., & Criddle, C. S. (2013). Stoichiometry and kinetics of the PHB-producing Type II methanotrophs *Methylosinus trichosporium* OB3b and *Methylocystis parvus* OBBP. *Bioresource Technology*.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.129>

Sander, R. (2015). Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as

- solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics*. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Sarker, S., Lamb, J. J., Hjelme, D. R., & Lien, K. M. (2019). A review of the role of critical parameters in the design and operation of biogas production plants. En *Applied Sciences (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/app9091915>
- Sayara, T., & Sánchez, A. (2019). A review on anaerobic digestion of lignocellulosic wastes: Pretreatments and operational conditions. En *Applied Sciences (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/app9214655>
- Scarlat, N., Dallemand, J. F., & Fahl, F. (2018). Biogas: Developments and perspectives in Europe. En *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2011). Nitrifying and denitrifying pathways of methanotrophic bacteria. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST20110712>
- Strong, P. J., Xie, S., & Clarke, W. P. (2015). Methane as a resource: Can the methanotrophs add value? En *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es504242n>
- Sundstrom, E. R., & Criddle, C. S. (2015). Optimization of methanotrophic growth and production of poly(3-hydroxybutyrate) in a high-throughput microreactor system. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00025-15>
- Takeda, K. (1988). Characteristics of a nitrogen-fixing methanotroph, *Methylocystis* T-1. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/BF00588388>
- Tays, C., Guarnieri, M. T., Sauvageau, D., & Stein, L. Y. (2018). Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02239>
- Trotsenko, Y. A., & Murrell, J. C. (2008). Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy. En *Advances in Applied Microbiology*.



[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00005-6)

Weiland, P. (2010). Biogas production: Current state and perspectives. En *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>

Wendlandt, K. D., Jechorek, M., Helm, J., & Stottmeister, U. (2001). Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00408-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00408-9)

Wilkinson, K. (2011). Development of on-farm anaerobic digestion. *BioCycle*. <https://doi.org/10.5772/17243>

