



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Diseño de un proceso de valorización de gases de efecto invernadero

Autor:

Rodríguez Plaza, Suní

Tutor 1:

Muñoz Torre, Raúl

Tutor 2:

Lebrero Fernández, Raquel

Cotutor:

Cantera Ruiz, Sara

**Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente
Valladolid, Julio del 2016.**

Resumen

La investigación planteada evaluó el potencial de valorización de corrientes diluidas de CH₄ (el segundo gas de efecto invernadero más importante) en un producto de alto valor añadido, ectoína. Para ello se llevaron a cabo 3 experimentos independientes: 1) La operación de 2 biorreactores con diferente concentración salina y alimentados con una corriente diluida de CH₄ (4 %). Los resultados mostraron que se producían altas concentraciones de ectoína intra-celular (74.0 ± 7.1 mg ectoína g biomasa⁻¹) y extra-celular (16.0 mg L⁻¹). 2) Viabilidad del proceso industrial de *bio-milking* con *M. alcaliphilum* 20Z para el tratamiento de emisiones de CH₄. Se consiguió excretar al medio un 96.7% de ectoína intra-celular. 3) Un estudio fundamental basado en la búsqueda de nuevos metanotrofos productores de ectoína. Los resultados de este experimento mostraron que dos de los inóculos elegidos poseían metanotrofos capaces de sintetizar ectoína intra-celular.

PALABRAS CLAVE: Tratamiento de CH₄, ectoína, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, metanotrofos, bio-milking.

Abstract

This study assessed an innovative strategy for the valorization of dilute methane emissions based on the bio-conversion of CH₄ (the second most important greenhouse gas) into a high added value product, ectoine. Three tests series were conducted: 1) The operation of two bioreactors at different salt concentrations fed with a dilute methane-laden air emission (4%). The results showed that high concentrations of intra-cellular ectoine were produced during operation (74.0 ± 7.1 mg ectoine g biomass⁻¹) and for the first time the excretion of ectoine was observed (16.0 mg L⁻¹). 2) The viability of bacterial milking for methane bio-refinery was tested. 96.7% of ectoine was excreted to the culture broth, which demonstrated the feasibility of the industrial process. 3) A fundamental study based on the enrichment of new methanotrophs able to produce ectoine was carried out. The results obtained showed that two of the inocula selected contained ectoine-synthesizing methanotrophs.

KEYWORDS: CH₄ treatment, ectoine, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, methanotrophs, bacterial milking.



1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Químicos y medio mineral salino	19
2.2 Inóculos utilizados.....	20
2.3 Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de <i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z en diferentes condiciones de sal	21
2.3.1 Inoculación	22
2.3.2 Operación	22
2.4 Experimento en lote para el enriquecimiento de metanotrofos capaces de producir ectoína.....	24
2.4.1 Inoculación	24
2.4.2 Operación	24
2.5 Experimento “Bio-milking”	25
2.5.1 Inoculación	25
2.5.2 Operación	25
2.6 Análisis realizados.....	26
2.6.1 Monitorización de las concentraciones de CO ₂ y CH ₄ en la alimentación y la salida	26
2.6.2 Medida de SST	26
2.6.3 Medida de la absorbancia del cultivo por DO	27
2.6.4 Análisis de ectoína intracelular	27
2.6.5 Análisis de ectoína extracelular	27
2.6.6 Tratamiento de datos.....	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
3. 1 Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de <i>Methylobacterium alcaliphilum</i> 20Z en diferentes condiciones de sal y con alta concentración de cobre...31	
3.1.1 Producción de ectoína intra-celular	31
3.1.2 Producción de ectoína extra-celular	32
3.1.3 Parámetros operacionales	34
3.2 Experimento en lote para el enriquecimiento de metanotrofos capaces de producir ectoína	37
3.2.1 Producción de ectoína	38



3.2.2 Degradación de metano.....	39
3.3 Experimento “Bio-milking”	41
3.3.1 Producción de ectoína.....	41
4. DISEÑO DE APLICACIÓN INDUSTRIAL	45
4.1 Diseño del fermentador industrial.....	47
4.2 Diseño de tuberías.....	53
4.3 Diseño del compresor.....	55
4.4 Diseño de la bomba.....	56
5. CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	69
Anexo I. Rectas de calibrado.....	71
Anexo II. Tablas de datos	75



1. INTRODUCCIÓN





El metano es el segundo gas más importante de efecto invernadero (GEI). Su potencial de calentamiento global es 25 veces superior al del CO₂, constituye actualmente el 18% de las emisiones de GEIs (Figura 1) y su concentración aumenta incontroladamente de un 0.2 a un 1% anualmente por causas antropogénicas. (1) (2).

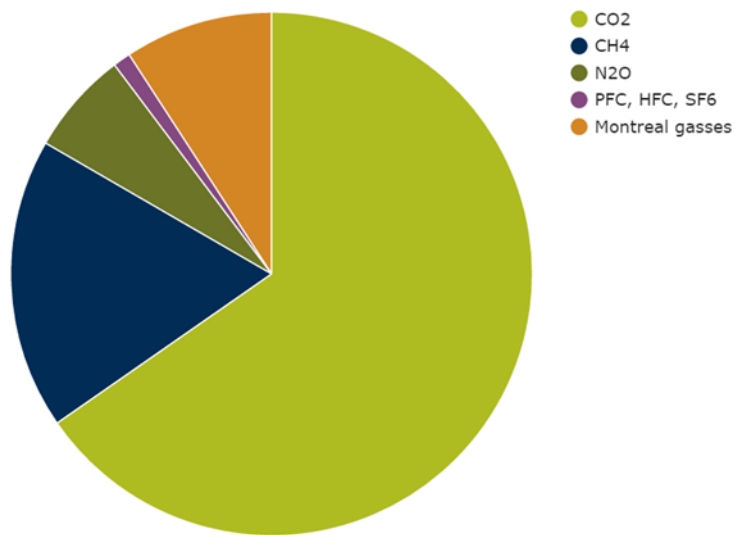


Figura 1: Contribución de los diferentes GEI tal como se prevé en el protocolo de Kyoto y Montreal a la concentración global de gases de invernadero en 2012 (472 ppm CO₂ eq) (2).

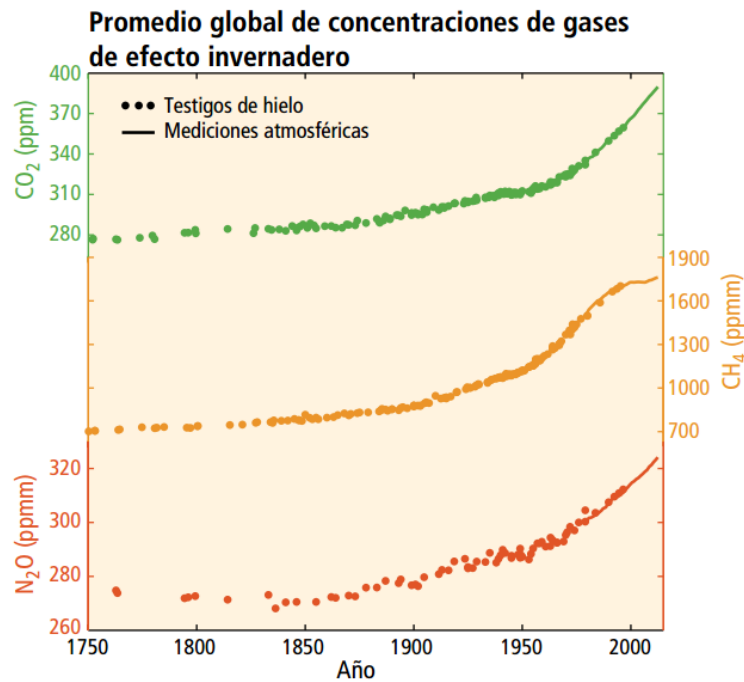


Figura 2: Cambios observados en las concentraciones atmosféricas de gases de efecto invernadero. Concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂, verde), metano (CH₄, naranja) y óxido nitroso (N₂O, rojo) (3).

A pesar de que el metano se forme en el medio natural en la digestión anaerobia de la materia orgánica por la acción última de microorganismos metanógenos (4), su concentración atmosférica en el 2014 ha alcanzado concentraciones de hasta un 150% superiores a las de la era pre-industrial debido a las actividades humanas (Figura2) (5), representando las emisiones antropogénicas actualmente un 60% del total de emisiones de este GEI (6) (Figura 3).



Las emisiones de metano de Estados Unidos por Sector Inventario de 2014

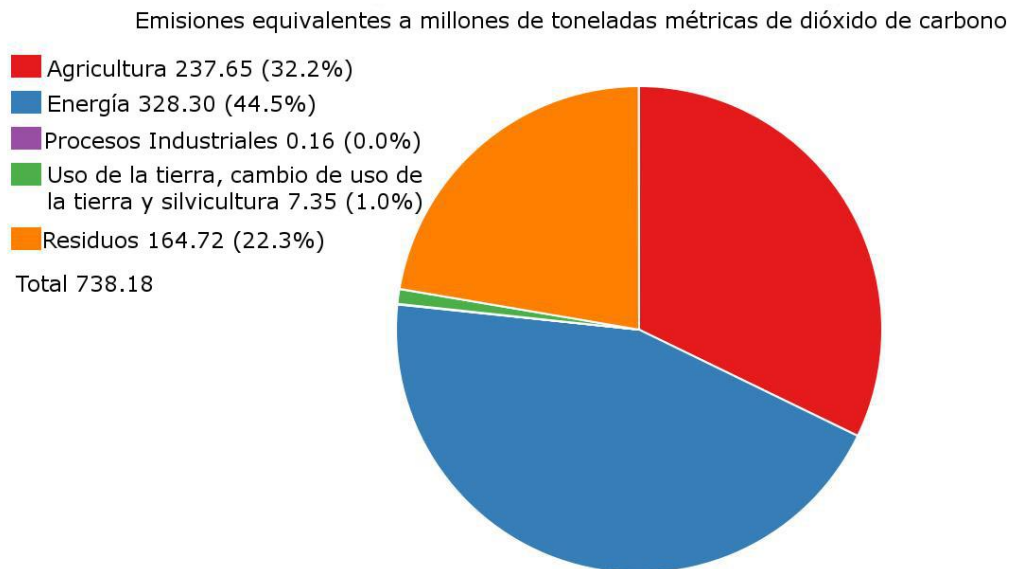


Figura 3: Emisiones de CH₄ equivalentes a millones de toneladas de CO₂ en 2014 (6).

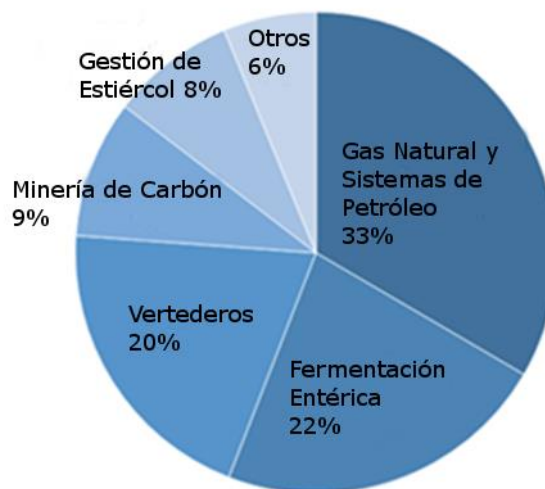


Figura 4: Principales fuentes humanas de metano (6).

Las principales fuentes antropogénicas se deben a zonas de extracción y transporte de gas natural (33%), la fermentación entérica (granjas de rumiantes) (22%), gestión de residuos (20%), minas de carbón (9%), gestión de estiércol (8%) (7) (5) (4) y otros (6%) (Figura 4). Debido a los crecientes daños que genera el metano, tanto ambientales como a la salud humana y economía, se han desarrollado diferentes estrategias políticas y sociales para combatir las emisiones de GEIs. En este contexto, los miembros de las

Naciones Unidas se han comprometido a reducir las emisiones de los GEIs con el objetivo de mantener la temperatura media global 2°C por encima de los niveles pre-industriales, siendo por tanto fundamental la reducción de la llegada de estos gases a la atmósfera (8). Así mismo, la Unión Europea, siguiendo la tendencia del conjunto de medidas adoptadas en 2012 y según el último informe publicado en octubre de 2014 “Tendencias y Proyecciones” se ha propuesto alcanzar en 2020 niveles de GEIs por debajo del 21% de los niveles de 1990. Si las medidas adicionales previstas por los Estados miembros (adopción de la Directiva sobre eficiencia energética, cumplimiento de los objetivos en emisiones de flotas de coches y caravanas, y un nuevo reglamento sobre gases fluorados) se aplicasen completamente, la reducción global de GEIs podría alcanzar en 2020 hasta el 24% en comparación con 1990 (9). A nivel nacional, España ha desarrollado la Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia (EECCCEL) 2007-2012-2020, la cual forma parte de la Estrategia Española de Desarrollo Sostenible (EEDS), como medida de prevención del cambio climático y sus efectos, adoptando diferentes medidas de actuación en contribución al desarrollo sostenible y energía limpia (10). Además, en el caso de Castilla y León, también se han definido una serie de actuaciones con el objetivo de impulsar, coordinar y evaluar las actuaciones de lucha contra el cambio climático en la llamada Estrategia Regional contra el Cambio Climático en Castilla y León 2009-2012-2020 (11).

Si bien es verdad que el metano puede ser utilizado para producir energía como combustible, ya que su incineración es altamente exotérmica (el vapor obtenido a partir de su combustión puede usarse en la industria eléctrica, así como el propio metano puede utilizarse en hogares y vehículos en su forma licuada (5)), esto sólo es posible cuando su concentración es mayor a un 20%. Sin embargo, más del 56% de las emisiones antropogénicas poseen concentraciones menores a un 5% de metano (emisiones diluidas y difusas) y por lo tanto, no son viables para producir energía (1) (antiguos vertederos constituyen entre un 0 y un 20% de ese 56%, minas de carbón ventiladas entre un 0.1 y un 1%, tanques de almacenamiento de estiércol líquido cubiertos entre un 0 y un 3%, etc. (7)). Estas emisiones se pierden a la atmósfera y empeoran la problemática de este gas de efecto invernadero. Para solventar la problemática ambiental generada por estas emisiones de metano, hay diferentes formas de tratamiento.

Existen métodos físico/químicos de tratamiento de metano como son la incineración y la adsorción en carbono activo (12). En el caso de la incineración de estas emisiones diluidas de metano, requiere de combustibles auxiliares y genera partículas nocivas para el medio ambiente (13), mientras que en el caso de la adsorción en carbono activo aumenta la



huella de carbono por el uso de energía de manera intensiva (8), además de su baja afinidad por el metano, lo que aumenta la cantidad de carbono activo necesaria para tratar estas emisiones, y por tanto el coste. En este contexto, aunque se han desarrollado otro tipo de tecnologías físico-químicas igualmente avanzadas, estas no son ni eficaces, ni económicamente viables para el tratamiento de emisiones diluidas de metano.

Nuevas alternativas más respetuosas con el medio ambiente están surgiendo en la actualidad. Éstas alternativas consisten en el tratamiento de los GEI con reactores biológicos. Los tratamientos biológicos se basan en la descomposición de compuestos orgánicos perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana mediante procesos celulares metabólicos. La eliminación de estos compuestos se realiza a través de microorganismos tales como bacterias, micro algas u hongos especializados (8), los cuales, además de ser un método menos costoso, son mucho más eficientes en la eliminación de contaminantes o compuestos tóxicos de corrientes gaseosas, sobre todo cuando éstos se encuentran en baja concentración (8).

Estos tratamientos biológicos de oxidación en bio-reactores específicos como biofiltros, biolavadores, biofiltros percoladores y sistemas de difusión de lodos activos ya han sido probados eficazmente en el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles y compuestos odoríferos (14) (12). Además de ser más respetuosos con el medio ambiente, este tipo de tratamientos han demostrado ser altamente eficientes y económicamente más viables, suponiendo una ventaja añadida sobre los métodos físico/químicos (14) (15).

A pesar de la mejoría que suponen estos métodos biológicos frente a los físico/químicos y de la implementación de biofiltros y biofiltros percoladores para el tratamiento de emisiones gaseosas de metano durante los últimos 40 años, la eficacia de este tipo de biotecnologías se encuentra aún limitada: a) por la baja transferencia del metano de la fase gaseosa a los microorganismos (16), debida a la baja solubilidad del metano en el agua (17), y b) por la falta de conocimiento que se tiene actualmente sobre la microbiología subyacente a la oxidación del metano, sobre todo unida a la obtención de sustancias de alto valor añadido (16).

El tratamiento biológico de metano, se lleva a cabo a través de los metanotrofos, únicos organismos capaces de usar metano como única fuente de carbono y energía. Los metanotrofos son un subgrupo de bacterias dentro de los metilotrofos (bacterias aerobias cuya fuente de carbono y energía son aquellos compuestos orgánicos de un átomo de carbono más reducidos que el ácido fórmico, como el metano, metanol, metilaminas, halometanos, etc), las cuales utilizan el metano como fuente de carbono y energía en presencia de oxígeno: $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (4) (5). Éstas bacterias comúnmente se

encuentran en aquellos entornos en los que hay una fuente natural de metano, disminuyendo de este modo la llegada de éste a la atmósfera (4) (8).

Los metanotrofos se pueden clasificar en tres grandes grupos, diferenciados entre sí por sus características taxonómicas: metanotrofos de tipo I (γ -proteobacteria), tipo II (α -proteobacteria) y tipo X (4) (5). Los de tipo I y II suelen diferenciarse en la ruta metabólica que siguen para la asimilación del formaldehído: normalmente los tipo I asimilan el formaldehído vía ribulosa monofosfato (RuMP), mientras que los de tipo II utilizan la ruta de la serina. Los metanotrofos de tipo X utilizan la ruta RuMP, poseen ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa y crecen a temperaturas mayores que los tipo I y II (8) (5). A los metanotrofos tipo I pertenecen el grupo *Gammaproteobacteria*, grupo al que pertenecen los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylococcus*. Al tipo II pertenece el grupo *Alphaproteobacteria*, con los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*. Finalmente, al tipo X pertenecen principalmente el género *Methylococcus* (8). La presencia de un tipo u otro suele venir dado por las diferencias de concentración de metano y oxígeno presentes en el entorno de la bacteria, de tal modo que una alta concentración de metano y baja concentración de oxígeno favorece la presencia de metanotrofos de tipo II, mientras que en el caso contrario, una baja concentración de metano y alta concentración de oxígeno favorece la presencia de los tipo I (5).

Una de las principales características que diferencia a los metanotrofos es la presencia en ellos de unas enzimas llamadas metano monooxigenasas (MMOs), las cuales son las responsables de la oxidación del metano a metanol. Dentro de este grupo de enzimas se diferencian dos tipos: solubles (sMMO) presentes en el citoplasma y particuladas o unidas a membrana (pMMO) presentes en la membrana intracelular (4) (8). Las sMMOs utilizan el $\text{NADH} + \text{H}^+$ como donador de electrones, y poseen un sitio catalítico para el hierro. Esta enzima se ve regulada por la presencia de cobre (Cu^{2+}) y es inhibida a altas concentraciones de éste. Las sMMO han sido detectadas en metanotrofos de tipo II y tipo X (4) (5). Las pMMOs necesitan tanto hierro como cobre para ser catalíticamente activas. La alta presencia de Cu^{2+} las favorece, siendo capaces de expresarse en cualquier tipo de metanotrofo que crezca en presencia de este compuesto con una concentración mayor a $0.8 \mu\text{M}$ (4) (5) (18) (19).

Tras la conversión del metano a metanol por las MMOs, el siguiente paso en la ruta metabólica de los metanotrofos, como puede observarse en la Figura 5, es la bio-conversión de éste a formaldehído a través de la acción de la enzima metanol deshidrogenasa (4) (8). A continuación el formaldehído es transformado a ácido fórmico a través de las formaldehído deshidrogenasas o

a biomasa a través de las rutas RuMP en los metanotrofos tipo I y X o a través de las rutas de la serina en los tipo II (8).