ANEXOS

ANEXO I: Curvas de calibrado

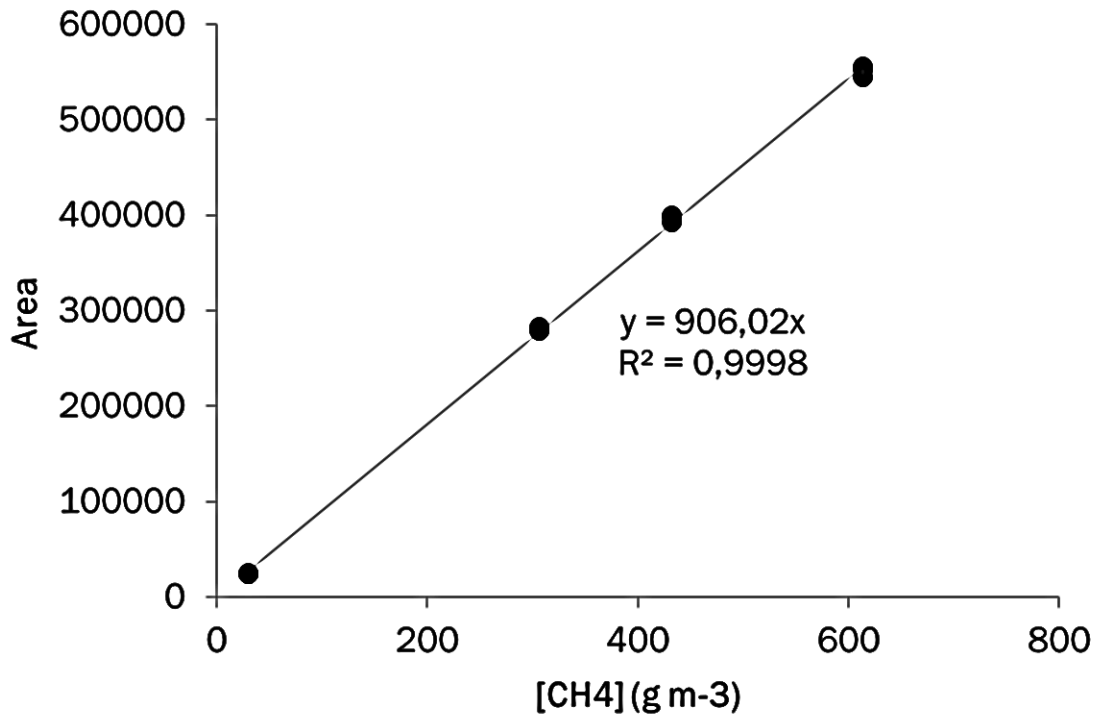


Figura A1. Curva de calibración de la concentración de CH₄

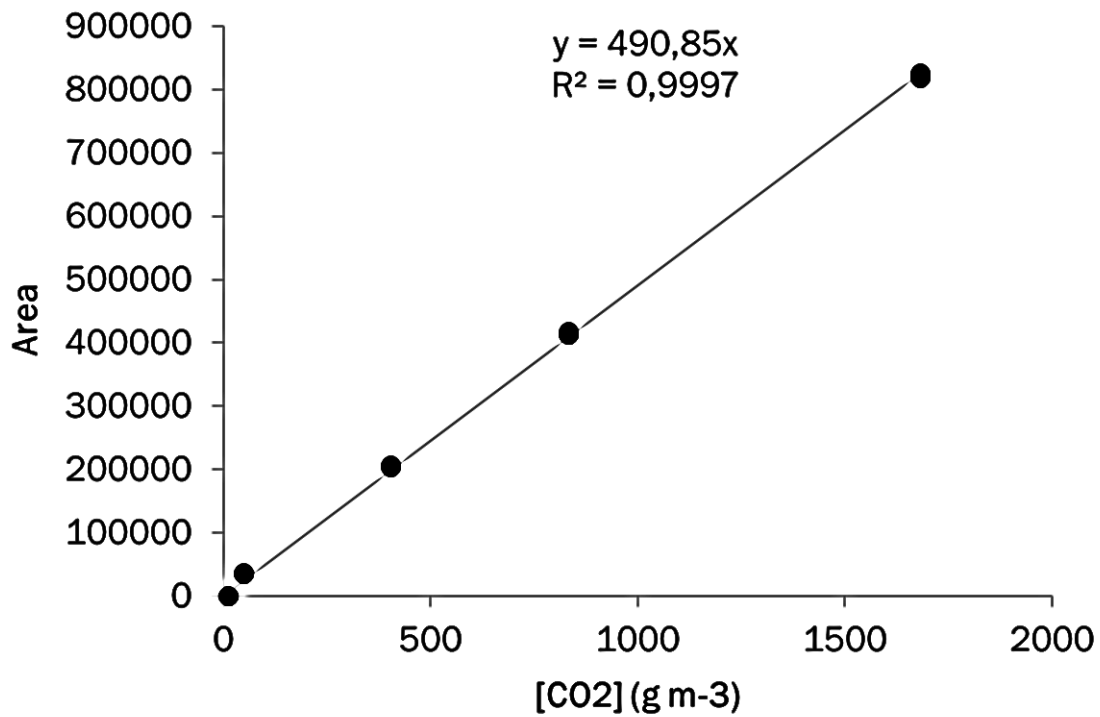


Figura A2. Curva de calibración de la concentración de CO₂