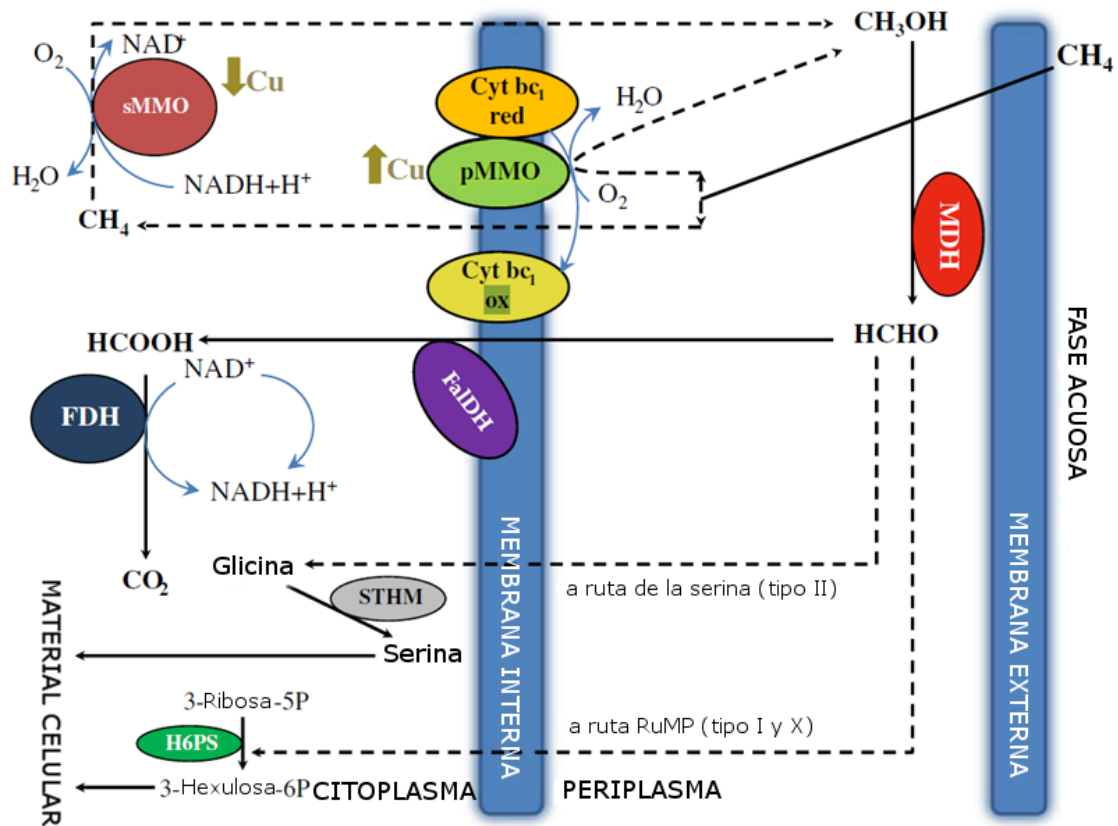


Figura 5: Rutas de oxidación del metano en metanotrofos tipo I y II. Las líneas continuas representan un flujo unidireccional en la ruta, mientras que las líneas discontinuas representan rutas alternativas. sMMO, metano monooxigenasa soluble; pMMO, metano monooxigenasa particulada; MDH, metanol deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa; FALDH, formaldehído deshidrogenasa; cyt red/ox citocromo reducido / oxidado; STHM, serina hidroximetiltransferasa; H6PS, sintasa hexulosa-6-fosfato (8).

Los metanotrofos se ven altamente influenciados por las características del medio como los nutrientes presentes (tanto macronutrientes como elementos traza y su suministro), la temperatura y el pH (5). Las condiciones óptimas para el crecimiento de la mayor parte de los metanotrofos, así como para la oxidación del metano, son un contenido de agua del 20 a 35%, temperaturas entre 25 y 35°C, pH entre 7 y 7.65 (aunque también se han encontrado metanotrofos en ambientes alcalinos con pHs alrededor de 9 y otras en medios ácidos con pHs muy por debajo de 7), una concentración de amonio entre 12 y 61 μM y una concentración de cobre menor de 4.3 μM (4).

Debido a la habilidad de los metanotrofos de catalizar un gran número de biotransformaciones, este tipo de bacterias tienen un gran interés para los científicos en el ámbito de la biorremediación, ya que son capaces de degradar hidrocarburos halogenados de bajo peso molecular, los cuales son

contaminantes ubicuos y tóxicos. Además tienen la característica de poder sintetizar productos de alto valor comercial (4), como por ejemplo:

- *Single-Cell Protein*: proteína utilizada tanto para alimentación animal como humana.
- *Biopolímeros*:
 - *Polímeros de almacenamiento interno*: alcanosatos polihidroxiálquilaminas (PHA) tales como poli (3-hidroxi-butirato), o PHB (polihidroxi-butiratos). Son polímeros de almacenamiento bacterianos generalizados e intensamente investigados por su potencial como sustitutos de los plásticos derivados de la industria del petróleo.
 - *Polisacáridos extracelulares*: las propiedades coloidales y adhesivas de los polisacáridos extracelulares y sus efectos sobre la reología de los líquidos hacen que se utilicen en las industrias de alimentos y productos no alimentarios tales como las industrias farmacéutica, textil y del petróleo.
- Lípidos para la producción de biodiesel o como suplementos para la salud humana (reducción del colesterol).
- Vitamina B12.
- Productos metabólicos solubles como metanol, formaldehído y ácidos orgánicos.
- Óxido de propileno por catálisis de la célula entera (la amplia gama de sustratos para las MMOs permite a estas enzimas degradar los contaminantes del suelo, así como generar productos, tales como 1- y 2-alcoholes de los C1-C8 n-alcanos, 1,2-epóxidos de los alquenos terminales y etanol / etanal del éter dietílico).
- Osmoprotectores internos como las ectoínas (5), siendo éste último de gran interés en la investigación llevada a cabo, puesto que ésta plantea una evaluación sistemática de la viabilidad técnica y económica de una nueva generación de biorreactores basados en el transporte directo gas-microorganismo para la eliminación de metano y su revalorización como fuente de ectoína.

La ectoína (ácido (S)-2-metil-3,4,5,6-tetrahidropirimidino-4-carboxílico) (Figura 6) es un compuesto osmoprotector intracelular cuya estructura es la de un ácido imino cíclico sintetizado por bacterias halófilas o halo tolerantes para evitar la deshidratación ante la concentración salina del medio exterior (5) (20). Este compuesto permite sobrevivir a las bacterias en un medio con ósmosis cambiante, también puede ser tomado por éstas del medio en lugar de ser sintetizado (21).

Tabla 1: Importancia y usos de la Ectoína (22).

Efecto	Compuesto
Protección de macromoléculas	
Protección de proteínas recombinantes frente a la degradación, agregación, mal plegamiento y la congelación	Hidroxiectoína
Termoestabilidad de cianopicina sintética	Ectoína
Protección de enzimas contra el calentamiento, congelación y secado	Hidroxiectoína y ectoína
Termoestabilidad de fitasa (90 ° C)	Ectoína
Protección de los anticuerpos contra la degradación proteolítica	Ectoína
Protección contra el estrés de congelación-descongelación de inmunotoxinas	Hidroxiectoína
Reducción efectiva de la temperatura de fusión del ADN	Ectoína
Promotor de PCR	Hidroxiectoína
Mejorar la calidad de los microarrays de ADN	Hidroxiectoína
La detención del sitio de escisión del plásmido y el ADN lambda por endonucleasas de tipo II	Hidroxiectoína
Protección del daño oxidativo de proteínas (LDH)	Hidroxiectoína
Estabilización del complejo LRP y H-NS en la regulación de la transcripción	Ectoína
El aumento de la estabilidad y la temperatura de fusión de la RNasa A	Hidroxiectoína
Protección de LDH contra el calor, urea y congelación-descongelación	Hidroxiectoína y ectoína
Protección de la membrana celular contra el agente tensioactivo	Ectoína
Optimización de las condiciones de cristalización de proteínas para la cristalografía de rayos X	Ectoína
Usos terapéuticos potenciales	
Protección contra la inflamación pulmonar inducida por neutrofílica nanopartícula	Ectoína
Protección intestino delgado de isquemia fría y posterior calentamiento en lesión por reperfusión in vitro	Ectoína
Protección de las células neuronales de la toxicidad inducida por poliglutamina en la enfermedad de Machado-Joseph	Ectoína
La inhibición de la agregación y la neurotoxicidad de beta-amiloide del Alzheimer	Hidroxiectoína y ectoína
La inhibición de la formación de amiloide insulina	Ectoína
Protección contra la proteólisis de zimógenos	Ectoína
Inhibir la unión de un péptido que contiene arginina-Tat-similares, para RNA TAR del VIH in vitro	Hidroxiectoína
Inhibir la agregación y la neurotoxicidad del péptido prión 106-206	Ectoína
La estabilización de los vectores retrovirales para la terapia génica	Hidroxiectoína
Protección celular	
La protección contra la desecación de <i>Pseudomonas putida</i>	Hidroxiectoína
La protección contra la desecación de <i>E. coli</i>	Hidroxiectoína
Protección contra la encapsulación de plástico de <i>E. coli</i> y <i>P. putida</i>	Hidroxiectoína
Promover el efecto sobre la fermentación del etanol por <i>Zymomonas mobilis</i>	Ectoína
Implicado en la desintoxicación de fenol en <i>Halomonas</i>	Ectoína
Preservación de la actividad respiratoria en <i>Escherichia coli</i> (in vivo)	Ectoína
Osmoprotección de bacterias de ácido láctico	Ectoína
Inducción de la termotolerancia en <i>E. coli</i>	Hidroxiectoína
Estabilización de <i>E. coli</i> durante el secado y almacenamiento	Hidroxiectoína y ectoína
Tolerancia a la sal en plantas de tabaco transformadas con ectoína	Ectoína
Tolerancia a la sal en las células de las plantas de tabaco transformadas con ectoína	Ectoína
Protección de la piel	
Protección anti envejecimiento de la piel in vivo en seres humanos	Ectoína
Protección in vivo contra la deshidratación en la piel y en modelos in silico para aclararla	Ectoína
En protección in vitro contra el envejecimiento de la piel en los seres humanos, la protección del ADN mitocondrial y la inhibición de la respuesta inflamatoria mediada por ceramidas.	Ectoína
La inducción de proteínas de choque térmico y mediar en la respuesta proinflamatoria en los queratinocitos humanos	Ectoína
En fotoprotección in vitro de la luz visible	Ectoína
En el agente humectante de la piel humana in vivo	Ectoína
Protección in vivo de la degradación inducida por radiación UV en las células Langerhans	Ectoína
Inhibición in vitro de la formación de glóbulos rojos y en la protección de células de Langerhans in vivo	Ectoína
Bloqueo de la liberación de la ceramida inducida por UV en los queratinocitos humanos	Ectoína
Protección in vivo contra la deshidratación en la piel por los tensioactivos	Ectoína

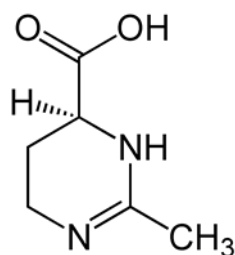


Figura 6: Estructura química de la ectoína (22).

Sus principales usos son como estabilizador de enzimas, ácidos nucleicos y complejos de ADN-proteínas, además de ser utilizado en la industria cosmética como protector ante los daños que la radiación UV produce en el ADN de las células de la piel (5) (20). Los usos que hasta ahora se han descubierto para este compuesto se recogen en la Tabla 1.

La producción de este compuesto por síntesis química conlleva numerosas etapas, las cuales reducen el rendimiento global, además de aumentar el número de subproductos, aumentando las etapas de separación. Las principales ventajas del uso de microorganismos para este fin son una mayor selectividad y rendimiento, además de evitar el uso de disolventes orgánicos y químicos tóxicos, haciéndolo más respetuoso con el medio ambiente. Además, a pesar de los costes en micronutrientes y mantenimiento de las condiciones de crecimiento, éste método de producción conlleva menores costes globales (22).

Las bacterias utilizadas en la producción de ectoína de manera industrial son *Halomonas elongata* y *Brevibacterium epidermis* a través de un proceso denominado “bio-milking” (Figura 7). Este proceso se basa en la síntesis de ectoína y su expulsión al medio mediante la respuesta de la bacteria a choques osmóticos. En este proceso se crece la bacteria de interés hasta una determinada concentración en un reactor “fed-batch” con una fuente de carbono tipo glucosa. El crecimiento se puede realizar en un medio con 0% NaCl o directamente con una determinada concentración salina. Si se crece en un medio sin sales, el primer paso es añadir NaCl para que la ectoína sea sintetizada. Tras esto se sustituye el medio por agua destilada o medio sin sal para la excreción del soluto compatible. Los cambios de medio se pueden hacer por filtración cruzada de tal manera que las células queden retenidas, o por centrifugación (22) (23). La extracción del producto (ectoína) se realiza de manera diferente para cada una de las bacterias. En el caso de *Halomonas elongata* se realiza a través de “downshock”, es decir, al disminuir bruscamente la concentración salina del medio la ectoína es excretada. Para el caso de *Brevibacterium epidermis* se realiza también un downshock con agua seguido de una extracción con etanol. En ambos casos, la purificación se realiza a través de técnicas cromatográficas con resinas de intercambio

catiónico o de retardo de iones. En el caso de utilizar disolventes orgánicos en la etapa de extracción, además de transportar numerosos contaminantes como sales, proteínas celulares y metabolitos, se requieren etapas de purificación adicionales (centrifugación/filtración), lo cual aumenta los costes (22). Uno de los problemas que conlleva la utilización de estas cepas es su incapacidad de producir ectoína extra-celular, por lo que la concentración total de ectoína es la misma que de ectoína intracelular, lo que hace necesario alcanzar altos niveles de concentración de biomasa para conseguir altos rendimientos. Además, la relación de ectoína intracelular sintetizada es directamente proporcional a la concentración salina del medio, de manera que para alcanzar altos rendimientos de producción son necesarias altas concentraciones de NaCl, lo cual aumenta los problemas de corrosión, además de disminuir las tasas de crecimiento, aumentando de este modo los tiempos necesarios para alcanzar altas concentraciones de biomasa (120 h en el caso de *H. elongata* y 100 h en el de *B. epidermis*). La forma de eliminar este problema es el uso de cepas o el desarrollo de estrategias que permitan la excreción natural de ectoína (24).

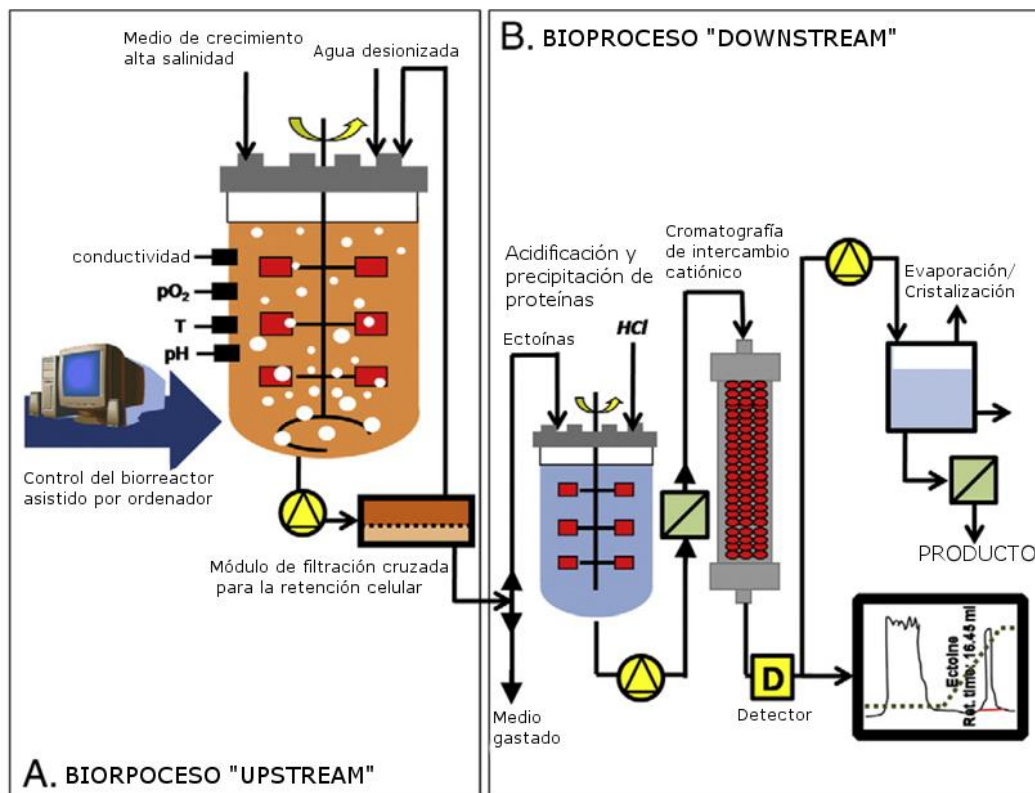


Figura 7: Diagrama general de la producción biológica de ectoína a nivel industrial (22).

Por otro lado, una alternativa para hacer que este proceso sea más rentable es la búsqueda de fuentes de carbono más baratas. En este sentido, el metano podría utilizarse como fuente de carbono a coste cero mediante el uso de metanotrofos, además de poder ser utilizado como método de

biorremediación, ya que, como se ha mencionado antes, el metano es un GEI (5) (20). La eficacia del proceso, y por tanto la rentabilidad, también se verían aumentadas con el uso de cepas capaces de expulsar la ectoína al medio de manera natural, de tal modo que la concentración de ectoína total en el caldo de cultivo sea independiente de la concentración salina del medio, pudiendo así disminuir los problemas de corrosión anteriormente mencionados (24).

Hasta ahora se conoce un único metanotrofo capaz de sintetizar y acumular ectoína como soluto compatible ante la variación osmótica del medio, *Methylobacterium alcaliphilum* 20 Z. Este metanotrofo fue aislado por primera vez en los lagos de sosa de Tuva en Asia Central por el equipo de Trotsenko en 1997 (25) (26). Este equipo de genetistas descubrió que *M.alcaliphilum* presentaba los genes implicados en la síntesis de ectoína en el operón ectABC así como el gen adicional ask, el cual codifica la aspartoquinasa, lo que significaba que esta bacteria era capaz de expresar una ruta enzimática muy similar a la empleada por los heterótrofos halófilos / halo-tolerantes, consistente en tres enzimas específicos: ácido diaminobutírico (DABA) aminotransferasa (EctB), DABA acetiltransferasa (EctA), y ectoína sintasa (EctC) (27) (28) (Figura 8). Esto representaba una nueva puerta de posibilidades para el tratamiento del metano vinculado a la producción de una sustancia de alto valor, sin embargo, los estudios realizados fueron enfocados desde un punto de vista bioquímico y genético y nadie probó su obtención unida al tratamiento biológico del metano con vistas biotecnológicas.

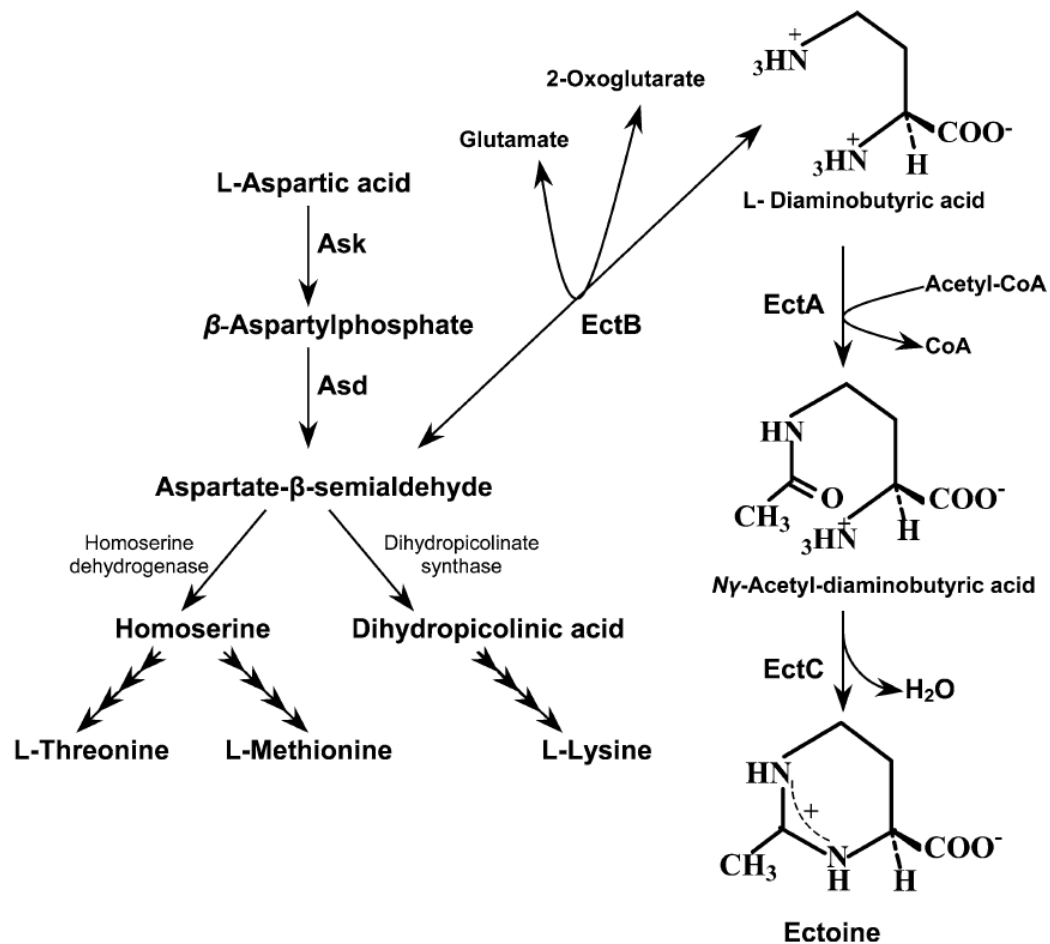


Figura 8: Ruta metabólica de la biosíntesis de la ectoína en *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z (29).

Hasta ahora, esta bacteria se ha ensayado en un estudio biotecnológico pionero en lote realizado por el grupo de Tecnología del Medio Ambiente del Dpto. de Ingeniería Química de la Universidad de Valladolid. En este estudio se usaron diferentes condiciones y se estudió la eliminación de metano, unida tanto a la producción de ectoína intra-celular como a la de extra-celular, demostrándose que esta bacteria era capaz de eliminar metano vinculado a la producción de ectoína. Gracias a este estudio se conoce que la mayor concentración de ectoína intracelular sintetizada por *M. alcaliphilum* 20Z se obtiene cuando el medio tiene un 6% de NaCl, sin embargo su síntesis no se ve influenciada por la temperatura o la concentración de Cu^{2+} . Por otro lado, este estudio también ha dado a conocer que la excreción de ectoína extracelular se ve influenciada por la concentración de Cu^{2+} en el medio, promoviendo el cobre la excreción de la ectoína intra-celular hacia el caldo de cultivo (1).

Hasta este momento no ha sido estudiada la eliminación de metano y producción de ectoína, tanto intra-celular como extra-celularmente, de manera simultánea en continuo con *Methylobacterium alcaliphilum* 20 Z, lo



cual constituye uno de los objetivos del presente estudio, observándose de este modo la viabilidad técnica y económica de biorreactores de alto rendimiento.

Tampoco ha sido estudiada hasta ahora la viabilidad de *M. alcaliphilum* 20Z en la producción de ectoína por choques osmóticos, constituyendo esta parte del estudio un primer paso en la investigación de su viabilidad tanto económica como técnica en la producción de ectoína a través del proceso de bio-milking.

Por último, dada la alta sensibilidad observada en *M. alcaliphilum* 20Z a la agitación a altas velocidades y su baja velocidad de crecimiento, el presente estudio también se ha marcado como objetivo la búsqueda de otros metanotrofos capaces de sintetizar ectoína, con especial interés en aquellos que sean capaces de sintetizar ectoína extra-celular.

2. MATERIALES Y MÉTODOS



2.1 Químicos y medio mineral salino

El medio mineral salino (MMS) utilizado en todos los experimentos es una modificación del medio de Brunner preparado acorde con Kaluyzhnaya y col. (2008) con un pH final de 9. El NaCl y $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fueron añadidos al MMS en diferentes concentraciones según cada experimento. Todos los químicos y reactivos fueron adquiridos de Panreac (Barcelona, España) con una pureza superior al 99.0%. EL metano (CH_4) fue adquirido de Abello-Linde, S.A. (Barcelona, España) con una pureza superior al 99.5%.

Descripción detallada del medio salino:

NaCl	Variable según el experimento
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
KNO_3	1 g
Solución micronutrientes	10 ml
Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000 ml

Solución de micronutrientes:

EDTA	5.00 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.00 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
Na_2MoO_4	0.03 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03 g
H_3BO_3	0.03 g
Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000 ml

Sales para la regulación del pH. Éstas son añadidas a 1 L del medio estéril a temperatura ambiente.

NaHCO_3 (1M)	50.0 ml
Na_2CO_3 (1M)	5.0 ml
Buffer fosfato	20.0 ml

Buffer fosfato:

KH_2PO_4	7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15 g
Agua destilada tipo II	Enrasar a 500 ml

Todo el material y el medio se esterilizan en autoclave (121°C, 1.18 atm, 15 min). Las sales se esterilizan por separado para evitar precipitación. El pH se ajusta finalmente a 9 para obtener un medio alcalino.

2.2 Inóculos utilizados

Se usaron dos tipos de inóculos:

- A) El inóculo de los reactores y del experimento en lote para *bio-milking*.
- Una cepa pura, consistente en *Methylobacterium alcaliphilum* 20 Z, comprada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) (Leibniz-Institut) para uso académico. Se trata de un organismo metanotrofo de tipo I, halófilo, alcalino tolerante, capaz de sintetizar ectoína en presencia de NaCl (26) (1). Fue comprado como un cultivo líquido concentrado estéril que se conservó en tubos Eppendorf de 1 ml con un 30% de glicerol a -80 °C. Para la preparación de los inóculos se usaron botellas de 120 ml estériles cerradas con septum de butilo estancos para gases y tapas metálicas. MMS fue añadido hasta un volumen de 60 ml y un 10 % (v/v) de la cepa pura fue añadida a cada inóculo. Parte del aire del espacio de cabezas de cada botella de crecimiento de inóculo fue reemplazado por metano (aproximadamente 50% v/v). El crecimiento se realizó en una incubadora a 25°C y 200 rpm hasta obtener una absorbancia de 0.200 (medida por densidad óptica (DO)).
- B) Experimento en lotes para el enriquecimiento y posterior aislamiento de metanotrofos capaces de sintetizar ectoína.
- Lodos frescos activados aerobios de una planta de desnitrificación-nitrificación de tratamiento de aguas residuales “El Mazo” (Cantabria, España). En botellas de 1200 ml de cuello estrecho se inoculó 10 ml de lodo fresco (1.8 g l⁻¹ medidos como sólidos suspendidos totales (SST)) en 190 ml de MMS (5% v/v) y se sellaron con septum de butilo y tapones de rosca.
 - Estiércol fresco de vaca (Cantabria, España). Se inoculó 10 ml de estiércol (100 mg ml⁻¹) en 190 ml de MMS (5% v/v) en botellas de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo y tapones de rosca.
 - Lodo salado (Bolivia, América del Sur) y salar (Bolivia, América del Sur). Ambos inóculos fueron disueltos en 200 ml de MMS en botellas de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo y cerradas con tapones de rosca. Se desconoce la concentración.

- Consorcio de *Methylomicrobium*, *Methylomonas* y *Methyloccocus* (0.9 g l^{-1}) crecidos a alta concentración de cobre. Se inoculó 1.5 ml de este consorcio con una absorbancia de 0.4 en 200 ml de MMS (0.2% v/v) en botellas de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo y tapones de rosca.
- Laguna de estabilización procedente de la zona de descarga aerobia de un reactor anaerobio (Almazán, Soria, Castilla y León, España). Se inocularon 10 ml en 190 ml de MMS (5% v/v) en botellas de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo y tapones de rosca. Se desconoce la concentración.

2.3 Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z en diferentes condiciones de sal

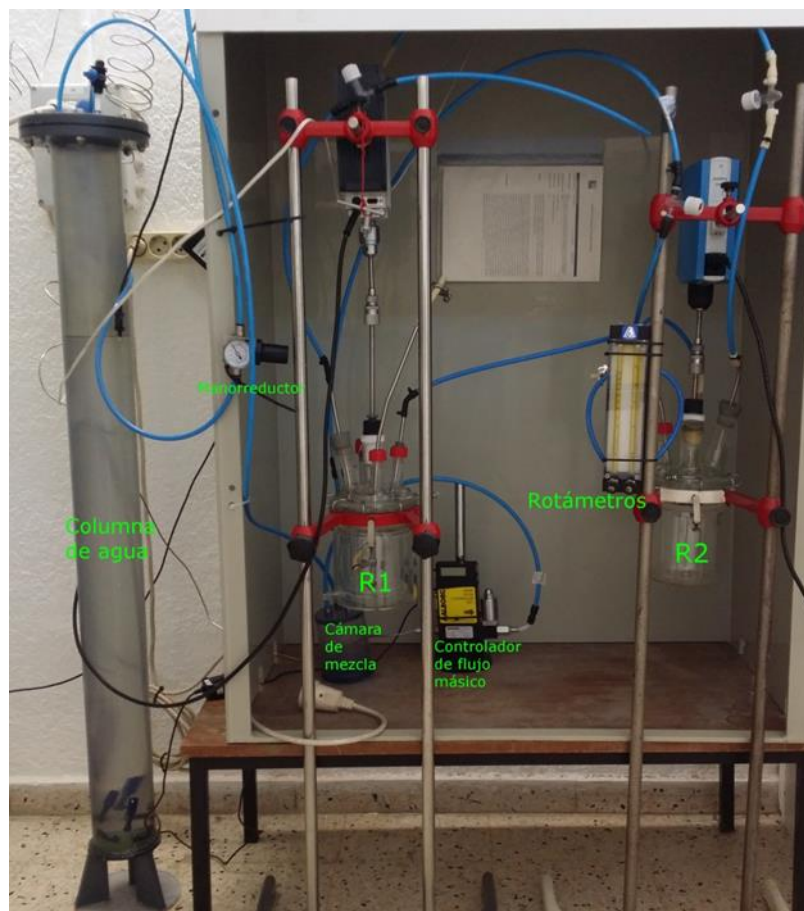


Figura 9: instalación con los dos reactores utilizados en el experimento.

2.3.1 Inoculación

El reactor fue inoculado con un 5% (v/v) del inóculo A) mencionado en el apartado anterior.

2.3.2 Operación

Como se puede ver en la Figura 9, se operaron dos reactores en continuo de tanque agitado y mezcla perfecta de 1 L (Afora S.A., España). La corriente gaseosa de alimentación usada fue de 4% de CH₄ (concentración típica encontrada en vertederos, minas de carbón, tanques de almacenamiento de estiércol y explotaciones de ganado vacuno y por debajo del límite de explosividad (17)). El flujo se fijó con el rotámetro de la Figura 9 en 33 ml/min. El metano se introdujo en los reactores a través de difusores de acero inoxidable porosos de 10 µm situados en el fondo de cada reactor. La corriente de alimentación se obtuvo por la mezcla, en una cámara de mezcla de gases, de una corriente de CH₄ puro procedente de la línea de metano del laboratorio (desde una bombona) y controlado por medio de un controlador de flujo másico (Aalborg, EE.UU.) con un flujo de aire pre-humidificado (al aire se le hace pasar por una torre llena de agua antes de su mezcla con el CH₄). Este flujo y este volumen de reactor dieron como resultado un tiempo de residencia del gas de aproximadamente 30 minutos. La homogenización del gas y la biomasa en el líquido se consiguió por agitación vertical a 300 rpm. La temperatura se mantuvo a 25 °C durante todo el experimento. El intercambio de líquido del reactor se realizó de manera manual a través de la extracción de 500 ml de caldo de cultivo del reactor con una jeringa de 100 ml desde el tubo toma-muestras (Figura 10) y la devolución de la biomasa al reactor, previamente centrifugada (10000 rpm, 4°C, 15 min) y resuspendida en 500 ml de MMS fresco. De esos 500 ml, 400 ml se usaron para la devolución de biomasa (resultando por tanto en una velocidad de dilución (D) de aproximadamente 0.043 d⁻¹, ya que la extracción se realizó tres veces por semana). Tras centrifugar, el sobrenadante es desechado y la biomasa resuspendida en medio fresco, de tal modo que se renuevan los micronutrientes, se mantiene el nivel de líquido dentro del reactor y se evita la variación del pH dentro del reactor por evaporación de agua y precipitación de las sales. Los restantes 100 mL del caldo de cultivo se usaron para realizar análisis de SST (20 mL), determinar el pH (60 mL), medir la absorbancia del caldo de cultivo por DO (2 mL), y determinar ectoína intracelular y ectoína extracelular (18 mL)

La diferencia entre el modo de operación de ambos reactores se basó en la utilización de diferentes concentraciones de sal, 3% y 6% en el reactor R1 y en el reactor R2, respectivamente. La concentración de Cu²⁺ utilizada en este experimento fue de 25 µM (se utiliza en el medio una solución de micronutrientes con un contenido de 50 g de CuCl₂ · 5H₂O en lugar de 0.1 g

para conseguir esta concentración) ya que, como se ha mencionado en la introducción según análisis anteriores, mayores concentraciones de cobre parecen incrementar la excreción de ectoína intracelular en esta bacteria.

Tabla 2: condiciones de operación de ambos reactores.

	Reactor 1	Reactor 2
Flujo de gas (ml/min)	33	33
% CH ₄ (17)	4	4
Rpm (17)	300	300
%NaCl (1)	3	6
Cu ²⁺ (1)	25 μM	25 μM
T (°C) (1)	25	25

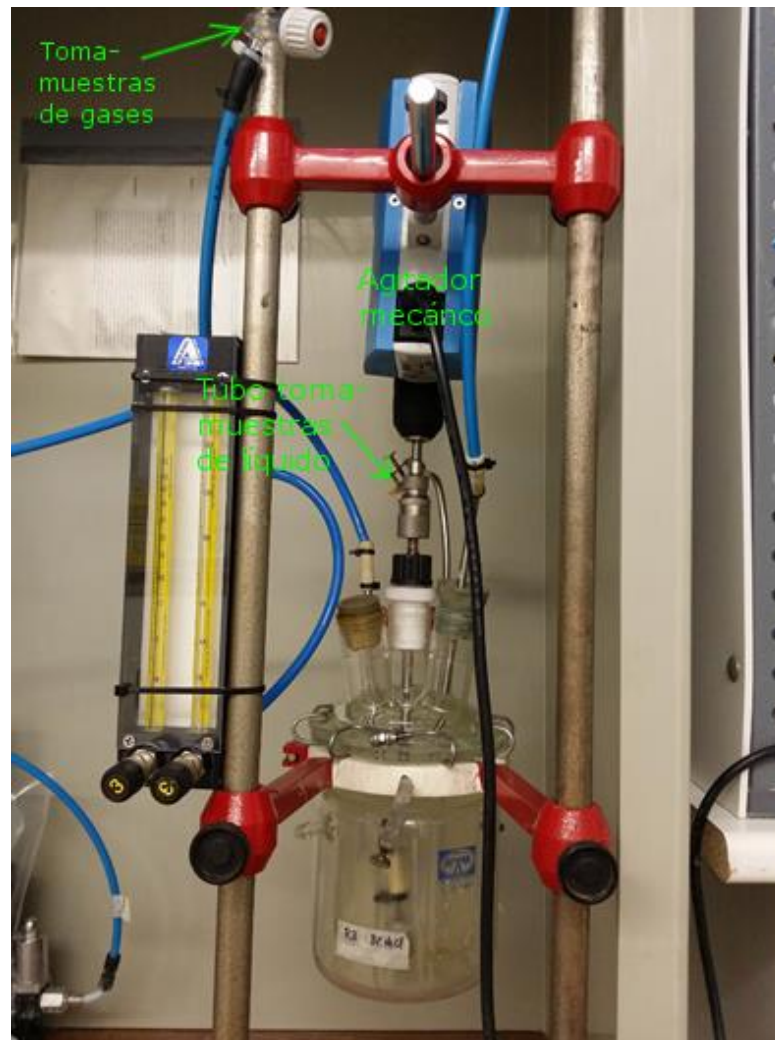


Figura 10: reactor continuo de tanque agitado para el tratamiento de una corriente de aire con un 4% de metano.

2.4 Experimento en lote para el enriquecimiento de metanotrofos capaces de producir ectoína.

2.4.1 Inoculación

Se procedió a la inoculación en condiciones estériles de botellas de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo para gases y tapones de rosca con los inóculos mencionados en el apartado B). Cada botella se rellenó con 190 mL de MSM a dos concentraciones de sales diferentes, 3 y 6 % NaCl, y se añadió el inóculo respectivo (10% v/v).

2.4.2 Operación



Figura 11: botellas con distintos inóculos para la especialización de bacterias.

El experimento se realizó en lote, de tal modo que se enriqueciesen metanotrofos capaces de sobrevivir en un medio con alto estrés salino y halotolerantes. La agitación a 600 rpm se llevó a cabo con agitadores magnéticos tal y como puede verse en la Figura 11, y la temperatura se mantuvo a 25°C.

El enriquecimiento de metanotrofos a partir de los cultivos mixtos se realizó añadiendo al espacio de cabezas (1000 ml) 80 ml de CH₄ (8%). Por análisis de CO₂, CH₄ y O₂ en el cromatógrafo de gases GC-TCD, se controlaron los niveles de estos gases. Cuando el metano era totalmente consumido se llevaban a cabo reemplazos añadiendo O₂ y CH₄ puro para mantener el crecimiento metanotrófico. Ambos gases se introdujeron con jeringas

herméticas de gas desde bolsas tedlar herméticas dotadas de septum y rellenas previamente desde bombonas de los gases específicos. El procedimiento se repitió para asegurar el enriquecimiento metanotrófico durante siete ciclos de crecimiento. En el ciclo 8, se procedió al análisis de metanotrofos productores de ectoína controlando diariamente tanto la eliminación de CH_4 y la producción de CO_2 , como la producción de ectoína intracelular y extracelular. Una vez finalizado el ciclo 8, en los casos en los que se detectó ectoína en los análisis, nuevas botellas de 1200 mL de cuello estrecho, selladas con septum de butilo para gases y tapones de rosca, fueron inoculadas utilizando como inóculo el caldo de cultivo enriquecido del ciclo 8. Estas nuevas botellas se inocularon con un 5% (v/v), 190 ml de MMS y 10 ml de inóculo de las botellas anteriores y se realizaron análisis diarios de crecimiento de la biomasa, producción de ectoína y consumo de metano durante todo un ciclo de consumo del metano de cabezas (nuevamente un 8%).

2.5 Experimento “Bio-milking”

2.5.1 Inoculación

Este experimento se realizó en tres botellas (réplicas) de 1200 ml de cuello estrecho selladas con septum de butilo para gases y tapones de rosca. En cada una de las botellas fueron inoculados 20 ml de caldo de cultivo (inóculo de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20 Z, crecido en incubadora descrito en el apartado A) de inóculos) en 400 ml de MMS con un 0% de NaCl. La biomasa se creció en estas botellas durante 28 días antes de comenzar el experimento, tras los cuales se realizó un análisis de SST y DO para analizar la cantidad de biomasa presente en cada una de las botellas al inicio del experimento.

2.5.2 Operación

En este experimento en lotes al espacio de cabezas (780 ml) se le añadió 80 ml de CH_4 , quedando una concentración de CH_4 10% v/v de este gas en cada lote. La agitación a 600 rpm nuevamente se consiguió con agitadores magnéticos y la temperatura se mantuvo a 25°C.

El experimento se realizó en un total de tres series, cada una consistente en 24 horas de experimentación. Al comienzo de la primera serie, la biomasa fue centrifugada en tubos falcon estériles de 50 ml a 5000 rpm durante 5 minutos y resuspendida en 400 ml de MMS con 6% NaCl, realizándose análisis de DO, ectoína intracelular y extracelular a las 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 24 horas, para lo cual a cada una de esas horas se extrajeron 10 ml del caldo de cultivo. En la segunda serie se centrifugó nuevamente la biomasa en tubos falcon estériles de 50 ml a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspendió esta vez en 400 ml MMS con 0% NaCl, realizándose nuevamente la misma

secuencia de toma de muestras durante las siguientes 24 horas. La tercera serie consistió en el crecimiento de biomasa a 0% NaCl para mantener la viabilidad y actividad celular normal. Estas series se repitieron un total de tres ciclos durante 9 días (216 horas). De este modo se analizó la síntesis de ectoína y su expulsión al medio en las distintas estrategias de operación.