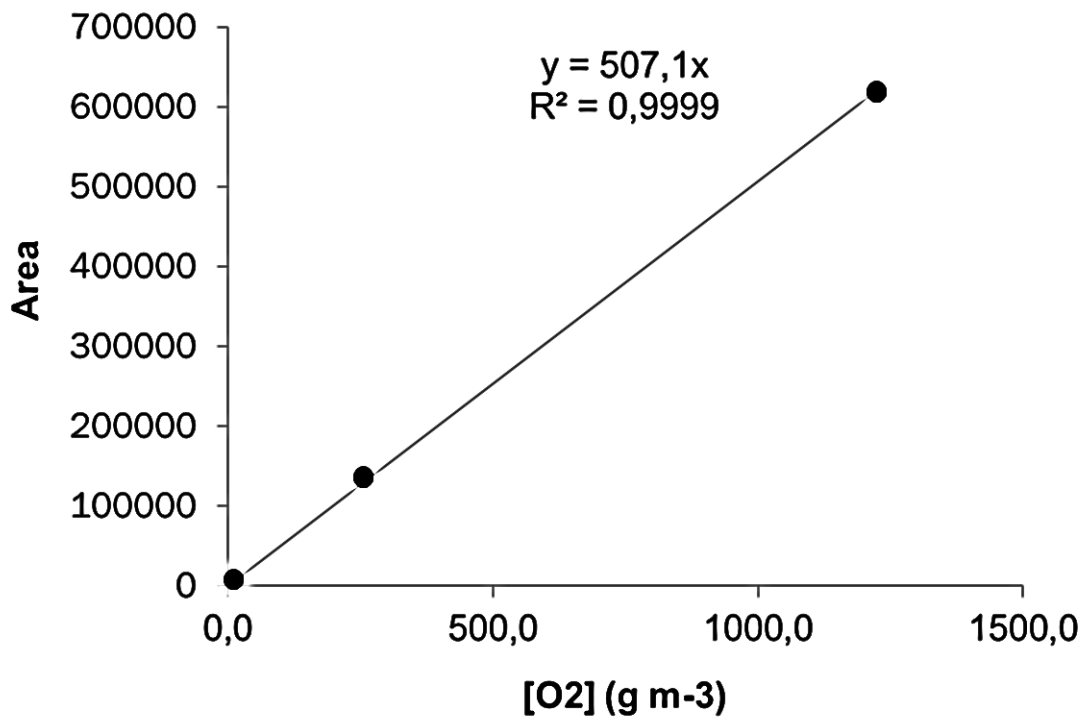


Figura A3. Curva de calibración de la concentración de O₂

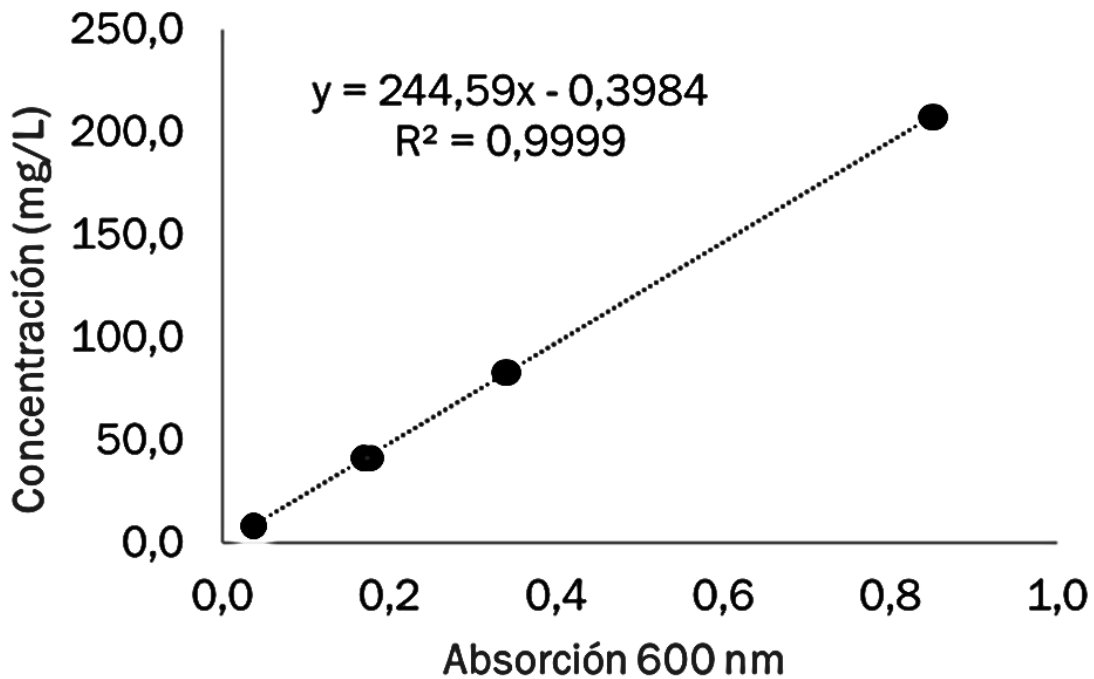


Figura A4. Curva de calibración de la concentración de sólidos

ANEXO II: Imágenes del sistema

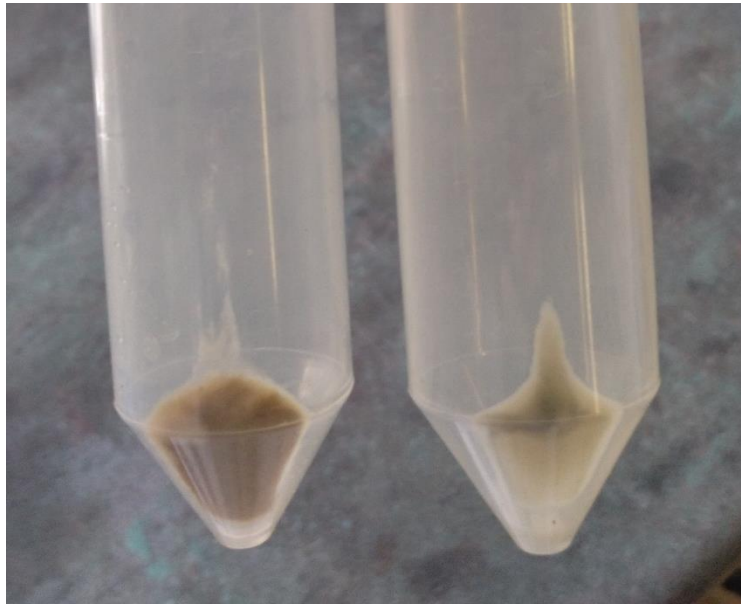