2.6 Análisis realizados

2.6.1 Monitorización de las concentraciones de CO₂ y CH₄ en la alimentación y la salida

Las concentraciones de CO₂, CH₄ y O₂, tanto en la corriente de entrada al reactor como en la de salida, se determinaron en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, EE.UU.) equipado con un CP-Molsieve 5A (15 m x 0,53 μm x 15 μm) y un CP-PoraBOND Q (25 m x 0,53 μm x 10 μm) de columna. Las temperaturas del horno, inyector y del detector se mantuvieron a 45 °C, 150 °C y 200 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a 13,7 ml min⁻¹. (1)

Estos datos fueron utilizados en el experimento de los reactores en continuo para estudiar la capacidad de eliminación de CH₄ (CE, g h⁻¹ m⁻³), la eficiencia de eliminación de CH₄ (EE, %) y la producción total de CO₂ (PT CO₂, g h⁻¹ m⁻³), parámetros comúnmente utilizados en el estudio de reactores en continuo. La manera de determinar estos parámetros es la representada en las siguientes fórmulas (30):

$$CE = \frac{([CH_4]_e - [CH_4]_s) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EE = \frac{[CH_4]_e - [CH_4]_s}{[CH_4]_e} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$PT CO_2 = \frac{([CO_2]_e - [CO_2]_s) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo:

- [CH₄] = concentración de metano (e = a la entrada; s = a la salida) en g m⁻³
- Q = flujo de gas a tratar en m³ h⁻¹
- V = volumen del reactor en m³
- [CO₂] = concentración de dióxido de carbono (e = a la entrada; s = a la salida) en g m⁻³

2.6.2 Medida de SST

Los SST se midieron de acuerdo a los métodos estándar (31) (1).

2.6.3 Medida de la absorbancia del cultivo por DO

Las mediciones de la densidad óptica del medio se realizaron a través de la medida de la absorbancia a 650 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 UV / Vis (Shimadzu, Japón) (1). Las medidas de DO y SST han sido correlacionadas a través de una recta de calibración mostrada en los anexos.

2.6.4 Análisis de ectoína intracelular

Para la determinación de la ectoína intracelular, se procedió a la rotura celular, tanto física, como químicamente, y a la solubilización de la ectoína en el medio de extracción. Para ello, 1.5 ml del caldo de cultivo se centrifugaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 9000 g y 4°C durante 15 minutos, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se añadieron 25 ± 5 mg de perlas de zirconia /sílice de 0.1 mm de diámetro (BioSpec, España) y 1.5 ml de etanol al 70%. Tras esto, las células bacterianas fueron disrumpidas en un Mini-BeadBeater-16 (BioSpec, España) durante 1 min, dejando la suspensión toda la noche a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 9000 g y 4°C durante 15 minutos. Posteriormente fue filtrada con filtros de 0.22 μm (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. La concentración de ectoína se determinó por HPLC-UV en un HPLC 717 plus con muestreo automático (Waters, Bellefonte, EE.UU.) acoplado con un Dual UV λ absorbancia detector (Waters, Bellefonte, detector EE.UU.) a 210 nm utilizando un AQ LC-18 + columna C Supelcosil (Waters, Bellefonte, EEUU) y un C18 AQ + pre-columna (Waters, Bellefonte, EEUU). Como fase móvil se utilizó un tampón de fosfato consistente en 0.1824 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 2.15 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada tipo II, a 25 °C y un caudal de 1 ml min^{-1} . La cuantificación de ectoína se llevó a cabo realizando una curva patrón con distintas concentraciones conocidas de ectoína pura (comprada en sigma, Aldrich, USA) y las áreas detectadas por el HPLC, además se determinaron los límites de detección y cuantificación considerando aceptables valores de ratio de señal y ruido de 2:1 y 10:1 respectivamente (el límite de detección es la menor concentración de sustancia a analizar que es capaz de detectar el equipo, mientras que el límite de cuantificación es la mínima concentración de sustancia a analizar para la cual el equipo da un resultado fiable teniendo en cuenta el ruido). La concentración de ectoína intracelular específica (mg ectoína g biomasa^{-1}) se calculó utilizando la concentración de SST (g L^{-1}) del caldo de cultivo correspondiente.

2.6.5 Análisis de ectoína extracelular

Para la determinación de la ectoína extracelular se filtraron 1.5 ml del caldo de cultivo con filtros de 0.22 μm (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. El equipo utilizado para analizar la ectoína es el mismo que el utilizado para el análisis de la ectoína intracelular (1).

2.6.6 Tratamiento de datos

Los errores típicos de las muestras se han calculado como la desviación estándar de las repeticiones.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

Ecuación 4



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3. 1 Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z en diferentes condiciones de sal y con alta concentración de cobre

El objetivo de este apartado de la investigación era observar la eliminación de metano unida a la producción de ectoína tanto intra-celular como extra-celular, de manera continua, en dos reactores de tanque agitado, con un 3% (R1) y 6% (R2) de NaCl, e inoculados con *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z.

3.1.1 Producción de ectoína intra-celular

La evolución temporal de la producción de ectoína intracelular a lo largo de los 50 días de operación de ambos reactores se muestra en la Figura 12. Independientemente de la concentración salina, se observa un máximo de producción en los primeros 13 días. En el caso del reactor R1, al quinto día se detectó un máximo de producción de 53.48 ± 2.26 mg ectoína g biomasa⁻¹, mientras que en el R2, se observó una concentración máxima de ectoína mayor (73.98 ± 7.07 mg ectoína g biomasa⁻¹) coincidiendo con el octavo día de operación. Conforme avanza la operación de ambos reactores, la ectoína intra-celular se estabiliza en valores menores de 9.4 ± 1.4 mg ectoína g biomasa⁻¹ en el caso del reactor R1, y 37.18 ± 1.67 mg ectoína g biomasa⁻¹ en el caso del reactor R2, manteniéndose constantes las producciones en los últimos 29 días en el reactor R1, y en los últimos 17 días en el reactor R2. Probablemente las altas producciones iniciales se deban a un periodo de adaptación de las bacterias al nuevo medio salino. El estrés osmótico del medio salino activa los genes del operón *ectabc*, produciéndose altas cantidades de ectoína intra-celular en los primeros días (29). Dada la mayor salinidad del medio del reactor R2, esta adaptación es más prolongada en el tiempo. Cuando las concentraciones de ectoína llegan a un valor máximo, por encima del necesario para mantener el equilibrio osmótico entre el interior de la célula y el medio extra-celular, el exceso de ectoína es utilizado por la célula como fuente de carbono y energía (22) (26), manteniéndose los valores intra-celulares de ectoína estables en el tiempo.

Los valores de ectoína intra-celular obtenidos en el reactor R2 fueron mayores que los obtenidos en el reactor R1, tal y como cabía de esperar. Actualmente, con los valores obtenidos en estudios previos llevados a cabo en lotes (1) se observó que *M. alcaliphilum* 20Z era capaz de sintetizar un máximo de 66.9 ± 4.2 mg de ectoína g biomasa⁻¹ con un 4% de CH₄, 25°C, 0.05 μM de Cu²⁺ y un 6% de sales, valor algo inferior al máximo obtenido en el reactor R2. En las mismas condiciones pero con un 3% de sales, el máximo obtenido fue de 12.5 ± 3.9 mg de ectoína g biomasa⁻¹, valor muy inferior al obtenido en este estudio en el reactor R1 (1). Esto demuestra que la producción de *M. alcaliphilum* 20Z en continuo es mayor que en las botellas en lotes.

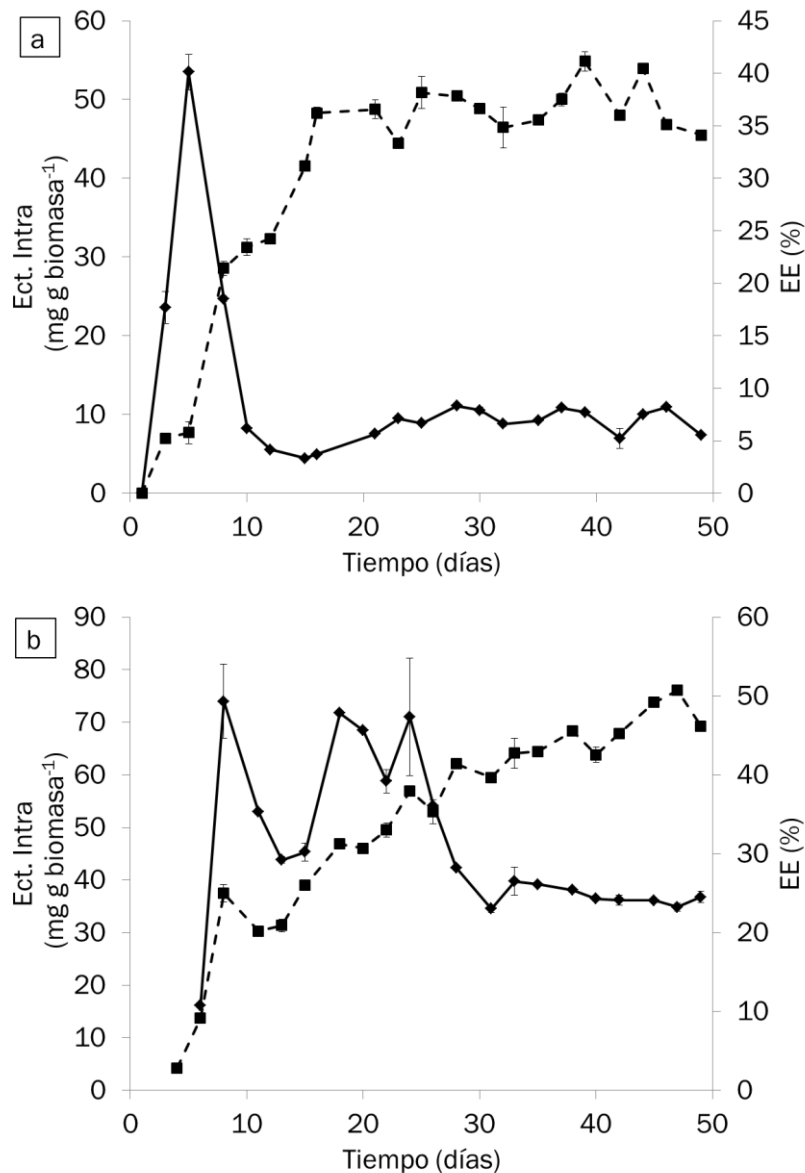


Figura 12: Evolución temporal de la ectoína intra-celular (línea continua, ◆) y de la EE (línea discontinua, ■) en los reactores a) R1 y b) R2. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

3.1.2 Producción de ectoína extra-celular

La evolución en la producción de ectoína extra-celular a lo largo de los 50 días de operación se muestra en la Figura 13. El máximo de ectoína extra-celular en el reactor R1 se observó a los 39 días con un valor de 8.67 mg L⁻¹, mientras que el máximo de ectoína extra-celular se detectó a los 47 días con un valor de 16.02 mg L⁻¹. La producción de ectoína extra-celular se estabilizó el día 28 en R1 con una concentración media de 5.88 ± 2.26 g L⁻¹ y el día 35 en R2 con una concentración media de 11.9 ± 2.8 g L⁻¹. Los valores obtenidos de ectoína extra-celular en el reactor R2 son mayores que los obtenidos en el reactor R1, como cabía esperar dada la mayor producción de ectoína intra-celular del reactor R2. A pesar de que *Methylomicrobium*



alcaliphilum 20Z no ha sido identificada como una cepa excretora de ectoína, según estudios previos la concentración de cobre parece tener una influencia en su excreción (1). Ambos reactores de este estudio, se operaron con una alta concentración de Cu^{2+} (25 μM), confirmando en ambos casos que el cobre tenía una influencia en la expulsión de la ectoína extra-celular. Además, se alcanzaron valores muy superiores a los conseguidos por Cantera y col. (2016) en ensayos en lotes, donde ante concentraciones de Cu^{2+} de 25 μM se consiguió un máximo de producción de ectoína de 0.7 ± 0.05 mg de ectoína L^{-1} . A diferencia de *M. alcaliphilum* 20Z, existen algunas bacterias que son excretoras naturales de ectoína. Un ejemplo es *Halomonas salina* DSM 5928, la cual ante un medio con pH 7 y un 3% de sales, con glutamato monosódico como fuente de carbono, acumula ectoína hasta un determinado valor, a partir del cual excreta la ectoína sintetizada sobrante a través de un transportador de membrana, manteniendo por tanto la concentración de ectoína intra-celular constante. Ante un 3% de sales, *H. salina* DSM 5928 es capaz de excretar 4.25 g L^{-1} de un total de 6.91 g L^{-1} de ectoína sintetizada (61.5%), mientras que ante un 6% de sales es capaz de excretar 2.63 g L^{-1} de un total de 6.85 g L^{-1} de ectoína sintetizada (38.39%) (24). A pesar de que los valores obtenidos con *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z no llegaron a los máximos que se observaron con una cepa excretora natural, el hecho de que las condiciones del medio puedan afectar a la expulsión de la ectoína de manera continua a valores constantes es un gran avance y se podría estudiar en varias cepas diferentes.

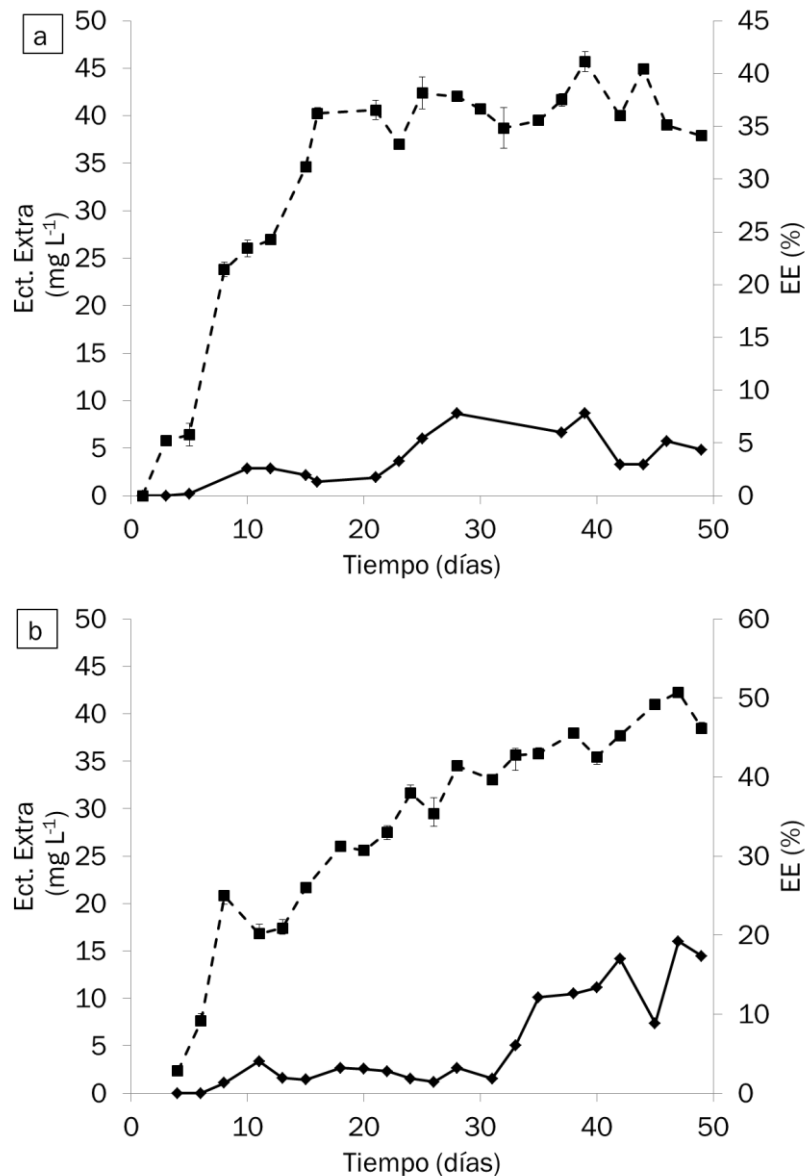


Figura 13: Evolución temporal de la ectoína extra-celular (línea continua, ◆) y de la EE (línea discontinua, ■) en los reactores a) R1 y b) R2. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

3.1.3 Parámetros operacionales

La capacidad de eliminación media del reactor R1 fue de $21.56 \pm 2.52 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ a partir del día 15 de operación, mientras que la capacidad de eliminación media del reactor R2 fue de $19.96 \pm 4.11 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ a partir del día 8 de operación (Figura 14). Según los análisis estadísticos, no se encontraron diferencias significativas entre las CEs detectadas en ambos reactores cuando estaban en estado estacionario. Como se ha mencionado anteriormente, ambos reactores están limitados por la transferencia del metano al medio líquido, debido a su baja solubilidad. En principio, las sales podrían afectar a la transferencia del metano y por lo tanto a su degradación,



sin embargo, este estudio parece demostrar que la CE no se ve influenciada por la salinidad del medio a largo plazo. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio respecto a la capacidad de eliminación en continuo de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z son menores que aquellos observados en otros estudios usando metanotrofos de tipo I. Estrada y col., 2015, llegaron a CE de $60.1 \pm 4.6 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$, López y col., 2013, a un máximo CE de $280 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ y Cantera y col., 2015, a CE del orden de $91.1 \pm 1.9 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ (17). Esto supone una desventaja de esta cepa para su utilización como método de eliminación de CH_4 (32) (8) (17).

La producción total de CO_2 media del reactor R1 fue de $20.7 \pm 5.1 \text{ g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ a partir del quinceavo día de operación, mientras que la producción total de CO_2 media del reactor R2 fue de $32.8 \pm 7.8 \text{ g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ a partir del octavo día de operación. Como se puede ver en la Figura 14, la evolución de la PT CO_2 a lo largo de los 50 días de operación sigue una tendencia similar a la de la CE.

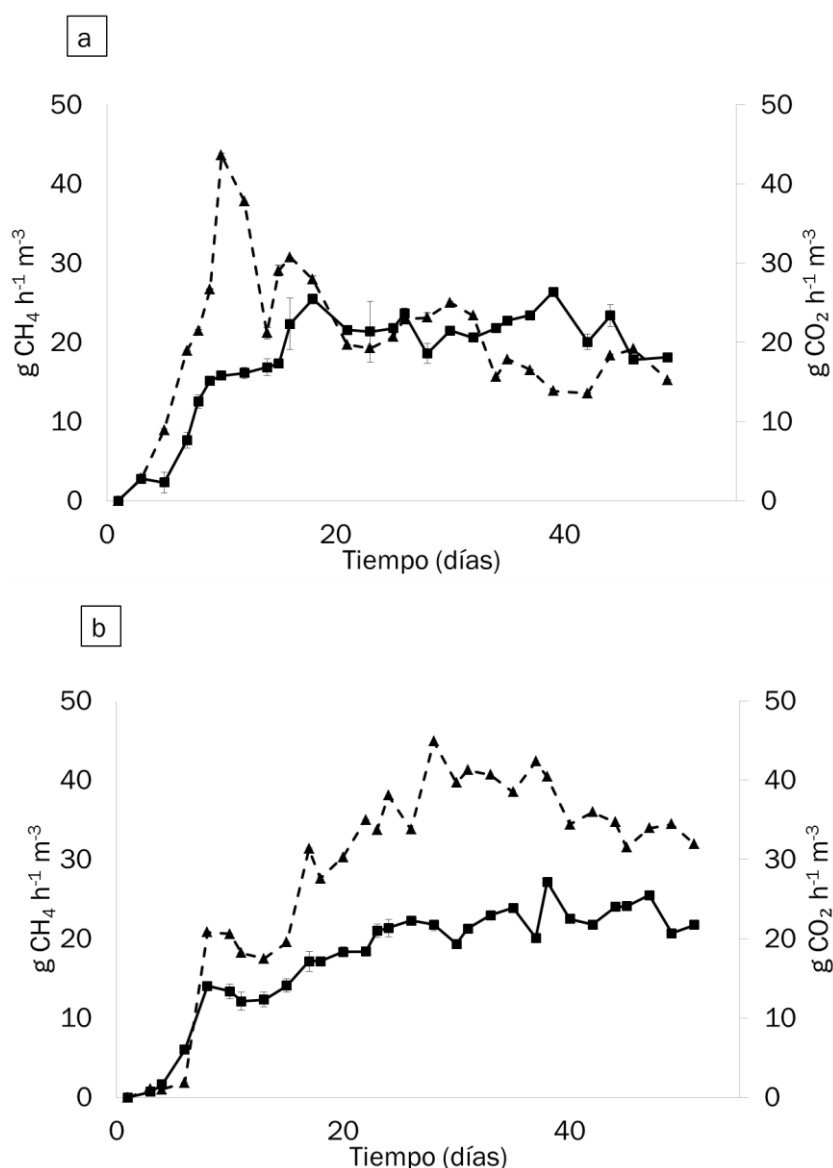


Figura 14: Evolución temporal de la CE (línea continua, ■) y PT CO₂ (línea discontinua, ▲) en a) el reactor R1 y b) en el reactor R2. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

La Figura 15 representa la evolución a lo largo de los 50 días de operación de la eficiencia de eliminación de ambos reactores. La eficiencia de eliminación media del reactor R1 fue de $36.6 \pm 2.6\%$ a partir del 15º día de operación, siendo de $37.2 \pm 9.1\%$ la del reactor R2 a partir del 8º día de operación. Viendo la Figura 15 se puede comprobar como a lo largo del tiempo, la EE sigue la misma tendencia que la CE y la PT CO₂.

La eficiencia de eliminación de *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, al igual que su capacidad de eliminación, no es muy alta en comparación al $57 \pm 1\%$ conseguido por Cantera y col. (2015) en el estudio de enriquecimiento de metanotrofos (17). La EE conseguida por Estrada y col., 2015, fue algo menor que la aquí obtenida ($12.0 \pm 0.5\%$ con una CE de 48.5 ± 7.2 g CH₄ h⁻¹ m⁻³),

llegando a un máximo de $39.8 \pm 0.9\%$ con una CE de $6.8 \pm 0.4 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ (32). La máxima EE obtenida por López y col., 2013, fue del 100%, correspondiendo a una CE de $80 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$. La EE del valor de CE antes mencionado de este estudio ($280 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$) fue del 50% (8).

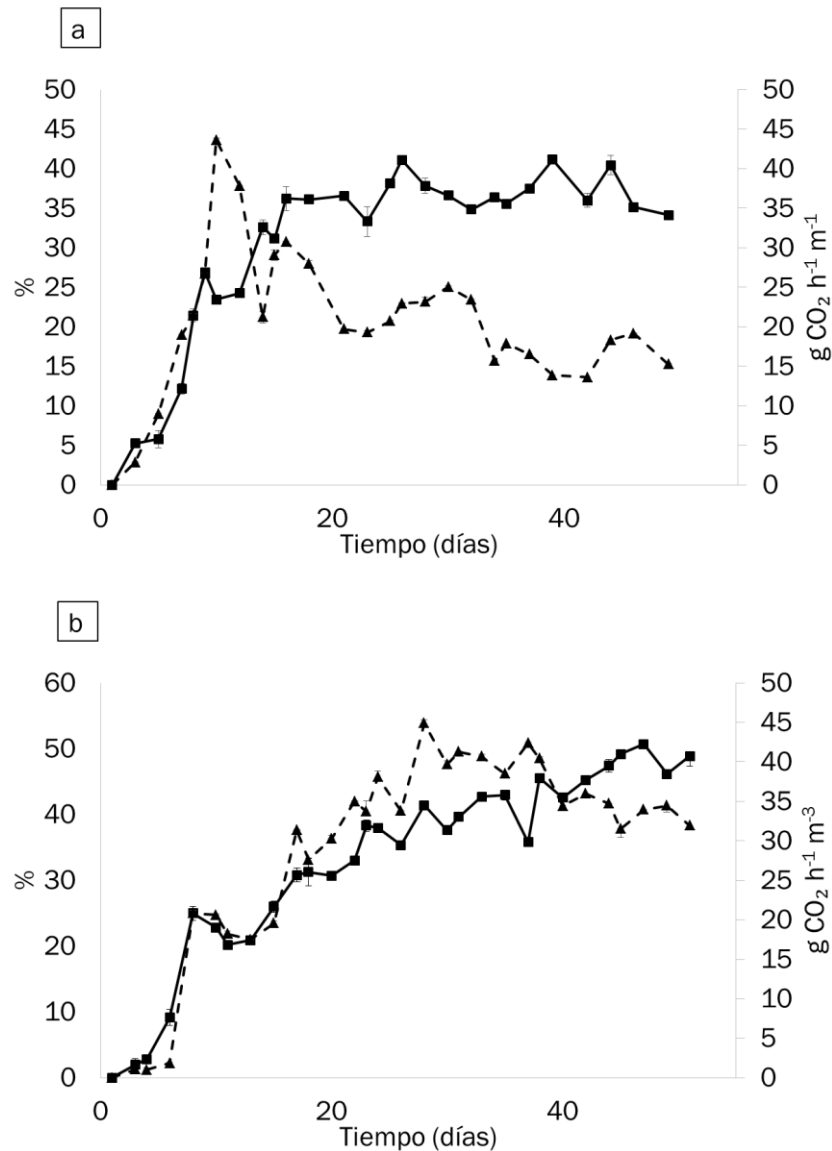


Figura 15: Evolución temporal de la EE (línea continua, ■) y PT CO₂ (línea discontinua, ▲) en a) el reactor R1 y b) en el reactor R2. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

3.2 Experimento en lote para el enriquecimiento de metanotrofos capaces de producir ectoína

Dada la baja eliminación de metano de *M. alcaliphilum* 20Z y su baja velocidad de crecimiento, el objetivo de este experimento era la búsqueda de otros metanotrofos capaces de sintetizar ectoína, con especial interés en aquellos que sean capaces de sintetizar ectoína extra-celular. Los inóculos de

estiércol fresco de vaca, y de lodos frescos activados aerobios de una planta de desnitrificación-nitrificación de tratamiento de aguas residuales “El Mazo”, fueron los únicos capaces de degradar metano. Estos dos inóculos además sintetizaron ectoína, por lo que se va a presentar a continuación los resultados obtenidos. El resto de inóculos no fue capaz de degradar metano por diversas posibles razones, las cuales se exponen a continuación:

- Consorcio de *Methylobacterium*, *Methylomonas* y *Methylococcus*: a pesar de tratarse de metanotrofos, éstos probablemente no sobrevivieron a las condiciones salinas del medio al no ser organismos halo-tolerantes y haber sido enriquecidos en un medio sin sales.
- Lodo salado y salar de Bolivia: la muestra no llegó en unas condiciones adecuadas. Además de esto es probable que no hubiera metanotrofos, puesto que el inóculo consistía en granos de sal, donde la salinidad es tal que sólo las arqueas halófilas pueden sobrevivir.
- Laguna de estabilización: la posible razón de no degradar metano es la competencia de supervivencia de los metanotrofos con otros tipos de microorganismos presentes, los cuales se alimentaban de la materia orgánica presente en el medio, puesto que a pesar de no disminuir la concentración de CH₄, la concentración de CO₂ sí aumentó. Además de esta posible causa también es probable que no hubiese metanotrofos halo-tolerantes.

3.2.1 Producción de ectoína

En la Figuras 16 y 17 se puede observar cómo en 3 de las 4 botellas aparece en los primeros días un máximo de ectoína intra-celular, al igual que ocurría en el reactor R1 del apartado anterior. De manera similar a lo que ocurría en el reactor R2 del apartado anterior, operado con *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z y un 6% de sales, la botella inoculada con estiércol fresco de vaca y un 6% de sales (Figura 16 b) presenta un periodo de estabilización mucho más prolongado en el tiempo debido a la mayor agresividad del medio. En el caso del inóculo de estiércol fresco de vaca (Figura 16), el máximo sintetizado con un 3% de sales es de 2.8 ± 0.08 mg ectoína g biomasa⁻¹, mientras que el máximo sintetizado con un 6% de sales es de 8.53 ± 0.04 mg ectoína g biomasa⁻¹, valor considerablemente mayor. En el caso del inóculo de lodos frescos activados hay diferencias significativas en la cantidad de ectoína sintetizada (Figura 17), siendo 9.02 ± 0.03 mg ectoína g biomasa⁻¹ la cantidad sintetizada con el MMS con 3% NaCl, y 12.95 ± 0.38 mg ectoína g biomasa⁻¹ la cantidad sintetizada con el MMS con 6% NaCl. Tras el máximo de ectoína detectado en 3 de las 4 botellas, los niveles de ectoína intracelular se estabilizan en niveles considerablemente inferiores. Los niveles aproximados en los que se estabilizan estas 3 botellas son: 1.82 ± 0.18 mg ectoína g biomasa⁻¹ en el caso de la botella con estiércol fresco de vaca y un 3% de

sales, 5.24 ± 1.08 mg ectoína g biomasa⁻¹ en la botella de lodos frescos activados y un 3% de sales, y 6.73 ± 1.50 mg ectoína g biomasa⁻¹ en la botella de lodos frescos activados y un 6% de sales.

Los niveles de ectoína detectados con estos inóculos son inferiores a los conseguidos en las mismas condiciones con *M. alcaliphilum* 20Z por Cantera y col. (2016) (1), lo cual implica que a pesar de haber encontrado metanotrofos capaces de sintetizar ectoína, éstos no son, a priori, más adecuados para el tratamiento de CH₄ y simultánea producción de ectoína que *M. alcaliphilum* 20Z (habría que comparar la producción de ectoína de las cepas puras).

Además de conseguir una menor síntesis de ectoína intra-celular que con *M. alcaliphilum* 20Z, se ha observado que estos inóculos no son capaces de sintetizar ectoína extra-celular, al menos en niveles suficientemente elevados como para ser detectados de manera fiable por el HPLC. A pesar de ello, como se ha mencionado antes, es posible que estos metanotrofos excretaran ectoína cambiando las condiciones del medio (1).

3.2.2 Degradación de metano

En la Figura 16 también se puede ver la concentración de CH₄ y CO₂ a lo largo del tiempo, apreciándose cómo 3 de las botellas tardan aproximadamente lo mismo en degradar el CH₄ y producir CO₂, mientras que la botella inoculada con estiércol fresco con un 6% de sales tarda mucho más tiempo en degradar, probablemente porque las bacterias presentes son muy sensibles a esta concentración salina, o porque hay muy poca biomasa presente halotolerante.

En el supuesto de que ambos enriquecimientos de estiércol fresco de vaca tuviesen el mismo tipo de bacterias, entonces, según lo observado en las Figuras 16 a) y b), éstas presentan una buena degradación de CH₄ en MMS con 3% NaCl, sin embargo, con 6% NaCl les cuesta mucho degradar. Esta diferencia de velocidad de degradación podría ser compensada por la mayor producción de ectoína ante un 6% de sales.

En las botellas con lodos frescos activados apenas hay diferencias en la degradación de CH₄ y producción de CO₂, al igual que se ha visto en la producción de ectoína intra-celular. Suponiendo que se trata del mismo tipo de bacterias en ambos enriquecimientos, éstas no presentan diferencias significativas ni para la degradación de CH₄, ni para la producción de ectoína como soluto compatible, por estos niveles de salinidad del medio.

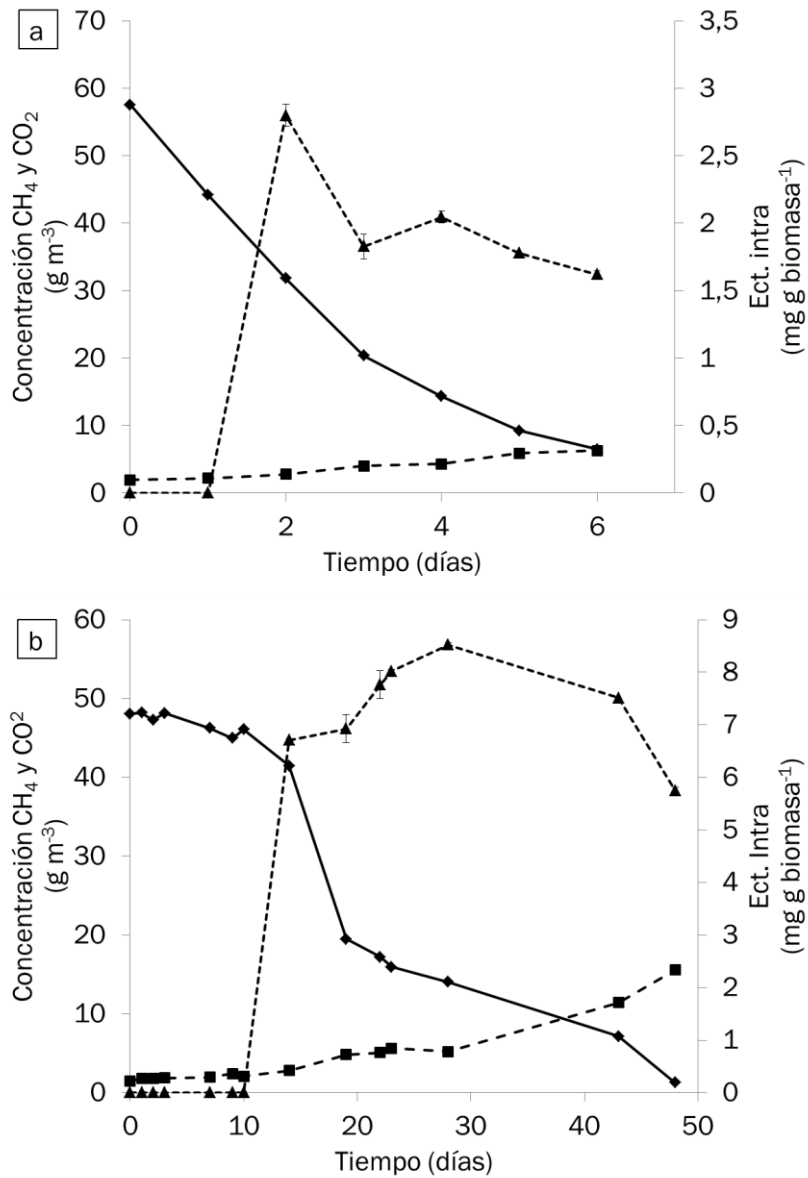


Figura 16: Evolución temporal de la concentración de CH₄ (línea continua, ♦) y CO₂ (línea discontinua, ■) y de la producción de ectoína intra-celular (línea de puntos, ▲) en las botellas inoculadas con estiércol fresco de vaca en MMS con a) 3% de NaCl, y b) 6% de NaCl. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

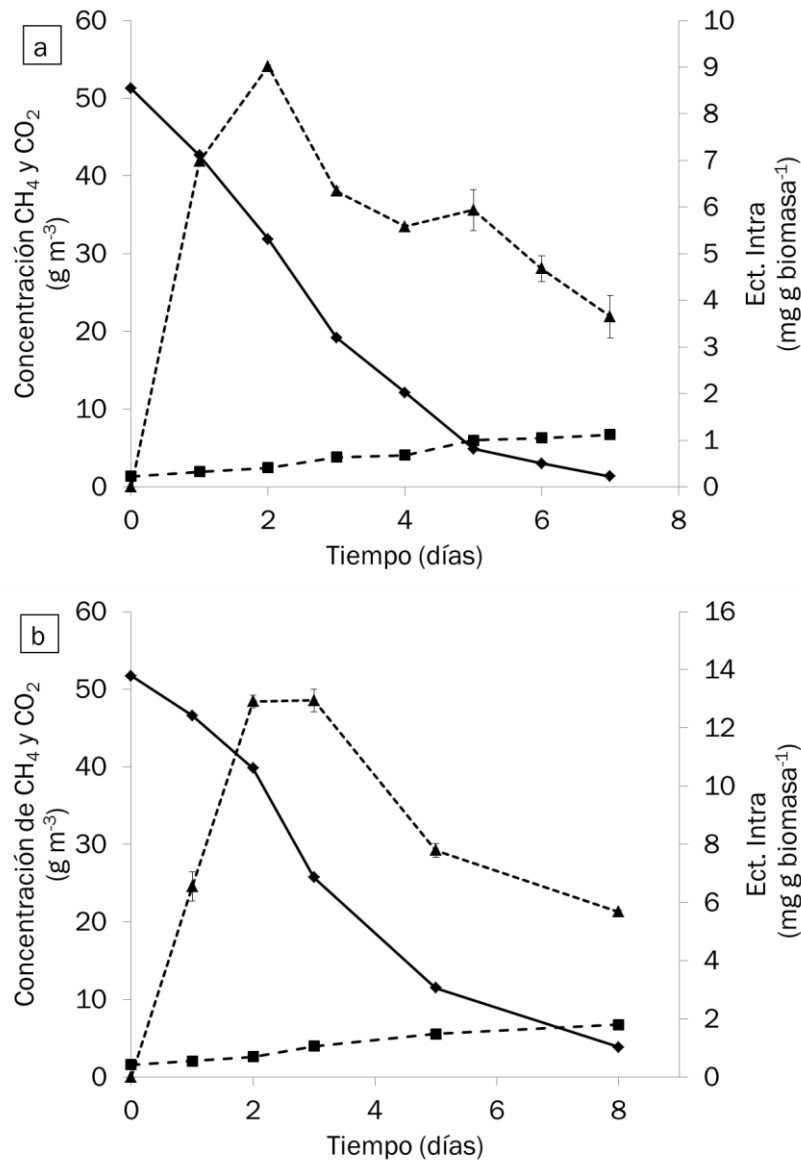


Figura 17: Evolución temporal de la concentración de CH₄ (línea continua, ◆) y CO₂ (línea discontinua, ■) y de la producción de ectoína intra-celular (línea de puntos, ▲) en las botellas inoculadas con lodos frescos activados en MMS con a) 3% de NaCl, y b) 6% de NaCl. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

3.3 Experimento “Bio-milking”

El objetivo de esta parte de la investigación era estudiar la viabilidad de *M. alcaliphilum* 20Z en la producción de ectoína por choques osmóticos, simulando el proceso industrial de *bio-milking*.

Para ello, tal y como se ha mencionado anteriormente, se realizó un estudio en tres botellas (réplicas) de 1200 ml.

3.3.1 Producción de ectoína

En la Figura 18 se observa cómo los máximos de ectoína intra-celular sintetizada por unidad de biomasa se dieron a las 24 horas de estar en

contacto con un 6% de concentración salina del medio. El máximo de ectoína intra-celular sintetizada se dio a las 97 horas, finalizando el primer periodo (6% NaCl) del segundo ciclo, con un valor de $3.62 \pm 0.55 \text{ mg L}^{-1}$ ($25.25 \pm 3.75 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$). Al retirar el medio salino, la ectoína es excretada al medio en forma de ectoína extra-celular, desapareciendo casi toda la ectoína en el interior de la célula ($0.26 \pm 0.31 \text{ mg L}^{-1}$ ($3.65 \pm 4.84 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$)). El máximo de ectoína extra-celular se dio a las 99 horas, al comienzo del segundo periodo, con un valor de $3.58 \pm 0.44 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que la máxima expulsión de ectoína se produjo a las 146 horas, al comienzo del primer periodo del tercer ciclo, expulsándose el 96.7% de la ectoína (Figura 19). Tras el nuevo reemplazo por medio con un 6% de concentración salina, la ectoína extra-celular es reincorporada al interior de la célula, pasando a ser ectoína intra-celular nuevamente. A la vez que se realizan los choques osmóticos la biomasa también aumenta, pero durante la centrifugación para el cambio de MMS se pierde una cantidad considerable de biomasa, consiguiéndose los máximos al final de los periodos de 6% de sales, pues es el periodo más lejano a cada centrifugación (Figura 18). El máximo de biomasa presente en el medio se da a las 24 horas, al final del primer periodo (6% NaCl) del primer ciclo, con un valor de $0.16 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$.

En la industria la producción de ectoína se realiza con la bacteria *H. elongata* DSM 142 mediante el proceso de *bio-milking*. *H. elongata* DSM 142 utiliza como fuente de carbono la glucosa, la cual es una fuente de carbono con un alto coste. Los choques osmóticos se realizan con un medio de un 15% de sales, salinidad mucho mayor que la utilizada en *M. alcaliphilum* 20Z, dando problemas de corrosión. La cantidad media de ectoína intra-celular conseguida con esta bacteria tras 15 reciclados en este tipo de proceso es de 155 mg de ectoína g de biomasa⁻¹, valor 6 veces mayor que el obtenido en este estudio con *M. alcaliphilum* 20Z. En el caso de *H. elongata* DSM 142 consigue excretar el 90% de la ectoína cuando se expone a un medio sin sales, mientras que la expulsión de ectoína al medio al cambiar a un medio con un 0% de sales en *M. alcaliphilum* 20Z es de 96.7%. Además, se ha de tener en cuenta que las cantidades de biomasa a las que se llega en la industria son superiores a las conseguidas en este experimento, llegándose a una cantidad de biomasa de 48 g L^{-1} con *H. elongata* DSM 142 (22). A pesar de que la cantidad de ectoína sintetizada en este estudio sea 6 veces menor que la producida por *Halomonas elongata* en la industria, se debe tener en cuenta que el metano es una fuente de carbono gratuita y que requiere ser eliminada, además de que un menor requerimiento de sales evitaría los problemas de corrosión de equipos y abarataría el *downstream*. Los resultados obtenidos muestran que la producción de ectoína por choques osmóticos con este metanotrofo es viable, sin embargo, los estudios en lotes son estudios fundamentales que sirven para saber si el principio planteado

funciona, pero se deben hacer estudios posteriores en reactores en continuo para clarificar y contrastar resultados.