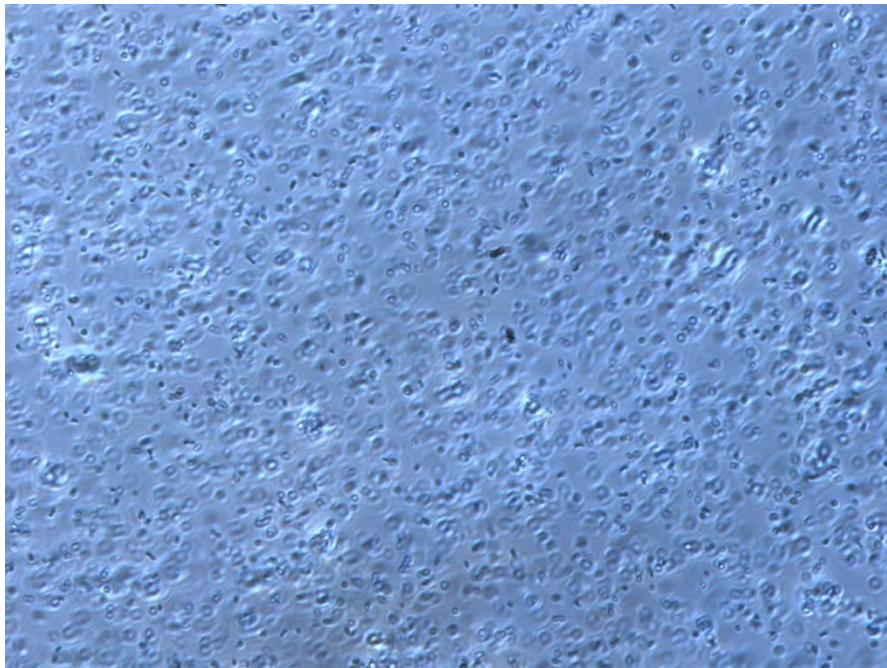


Figura A5. Imagen del pellet del BCB (izda.) y STR (dcha.)

A)



B)

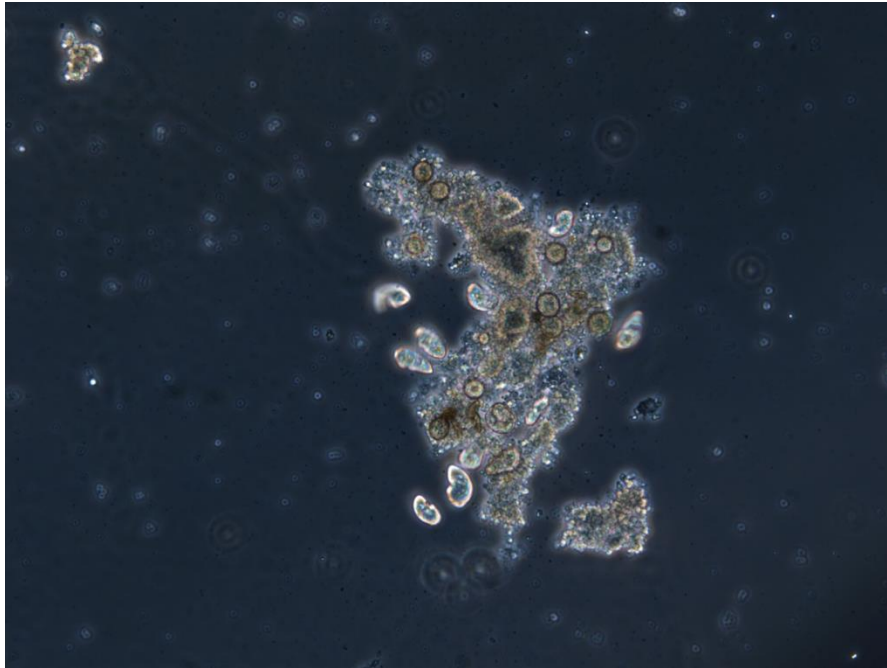


Figura A 6. Imagen al microscopio del cultivo procedente del STR (A) y del BCB (B)