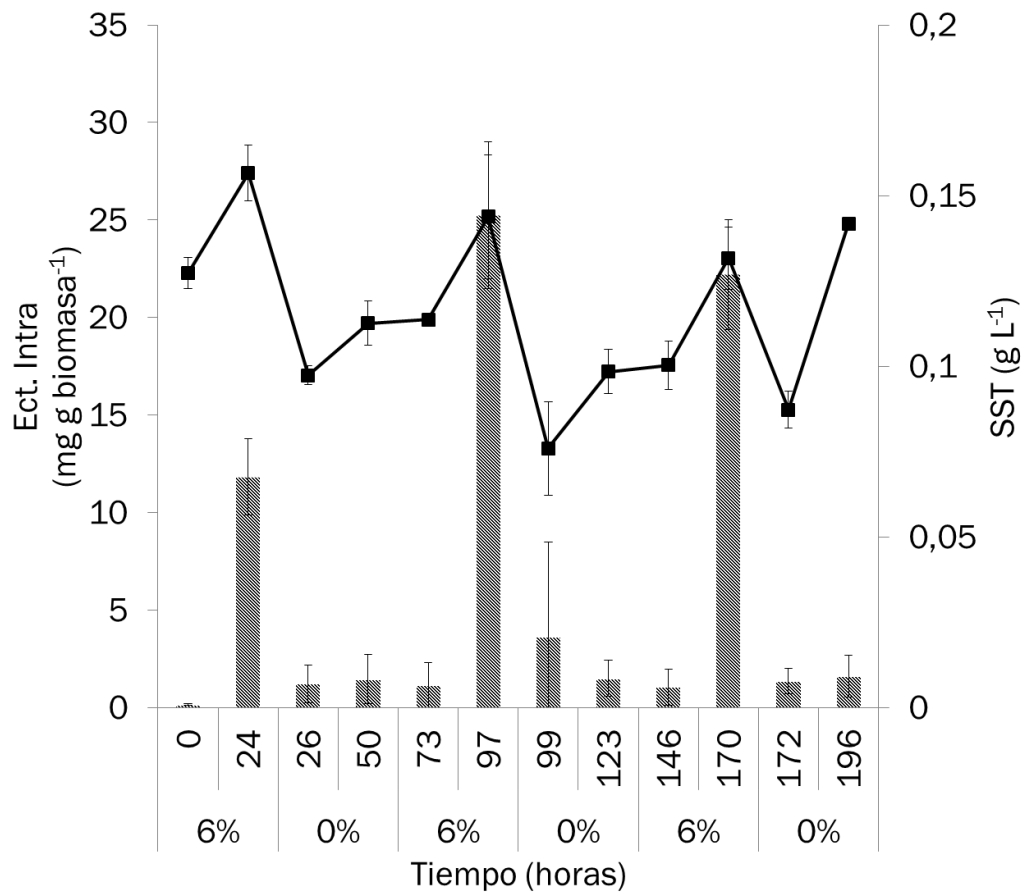


Figura 18: Evolución temporal de la síntesis de ectoína intra-celular (barras, ▨) y de la biomasa (línea continua, ■) por choques osmóticos a lo largo del experimento. Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

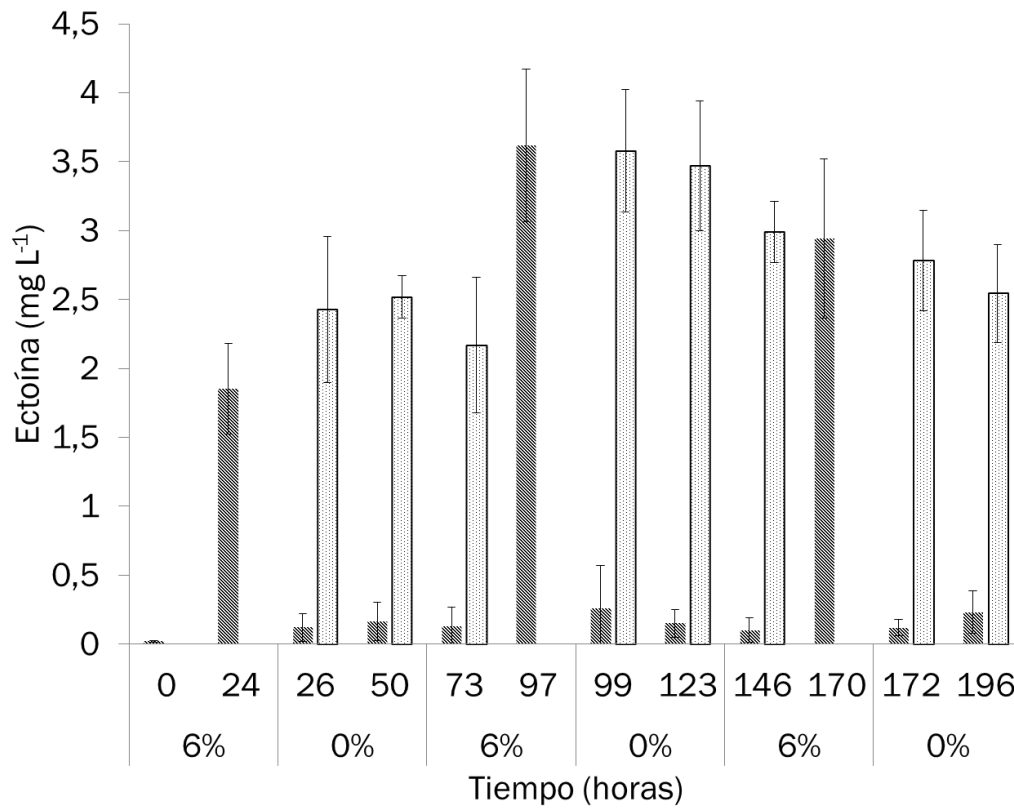


Figura 19: Evolución temporal de la síntesis de ectoína, tanto intra-celular (barras rayadas, ▨) como extra-celular (barras punteadas, ▩), por choques osmóticos. Las líneas verticales representan la desviación estándar de las réplicas.

4. DISEÑO DE APLICACIÓN INDUSTRIAL



Como ya se ha mencionado antes, el resultado de esta investigación se puede aplicar en vertederos, en los cuales las corrientes de metano son diluidas. Un ejemplo de vertedero en el que se puede aplicar el uso de *Methylophilum alcaliphilum* 20Z para el tratamiento de estas corrientes difusas de metano es el depósito de residuos controlados de Pinto (Madrid). Éste es un vertedero de 148 hectáreas (33) que en el año 2014 emitió un total de 8227433 kg de metano (34). Tiene un sistema de desgasificación y valorización energética del gas extraído, produciendo una gran cantidad de energía eléctrica a partir del metano, por lo que sólo se tratarían las emisiones diluidas (menores de un 20% de concentración de CH₄), las cuales no pueden ser utilizadas para este fin. El diseño del fermentador aquí mostrado se ha basado en los volúmenes comerciales de fermentadores para la producción de compuestos de alto valor añadido, y su dimensionado en un escalado del fermentador utilizado en el laboratorio para realizar la investigación.

4.1 Diseño del fermentador industrial.

Al igual que en el fermentador a escala laboratorio con el que se realizó la investigación del tratamiento de metano en continuo, para escala industrial se ha escogido un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) de 40 m³. Teniendo en cuenta que el espacio de cabezas es 1/3 del volumen total queda un volumen de líquido de 30 m³. El escalado y diseño del biorreactor se ha realizado siguiendo el método y fórmulas descritas en el capítulo 7 de “Coulson & Richardson’s Chemical Engineering: Fluid Flow, Heat Transfer and Mass Transfer” (35).

Los parámetros a definir en el dimensionado de un reactor son los mostrados en la Figura 20.

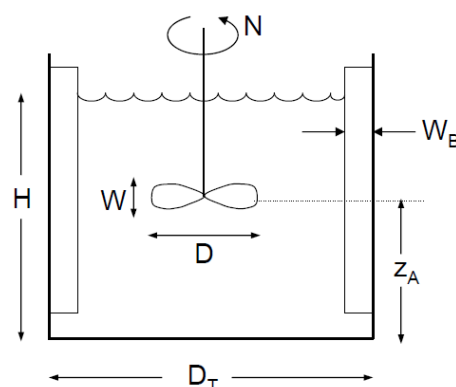


Figura 20: Parámetros a definir en el dimensionado de un reactor, siendo R el número de placas deflectoras, W la altura del agitador y W_B la anchura de las placas deflectoras.

Las ecuaciones 5, 6 y 7 muestran las relaciones de escalado de un reactor. El diámetro del fermentador y su altura han sido dimensionados teniendo en cuenta que H/D_T ha de ser cercano a 1.

$$\frac{D_{T_1}}{D_1} = \frac{D_{T_2}}{D_2}, \quad \frac{Z_{A_1}}{D_1} = \frac{Z_{A_2}}{D_2}, \quad \frac{W_1}{D_1} = \frac{W_2}{D_2}$$

Ecuaciones 5, 6 y 7

Se ha mantenido el número de placas deflectoras, además de la relación W_B/D_T , obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros del dimensionado de los reactores a escala laboratorio e industrial.

	Laboratorio		Industrial	
H	0.127	m	3.5	m
Dt	0.1	m	3.81	m
$h_{líquido}$			2.62	m
W	0.01	m	0.38	m
D	0.05	m	1.91	m
Wb	0.015	m	0.57	m
Za	0.035	m	1.34	m
R	3		3	

La corriente que se puede tratar con este fermentador se obtiene manteniendo el tiempo de retención hidráulico (TRH) experimental, el cual se obtiene con el volumen del reactor y su flujo volumétrico (ecuación 8) (Tabla 4).

$$TRH = \frac{V}{\dot{V}}$$

Ecuación 8

Tabla 4: Volumen, flujo volumétrico y THR del reactor a escala laboratorio e industrial.

	Laboratorio		Industrial	
Volumen	0.001	m ³	40	m ³
Flujo volumétrico	0.002	m ³ /h	79.2	m ³ /h
TRH	0.51	h ⁻¹	0.51	h ⁻¹

En el cambio de escala, manteniendo la semejanza geométrica, tal y como se ha visto en las ecuaciones 5, 6, y 7, también se ha de mantener $N \times D$, por lo que de aquí se obtiene la velocidad de agitación en el nuevo reactor. Teniendo en cuenta que 1 rpm es aproximadamente 0.017 Hz se obtienen los resultados representados en la Tabla 5.

Tabla 5: Velocidad de agitación de los reactores a escala laboratorio e industrial.

	Laboratorio		Industrial	
N	300	rpm	9.08	rpm
N	5	Hz	0.13	Hz
N x D	0.25	Hz*m	0.25	Hz*m

Para obtener la potencia que consume el agitador (P_T) primero hay que obtener la potencia que se suministra al fluido (P), la cual se obtiene a partir del número de potencia (N_P), el cual depende del número del Reynolds (Re) y del tipo de agitador. El tipo de agitador en nuestro caso se trata de una turbina de disco con 6 palas planas. El primer paso por tanto es obtener el Re (ecuación 9).

$$Re = \frac{\rho \cdot D^2 \cdot N}{\mu} \quad \text{Ecuación 9}$$

Teniendo el Re y el tipo de agitador se obtiene el N_P a través de la gráfica mostrada en la Figura 21.

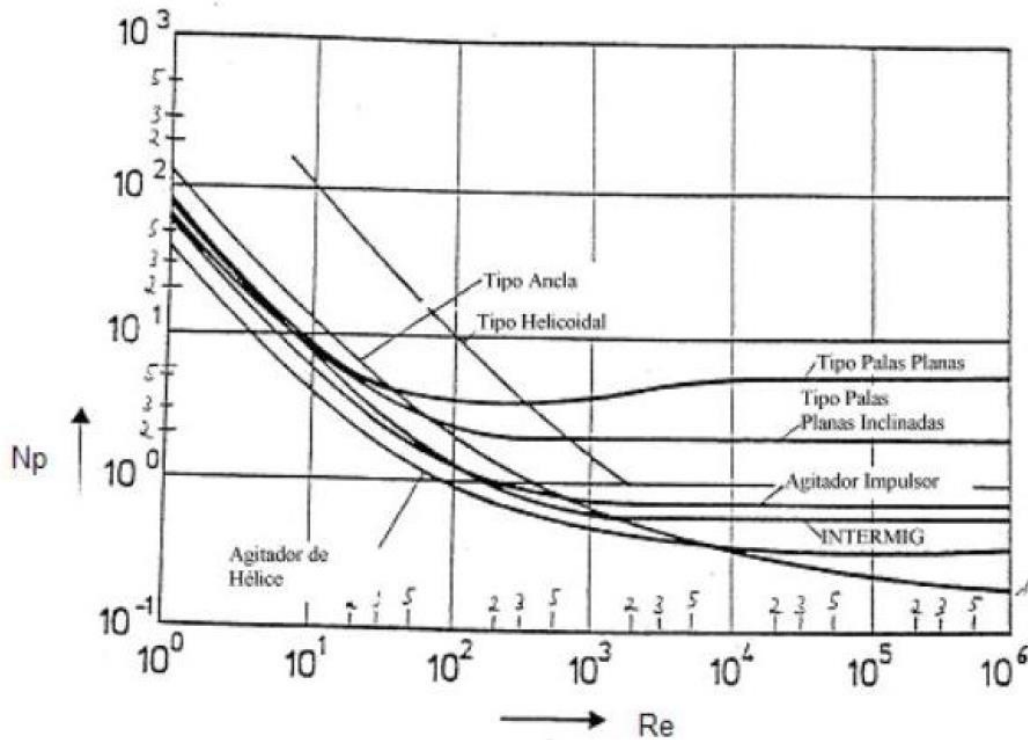


Figura 21: Número de potencia en función del Re y del tipo de agitador (35).

De la ecuación que define el número de potencia se puede despejar la potencia suministrada al fluido por el agitador (ecuación 10).

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \tag{Ecuación 10}$$

La potencia que consume el motor que mueve el agitador es del orden del doble de la potencia que el agitador suministra al fluido. En la siguiente tabla (Tabla 6) se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 6: Potencia consumida por el motor que mueve el agitador a escala laboratorio e industrial.

	Laboratorio		Industrial	
Re	1.25E+04	turbulento	4.77E+05	turbulento
N _p	5		5	
P	0.20	W	0.28	kW
PT	0.39	W	0.57	kW

Tras esto se definen los parámetros de diseño del fermentador a escala industrial, como son las presiones y temperaturas de operación y diseño y los espesores de pared y de fondo y cubierta. Para ello se utilizan las ecuaciones siguientes, obtenidas del código ASME, Sección VIII, Div.1.

$$T_{diseño} = T_{operación} + 30^{\circ}C \quad \text{Ecuación 11}$$

$$P_{diseño} = 3.5 \text{ barg ya que } P_{operación} < 2 \text{ barg} \quad \text{Ecuación 12}$$

Tabla 7: Presiones y temperaturas de operación y diseño del fermentador industrial.

$P_{operación}$	1.5	atm
$P_{diseño}$	3.5	atm
$T_{operación}$	298.15	K
$T_{diseño}$	328.15	K

El espesor de la pared del reactor se calcula a partir de la ecuación 13, obtenida del código ASME, Sección VIII, para paredes planas.

$$t = \frac{PR}{SE - 0,6P} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

- t = espesor mínimo de carcasa (in).
- P = presión admisible (psi).
- S = tensión máxima admisible (psi).
- E = eficacia = 1
- R = radio interior (in).

El material elegido para construir el reactor es el acero al carbono SA-515. Los resultados obtenidos son los representados en la Tabla 8.

Tabla 8: Espesor de pared del fermentador industrial.

P	22.04	psi
S	13700	psi
E	1	
R	75.09	in
t	0.12	in
	0.31	cm
Sobrespesor	0.3	cm
t_{real}	0.61	cm
Material	SA-515	ASME

El espesor de la cubierta y el fondo del reactor se calculan a partir de la ecuación 14, obtenida del código ASME, Sección VIII, para paredes semiesféricas.

$$t = \frac{PD}{2SE - 0,2P} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

- t = espesor mínimo de carcasa (in).
- P = presión admisible (psi).
- S = tensión máxima admisible (psi).
- E = eficacia = 1
- D = diámetro interior (in).

Los resultados obtenidos son los representados en la Tabla 9.

Tabla 9: Espesor de cubierta y fondo del fermentador industrial.

	cubierta semiesférica		fondo semiesférico	
P	22.04	psi	25.77	psi
S	13700	psi	13700	psi
E	1		1	
D	150.18	in	150.18	in
t	0.12	in	0.14	in
	0.31	cm	0.36	cm
Sobrespesor	0.3	cm	0.3	cm
t _{real}	0.61	cm	0.66	cm
Material	SA-515	ASME	SA-515	ASME

A nivel de laboratorio se ha extraído 1/10 del caldo de fermentación 3 veces por semana y se ha sustituido por MMS fresco. A nivel industrial se sigue esta misma estrategia, dando por tanto las siguientes velocidades de dilución (Tabla 10).

Tabla 10: Velocidad de dilución de los fermentadores a escala laboratorio e industrial.

	Laboratorio		Industrial	
Flujo	4.29E-05	m ³ /d	0.05	m ³ /h
Velocidad de dilución	0.04	d ⁻¹	1.79E-03	h ⁻¹

4.2 Diseño de tuberías

Antes de diseñar el compresor de la corriente gaseosa a tratar y la bomba que introduce el MMS fresco al fermentador desde un depósito, hay que diseñar las tuberías que entran y salen de estos dos equipos. Para ello los parámetros principales a definir son el diámetro, el material y el Schedule (catálogo). Tanto para líquidos como para gases, los criterios a tener en cuenta son la pérdida de carga por unidad de longitud (bar/km) y la velocidad del fluido (m/s), sin embargo en cada caso los límites de estos cambian.

En el caso de líquidos:

- Succión de bomba
 - En punto de burbuja $\rightarrow \Delta P < 0.5 \text{ bar/km}$ y $u < 1 \text{ m/s}$
 - Subenfriado $\rightarrow \Delta P < 2 \text{ bar/km}$ y $u < 1.5 \text{ m/s}$
- Impulsión
 - $\Delta P < 5 \text{ bar/km}$ y $u < 3 \text{ m/s}$
- Por gravedad
 - $\Delta P < 0.3 \text{ bar/km}$ y $u < 0.5 \text{ m/s}$

Y en el caso de gases:

$$\Delta P < 0.5 \text{ bar/km y } u < 30 \text{ m/s}$$

En el diseño de las tuberías primero se calcula la velocidad del fluido y la caída de presión que habría en cada tubería normalizada para el flujo másico que pasa a través de ésta. Tras esto se determina el espesor real requerido por la tubería. Las ecuaciones utilizadas para estos cálculos son las siguientes:

- Velocidad en la tubería:

$$v = \frac{Q_{\text{especifico}}}{\frac{\pi}{4} \cdot d_i^2} \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde

$$Q_{\text{especifico}} = Q_{\text{normal}} \cdot 1.2 \text{ (m}^3\text{/s)}$$

d_i = diámetro interno tubería (m)

- Caída de presión en la tubería:

$$\frac{\Delta P_f}{L} = \frac{8 \cdot f}{d_i} \cdot \frac{\rho \cdot Q_{\text{especifico}}^2}{2} \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde f es el factor de fricción, el cual se calcula con las ecuaciones siguientes dependiendo de si el régimen del flujo es laminar o turbulento.

- Laminar ($Re < 2100$)

$$f = \frac{64}{Re} \quad \text{Ecuación 17}$$

- Turbulento ($Re > 4200$)

$$\frac{1}{\sqrt{f_{Chen}}} = 2 \cdot \log_{10} \left[\frac{(\epsilon/D)}{3,7065} - \frac{5,0452}{Re} \cdot \log_{10} \left[\frac{(\epsilon/D)^{1,1098}}{2,8257} + \frac{5,8506}{Re^{0,8981}} \right] \right]$$

Ecuación 18

Nombrando como 1 la tubería que llega al compresor, 2 la tubería que sale de éste, 3 la tubería que conecta el depósito de MMS con la bomba, y 4 la tubería que conecta la bomba con el fermentador, los resultados del diseño de tuberías están representados en la Tabla 11.

Tabla 11: Diámetros de tuberías del proceso.

Nº	Dn(″)	Sch	Espesor (m)	Do(m)	Di(m)	v (m/s)	$\Delta P/L$ (bar/km)
1	2	5S	1.65E-03	0.06	0.057	10.35	2.81E-03
2	2	5S	1.65E-03	0.06	0.057	10.35	2.81E-03
3	1/8	40	1.73E-03	0.01	0.007	1.13	3.97E-01
4	1/8	40	1.73E-03	0.01	0.007	1.13	3.97E-01

Las corrientes que pasan por cada tubería son las siguientes.

Tabla 12: Tabla de corrientes del proceso.

Nº	\dot{m} (kg/s)	ρ (kg/m ³)	V (m ³ /s)	μ (kg/m·s)
1	0.026	1.19	0.022	1.80E-05
2	0.026	1.18	0.022	1.80E-05
3	0.035	1000	3.47E-05	0.001
4	0.035	1000	3.47E-05	0.001

4.3 Diseño del compresor

El proceso de compresión se asemeja lo suficiente a isoentrópico como para poder calcular por éste método el trabajo de compresión, además de la temperatura que tendrá el gas a la salida del compresor.

En un proceso isoentrópico se cumple lo siguiente:

$$P \cdot V^\gamma = cte \rightarrow T_2 = T_1 \cdot \left(\frac{P_2}{P_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} \quad \text{Ecuación 19}$$

Teniendo esto en cuenta, el trabajo que el compresor aporta al gas se puede definir como:

$$-\int_{V_1}^{V_2} P \cdot dV = -W = \frac{\gamma}{\gamma-1} \cdot P_1 \cdot V_1 \cdot \left[\left(\frac{P_2}{P_1}\right)^{\frac{\gamma-1}{\gamma}} - 1 \right] \quad \text{Ecuación 20}$$

Sustituyendo en esta ecuación con el volumen nos da el trabajo en J, sin embargo si en lugar del volumen sustituimos el flujo volumétrico (m³/s) de esta ecuación obtenemos la potencia en W.

La energía que consume el compresor al comprimir el gas depende de la eficacia del compresor.

$$W_T = W \cdot \eta \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde:

- P1 Presión de entrada (Pa)
- P2 Presión de salida (Pa)
- T1 Temperatura de entrada (K)
- T2 Temperatura de salida (K)
- V1 Flujo volumétrico de entrada
- γ Ratio de capacidad calorífica (Cp/Cv) = 1.4
- Cp Capacidad calorífica (J/kg • K)
- Cv Capacidad calorífica volumétrica (J/kg • K)
- η Eficiencia del compresor = 0.7

Los resultados obtenidos son los representados en la Tabla 13.

Tabla 13: Resultados del diseño del compresor.

P1	1	bar
P2	1.87	bar
T1	298.15	K
T2	356.45	K
V1	0.022	m ³ /s
W	1505.77	W
η	0.7	
WT	2.15	kW

4.4 Diseño de la bomba

En esta sección se calcula la diferencia de presión que proporciona la bomba (ΔP), su potencia y el NPSH disponible para bombas centrífugas, para lo cual nos basamos en las ecuaciones proporcionadas en Hall 2012 (36). También son necesarios los diámetros de las tuberías de succión e impulsión de la bomba, las cuales están definidas en la Tabla 11 en el apartado de diseño de tuberías.

Lo primero que se ha de definir es la diferencia de presión que ha de proporcionar la bomba, teniendo en cuenta de dónde parte el fluido y el punto de descarga. En este caso se está diseñando, tal y como se ha mencionado anteriormente, la bomba que introduce el MMS fresco en el fermentador, por lo que se considera que el fluido parte de un depósito cercano a presión atmosférica. Teniendo en cuenta, tal y como se ha visto en el apartado del diseño del fermentador, que la presión de operación del fermentador son 1.5 atm, la diferencia de presión entre ambos equipos, y por tanto la diferencia de presión que ha de proporcionar la bomba entre ellos, es de tan solo 0.5 atm.

Sabiendo la diferencia de presión que ha de proporcionar entre ambos equipos se procede a calcular la potencia consumida por la bomba, para lo cual se tiene en cuenta el recorrido que realiza, pues de él dependerán las pérdidas de carga, además de la diferencia de altura de líquido entre ambos equipos. Para calcular la potencia que la bomba proporciona al fluido se utiliza la ecuación 22, y para calcular la potencia consumida por la bomba, teniendo en cuenta la eficacia de ésta, se utiliza la ecuación 23.

$$\rho \cdot \Delta Z + \frac{\Delta P}{\rho} - \frac{\Delta P_f}{\rho} - W = 0 \quad \text{Ecuación 22}$$

$$\text{Potencia} = W \cdot \frac{\dot{m}}{\eta} \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde:

- W = trabajo realizado por la bomba (J/kg)
- ΔP = diferencia de presión en el sistema (N/m²)
- ΔZ = diferencia de altura = 1.5 m
- ΔP_f = pérdidas de presión debido a la fricción (N/m²)
- ρ = densidad del líquido (kg/m³)
- η = eficacia de la bomba = 0.75
- m = flujo másico (kg/s)

Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 14.

Tabla 14: Potencia de la bomba.

W	70.58	J/kg
Potencia	3.3	W

Por último, se calcula el NSPH disponible y la presión máxima de succión y de *shut off* con las siguientes ecuaciones:

$$NSPH_{disponible} = \frac{P}{\rho} + H - \frac{P_f}{\rho} - \frac{P_v}{\rho} \quad \text{Ecuación 54}$$

$$P_{max.succión} = P_{dis. deposito} + \rho \cdot g \cdot (h_{elevación} + h_{máxima}) \quad \text{Ecuación 65}$$

$$P_{shutoff} = P_{max.succión} + 1.2 \cdot \Delta P_{diseño} \quad \text{Ecuación 76}$$

Donde:

- P = presión del líquido en el depósito en la succión de la bomba (N/m²)
- H = altura del líquido sobre la bomba en la parte de succión (m)
- P_f = presión perdida en la tubería de succión (N/m²)
- P_v = presión de vapor del líquido en la zona de succión (N/m²)

Los resultados obtenidos están representados en la Tabla 15.

Tabla 15: NPSH y presiones de la bomba.

NPSH _{disponible}	9.41	m
P _{max succión}	3.8	atm
P _{shutoff}	8	atm





5. CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos del estudio de evaluación de reactores de tanque agitado de mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de la producción de ectoína a diferentes concentraciones de sal y con alta concentración de cobre se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- Los máximos de ectoína intra-celular se obtuvieron en los ocho primeros días de operación (73.98 ± 7.07 mg ectoína g biomasa⁻¹).
- En estado estacionario las concentraciones de ectoína se mantuvieron constantes (37.18 ± 1.67 mg ectoína g biomasa⁻¹).
- Trabajando a altas concentraciones de cobre se consiguió la excreción de ectoína intra-celular al medio (25.8%).
- Las capacidades medias de eliminación y las eficiencias de eliminación no se vieron afectadas por la concentración salina (CE_m , 19.96 ± 4.11 g CH₄ h⁻¹ m⁻³; EE_m , 37.24 ±9.12%).

De la evaluación de los enriquecimientos de nuevos metanotrofos productores de ectoína se deducen las siguientes consideraciones:

- Se consiguió enriquecer organismos metanotrofos productores de ectoína de las fuentes de estiércol fresco de vaca y lodos frescos activados, con alta concentración salina.
- Los máximos de ectoína intra-celular conseguidos durante el enriquecimiento de estos inóculos fue inferior a la producida por *Methylochromium*, siendo necesario el aislamiento de las cepas puras presentes para una correcta comparación (máximo de 12.95 ± 0.38 mg ectoína g biomasa⁻¹).
- En ninguno de los inóculos fue detectada ectoína extra-celular.

Del experimento de *bio-milking* se concluyen los siguientes puntos:

- *M. alcaliphilum* 20Z es viable para la producción en continuo de ectoína por choques osmóticos.
- La excreción de ectoína al medio extra-celular en el choque hiposmótico es inmediata, alcanzando el 96.7% de excreción.
- En choques hiper-osmóticos *M. alcaliphilum* 20Z es capaz de absorber la ectoína presente en el medio extra-celular salino.





BIBLIOGRAFÍA





1. *Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement.* **Sara Cantera, Raquel Lebrero, Lidia Sardonil, Pedro A. García-Encina, Raul Muñoz.** Journal of Environmental Management. In revision.
2. Atmospheric greenhouse gas concentrations. [En línea] European Environment Agency, 07 de April de 2016. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/atmospheric-greenhouse-gas-concentrations-4/assessment>.
3. **IPCC.** *Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo.* IPCC, Ginebra, Suiza : Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer, 2014.
4. *Methanotrophic Bacteria.* **HANSON, RICHARD S. HANSON AND THOMAS E. 2,** 1996, MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Vol. 60, págs. 439–471.
5. *Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?* **P. J. Strong, S. Xie, and W. P. Clarke.** 2015, Environmental Science and Technology., pág. 4001–4018.
6. United States Environmental Protection Agency. Global Greenhouse Gas Emissions. [En línea] United States Environmenta. Protection Agency., 15 de April de 2016. <https://www3.epa.gov/climatechange/ghgemissions/gases/ch4.html>.
7. *Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures.* **Sara Cantera, Raquel Lebrero, Pedro A. García-Encina, Raúl Muñoz.** 2016, ELSEVIER, págs. 11-20.
8. *Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges.* **Juan C. López, Guillermo Quijano, Theo S. O. Souza, José M. Estrada, Raquel Lebrero, Raúl Muñoz.** 2013, Springer., págs. 2277–2303.
9. EEA. *European Environment Agency.* [En línea] 10 de December de 2015. <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/greenhouse-gas-emission-trends-5/assessment-1>.
10. ESTRATEGIA ESPAÑOLA DE CAMBIO CLIMÁTICO Y ENERGÍA LIMPIA. *HORIZONTE 2007- 2012 -2020.* [En línea] 2 de noviembre de 2007. http://www.magrama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/est_cc_energ_limp_tcm7-12479.pdf.

11. Medio Ambiente de Castilla y León. *jcyf*. [En línea] 2 de diciembre de 2009.
http://www.medioambiente.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/Plantilla100/1259064156693/_/_/_.
12. *A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies*. **José M. Estrada, N.J.R. (Bart) Kraakman, Raquel Lebrero, Raúl Muñoz**. 2012, ELSEVIER, págs. 1354–1363.
13. *Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry-Influence of the methane and nitrogen concentrations*. **Girard, M., Ramirez, A. A., Buelna, G., & Heitz, M**. 2011, Chemical Engineering Journal, págs. 151–158.
14. *Odor abatement in biotrickling filters: Effect of the EBRT on methyl mercaptan and hydrophobic VOCs removal*. **Raquel Lebrero, Elisa Rodríguez, José M. Estrada, Pedro A. García-Encina, Raúl Muñoz**. 2012, ELSEVIER, págs. 38-45.
15. *Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds*. **Raul Muñoz, Santiago Villaverde, Benoit Guieysse, Sergio Revah**. 2007, ELSEVIER, págs. 410–422.
16. *Assessing the influence of CH₄ concentration during culture enrichment on the biodegradation kinetics and population structure*. **Juan C. Lopez, Guillermo Quijano, Rebeca Perez, Raúl Muñoz**. 2014, ELSEVIER, págs. 116-123.
17. *Comparative Performance Evaluation of Conventional and Two-phase Hydrophobic Stirred Tank Reactors for Methane Abatement: Mass Transfer and Biological Considerations*. **Sara Cantera, Jose M. Estrada, Raquel Lebrero, Pedro A. García-Encina, Raúl Muñoz**. 2015, Biotechnology and Bioengineering, págs. 1-10.
18. *Dual Pathways for Copper Uptake by Methanotrophic Bacteria*. **Ramakrishnan Balasubramanian, Grace E. Kenney, and Amy C. Rosenzweig**. 43, 2011, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 286, págs. 37313–37319.
19. *Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures*. **Sara Cantera, Raquel Lebrero, Pedro A. García-Encina, Raúl Muñoz**. 2016, ELSEVIER, págs. 11-20.



20. *Biotechnological Potential of Aerobic Methylophilic Bacteria: A Review of Current State and Future Prospects*. Yu. A. Trotsenko, N. V. Doronina, and V. N. Khmelenina. 5, 2005, MAIK "Nauka/Interperiodica", Vol. 41, págs. 495–503.
21. *Production and characterization of ectoine by Marinococcus sp. ECT1 isolated from a high-salinity environment*. Yu-Hong Wei, Fang-Wei Yuan, Wei-Chuan Chen, and Shan-Yu Chen. 3, 2011, ELSEVIER., Vol. 111, págs. 336–342.
22. *Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production*. José M. Pastor, Manuel Salvador, Montserrat Argandoña, Vicente Bernal, Mercedes Reina-Bueno, Laszlo N. Csonka, José L. Iborra, Carmen Vargas, Joaquín J. Nieto, Manuel Cánovas. 2010, ELSEVIER., págs. 782–801.
23. *Continuous Synthesis and Excretion of the Compatible Solute Ectoine by a Transgenic, Nonhalophilic Bacterium*. Torsten Schubert, Thomas Maskow, Dirk Benndorf, Hauke Harms, and Uta Breuer. 10, 2007, American Society for Microbiology., Vol. 73, págs. 3343–3347.
24. *Production of ectoine through a combined process that uses both growing and resting cells of Halomonas salina DSM 5928*. Ya-jun Lang, Lin Bai, Ya-nan Ren, Ling-hua Zhang, Shinichi Nagata. 2011, Springer, págs. 303–310.
25. *Isolation and Characterization of Halotolerant Alkaliphilic Methanophilic Bacteria from Tuva Soda Lakes*. Valentina N. Khmelenina, Marina G. Kalyuzhnaya, Natalia G. Starostina, Natalia E. Suzina, Yuri A. Trotsenko. 1997, CURRENT MICROBIOLOGY, Vol. 35, págs. 257–261.
26. *Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs*. Valentina N. Khmelenina, Marina G. Kalyuzhnaya, Valentin G. Sakharovsky, Natalia E. Suzina, Yuri A. Trotsenko, Gerhard Gottschalk. 1999, Springer-Verlag, págs. 321–329.
27. *Identification and Characterization of EctR1, a New Transcriptional Regulator of the Ectoine Biosynthesis Genes in the Halotolerant Methanotroph Methylophilum alcaliphilum 20Z*. Ildar I. Mustakhimov, Alexander S. Reshetnikov, Anatoly S. Glukhov, Valentina N. Khmelenina, Marina G. Kalyuzhnaya, and Yuri A. Trotsenko. 2, 2010, JOURNAL OF BACTERIOLOGY., Vol. 192, págs. 410–417.
28. *Cloning, Purification, and Characterization of Diaminobutyrate Acetyltransferase from the Halotolerant Methanotroph Methylophilum alcaliphilum 20Z*. A. S. Reshetnikov, I. I. Mustakhimov, V. N. Khmelenina, and

Yu. A. Trotsenko. 8, 2005, Pleiades Publishing, Inc., Vol. 70, págs. 1063-1069.

29. *Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "Methylomicrobium alcaliphilum 20Z"*. Alexander S. Reshetnikov, Valentina N. Khmelenina, Yuri A. Trotsenko. 2006, Springer., págs. 286–297.

30. Verstraete, W., [ed.]. *Environmental biotechnology*. Londres : ESEB, 2004.

31. American Water Works Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. [En línea] 2016. <https://www.standardmethods.org/>.

32. *Two-phase partitioning biotrickling filters for methane abatement: exploring the potential of hydrophobic methanotrophs*. Raquel Lebrero, Laura Hernández, Rebeca Pérez, José Manuel Estrada, Raúl Muñoz. 2015, ELSEVIER, págs. 124-131.

33. Mancomunidad del sur. [En línea] 2014. <http://www.mancomunidadelsur.org/servicios/instalaciones/26-deposito-controlado-de-pinto>.

34. PRTR España. [En línea] 2014. http://prtr-es.es/informes/fichacomplejo.aspx?Id_Complejo=1458.

35. Richardson., J. M. Coulson & J. F. *Fluid Flow, Heat Transfer and Mass Transfer*. 6°. s.l. : Butterworth Heinemann, 2000. Vol. 1.

36. Hall, S. *Rules of Thumb for Chemical Engineers*. [ed.] Butterworth-Heinemann. 5°. Oxford : Elsevier, 2012.

37. *Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera Methylomicrobium and Methylobacter and emended description of the genus Methylomicrobium*. Marina G. Kalyuzhnaya, Valentina Khmelenina, Bulat Eshinimaev, Dimitry Sorokin, Hiroyuki Fuse, Mary Lidstrom and Yuri Trotsenko. 2008, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, págs. 591–596.

38. GOV.UK. *2010 to 2015 government policy: greenhouse gas emissions*. [En línea] 8 de May de 2015. <https://www.gov.uk/government/publications/2010-to-2015-government-policy-greenhouse-gas-emissions/2010-to-2015-government-policy-greenhouse-gas-emissions>.



ANEXOS



Anexo I. Rectas de calibrado

Recta de calibración del CH₄:

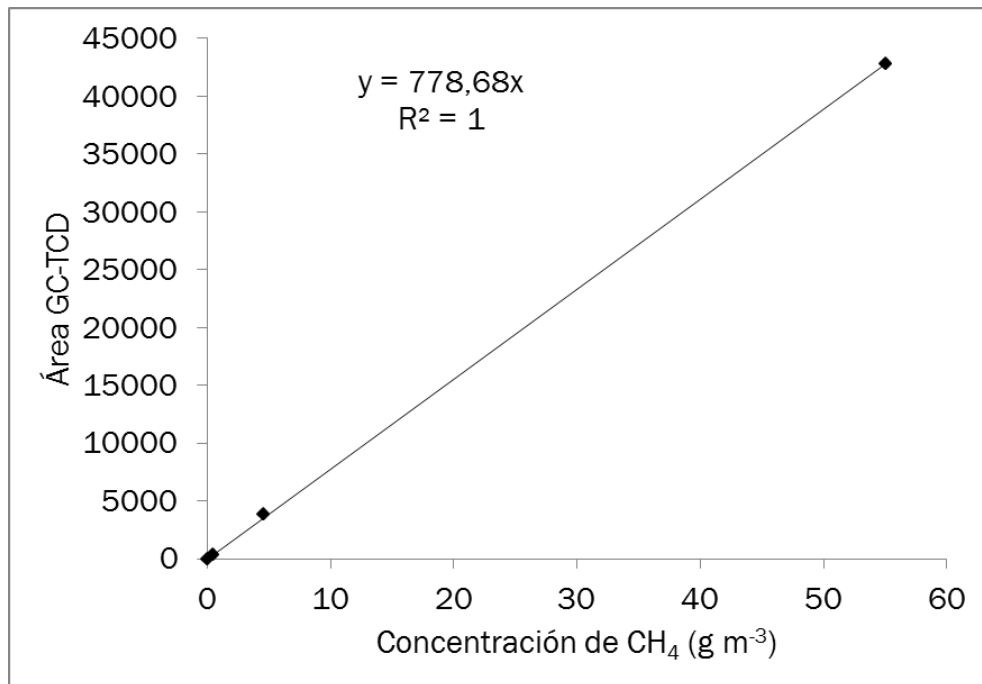


Figura 22: Recta de calibración de la concentración de CH₄ respecto al área proporcionada por el GC-TCD.

Recta de calibración del CO₂:

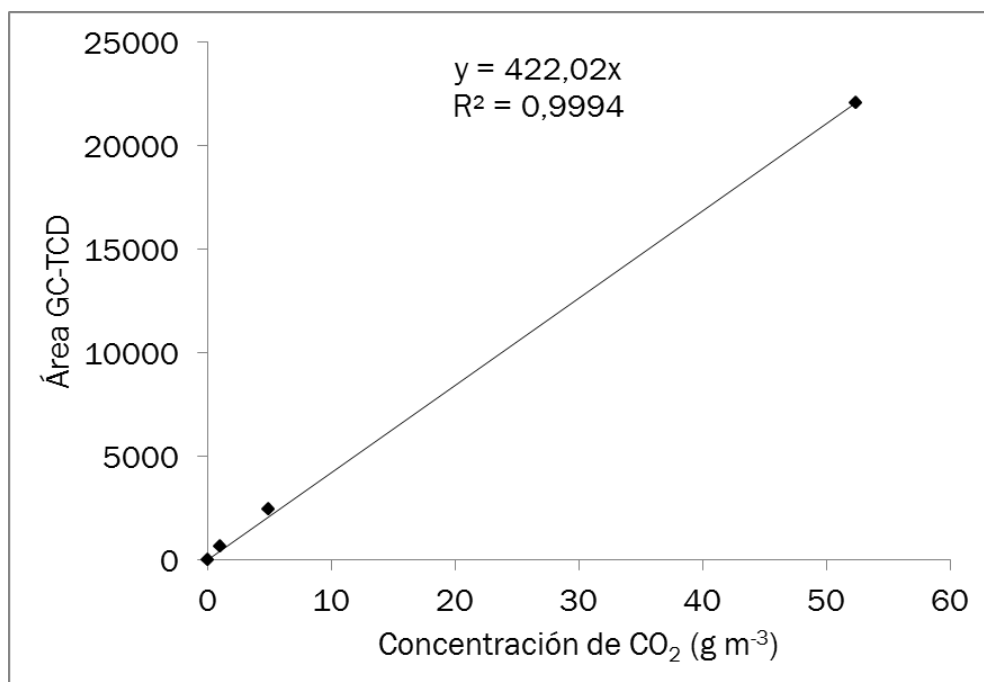


Figura 23: Recta de calibración de la concentración de CO₂ respecto al área proporcionada por el GC-TCD.

Recta de calibración DO/SST *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z:

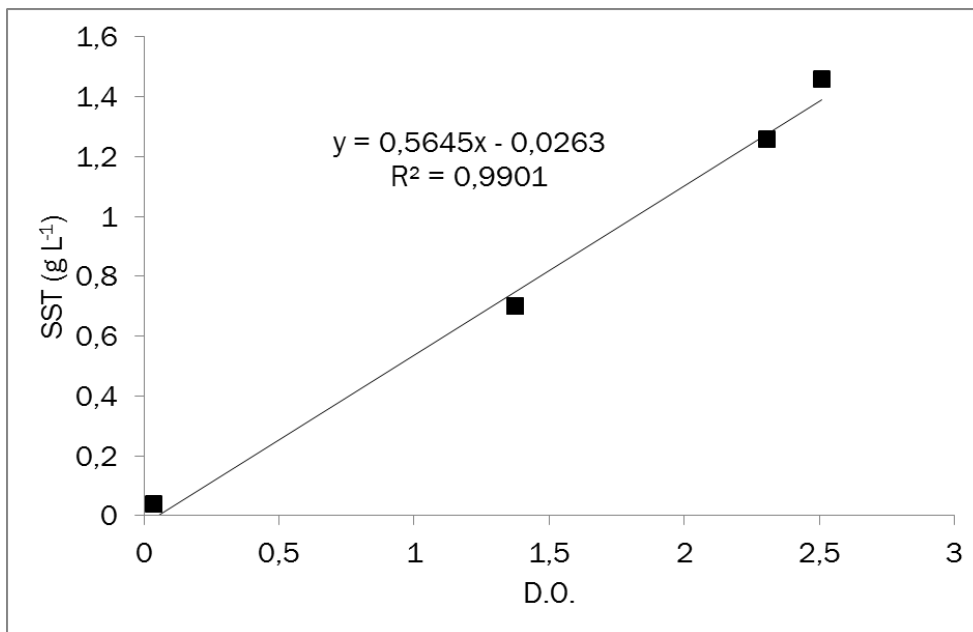


Figura 24: Recta de calibración de la concentración de SST en g L⁻¹ respecto al valor de absorbancia proporcionado al medir DO para el inóculo de la cepa pura *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z.

Recta de calibración DO/SST estiércol fresco de vaca:

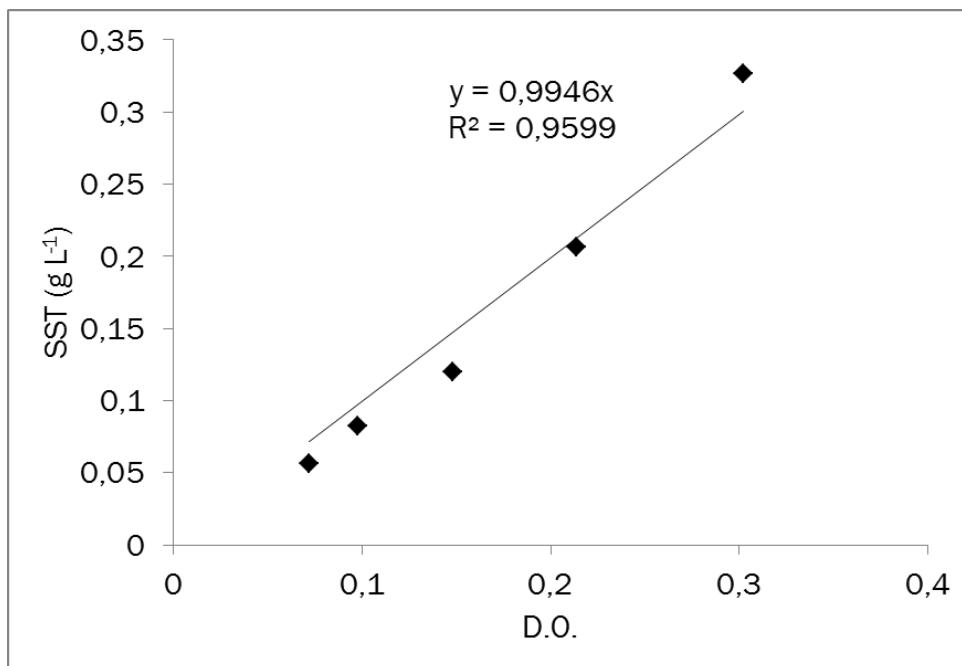


Figura 25: Recta de calibración de la concentración de SST en g L⁻¹ respecto al valor de absorbancia proporcionado al medir DO para el inóculo de estiércol fresco de vaca.

Recta de calibración DO/SST lodos frescos activados con 3% NaCl:

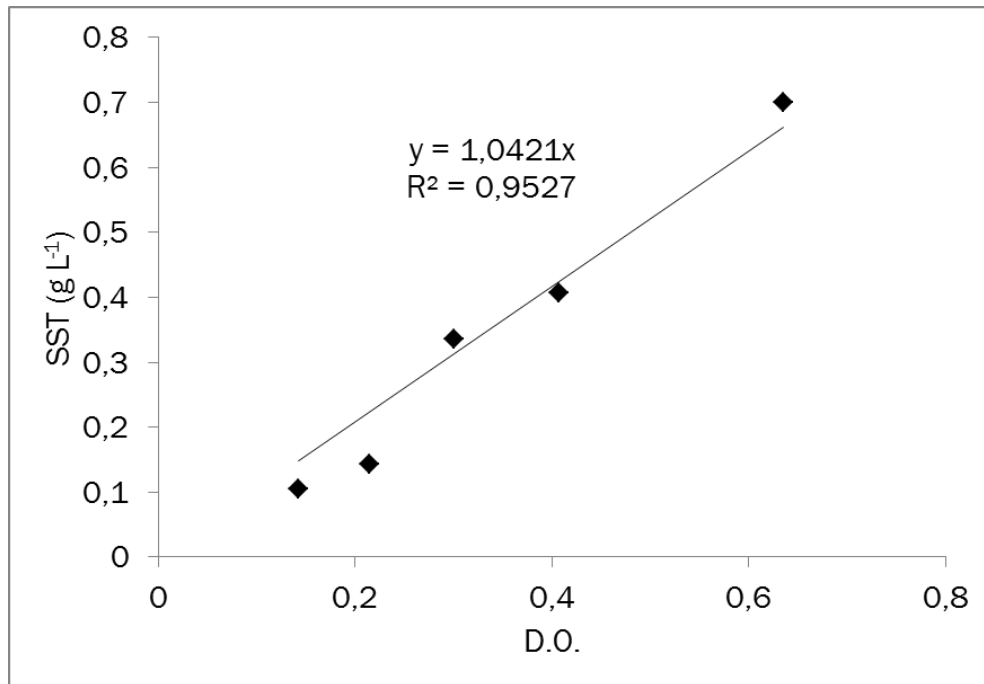


Figura 26: Recta de calibración de la concentración de SST en g L⁻¹ respecto al valor de absorbancia proporcionado al medir DO para el inóculo de lodos frescos activados con un 3% de NaCl.

Recta de calibración DO/SST lodos frescos activados con 6% NaCl:

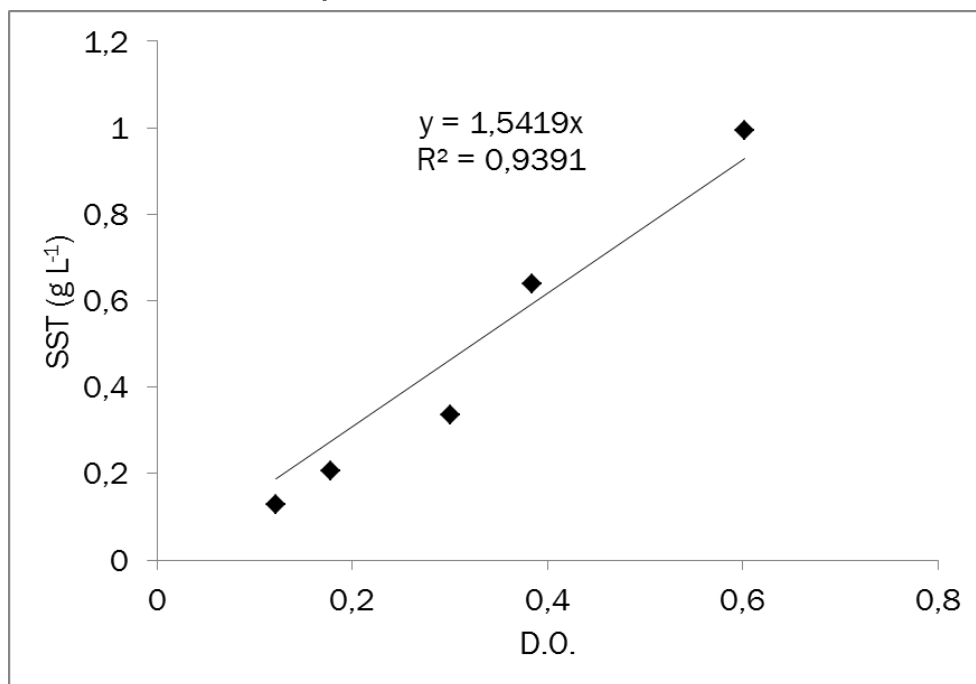


Figura 27: Recta de calibración de la concentración de SST en g L⁻¹ respecto al valor de absorbancia proporcionado al medir DO para el inóculo de lodos frescos activados con un 6% de NaCl.

Recta de calibración de la ectoína:

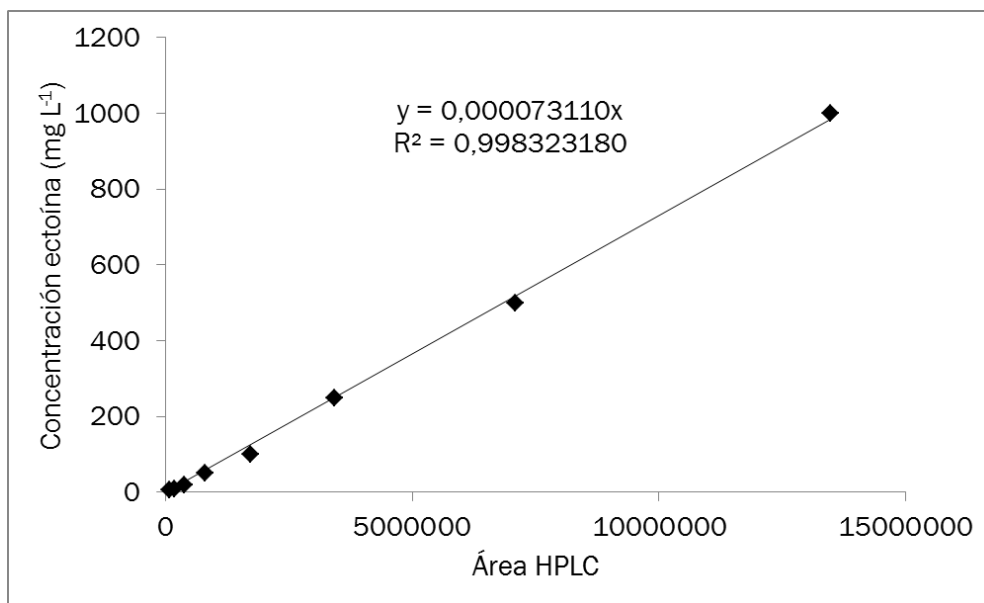


Figura 28: Recta de calibración de la concentración de ectoína en mg L⁻¹ respecto al área del HPLC.

Cromatogramas de HPLC para la detección de ectoína:

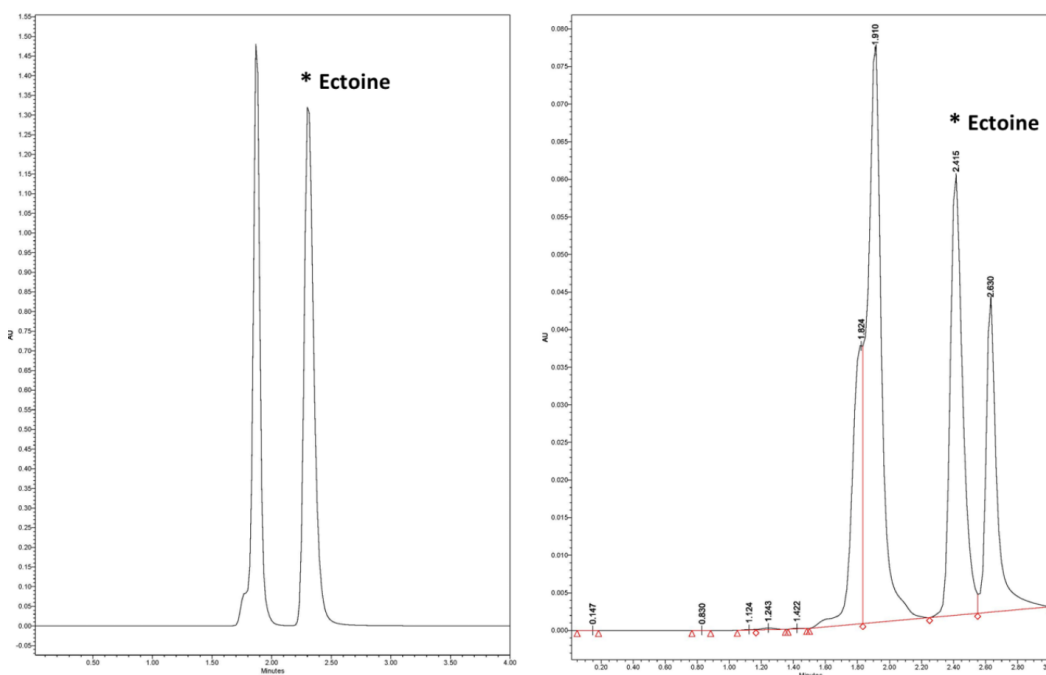


Figura 29: Cromatogramas de HPLC a) Estándar de ectoína a 100 mg L⁻¹ en MMS b) extracto de etanol de *Methylophilum alcaliphilum* 20Z cultivado con un 3% de NaCl, 0.05 μM de Cu²⁺, 4% de CH₄, a 25°C en MMS.

Anexo II. Tablas de datos

II.I Experimento en reactores de tanque agitado con mezcla perfecta operados en continuo para el monitoreo de Methylophilum alcaliphilum 20Z en diferentes condiciones de sal y con alta concentración de cobre

Tabla de los datos medios del reactor R1:

Tabla 15: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al reactor R1.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg L ⁻¹)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	Ect. Extra (mg L ⁻¹)	CE (g h ⁻¹ m ⁻³)	PT CO ₂ (g h ⁻¹ m ⁻³)	EE (%)
1	0	0	0	0	0	0
3	4,72	23,59	0	2,78	2,83	5,23
5	19,61	53,48	1,07	2,31	8,94	5,77
7	#N/A	#N/A	#N/A	7,64	18,95	12,16
8	50,23	24,70	3,37	12,57	21,44	21,42
9	#N/A	#N/A	#N/A	15,18	26,71	26,90
10	19,81	8,25	1,62	15,81	43,63	23,43
12	21,10	5,55	1,44	16,12	37,83	24,25
14	#N/A	#N/A	#N/A	16,88	21,20	32,59
15	16,03	4,45	2,67	17,34	29,07	31,14
16	18,77	4,94	2,54	22,34	30,75	36,22
18	#N/A	#N/A	#N/A	25,48	27,93	36,08
21	18,27	7,55	2,31	21,56	19,72	36,55
23	19,56	9,49	1,54	21,37	19,28	33,31
25	17,62	8,90	1,21	21,81	20,69	38,15
26	#N/A	#N/A	#N/A	23,63	22,94	41,10
28	23,50	11,08	2,68	18,58	23,13	37,83
30	22,77	10,54	1,55	21,48	25,05	36,62
32	19,76	8,82	5,01	20,60	23,38	34,84
34	#N/A	#N/A	#N/A	21,80	15,65	36,39
35	21,97	9,23	10,11	22,74	17,88	35,55
37	27,81	10,86	10,51	23,44	16,52	37,50
39	24,94	10,30	11,12	26,40	13,85	41,13
42	18,79	6,98	14,19	20,08	13,59	35,99
44	26,92	10,04	7,36	23,39	18,33	40,44
46	29,21	10,94	16,02	17,83	19,16	35,12
49	24,24	7,39	14,47	18,13	15,26	34,12

Tabla de los datos medios del reactor R2:
Tabla 16: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al reactor R2.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg L ⁻¹)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	Ect. Extra (mg L ⁻¹)	CE (g h ⁻¹ m ⁻³)	PT CO ₂ (g h ⁻¹ m ⁻³)	EE (%)
1	#N/A	#N/A	#N/A	0	0	0
3	#N/A	#N/A	#N/A	0,71	1,04	1,98
4	0,27	#N/A	0	1,64	0,99	2,82
6	3,87	16,12	0	6,03	1,83	9,15
8	39,21	73,98	1,07	14,07	20,85	24,99
10	#N/A	#N/A	#N/A	13,38	20,61	22,81
11	54,53	52,94	3,37	12,10	18,22	20,19
13	40,74	43,81	1,62	12,34	17,49	20,90
15	43,07	45,33	1,44	14,11	19,57	26,00
17	#N/A	#N/A	#N/A	17,16	31,36	30,82
18	75,32	71,73	2,67	17,19	27,62	31,24
20	75,32	68,47	2,54	18,36	30,30	30,71
22	93,47	58,79	2,31	18,41	35,02	33,00
23	#N/A	#N/A	#N/A	21,02	33,71	38,33
24	100,13	71,01	1,54	21,37	38,08	37,96
26	121,38	54,19	1,21	22,29	33,81	35,33
28	96,50	42,32	2,68	21,82	44,90	41,41
30	#N/A	#N/A	#N/A	19,36	39,67	37,64
31	106,29	34,51	1,55	21,31	41,28	39,66
33	129,67	39,78	5,01	22,98	40,71	42,74
35	137,02	39,15	10,11	23,89	38,49	42,97
37	#N/A	#N/A	#N/A	20,12	42,37	35,82
38	150,10	38,10	10,51	27,20	40,44	45,54
40	145,88	36,47	11,12	22,51	34,41	42,55
42	143,96	36,17	14,19	21,78	35,97	45,26
44	#N/A	#N/A	#N/A	24,04	34,73	47,42
45	153,18	36,13	7,36	24,10	31,53	49,18
47	143,00	34,88	16,02	25,50	33,95	50,70
49	145,70	36,79	14,47	20,70	34,45	46,16
51	#N/A	#N/A	#N/A	21,76	31,93	48,87

II.II Experimento en lote para el enriquecimiento de metanotrofos capaces de producir ectoína

Tabla de los datos medios del inóculo de estiércol fresco de vaca con 3% NaCl:

Tabla 17: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al inóculo de estiércol fresco de vaca con un 3% NaCl.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	[CH ₄] (g m ⁻³)	[CO ₂] (g m ⁻³)
0	0	57,54	1,92
1	0	44,17	2,19
2	2,80	31,82	2,78
3	1,83	20,34	4,01
4	2,04	14,35	4,30
5	1,78	9,25	5,89
6	1,62	6,47	6,28

Tabla de los datos medios del inóculo de estiércol fresco de vaca con 6% NaCl:

Tabla 18: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al inóculo de estiércol fresco de vaca con un 6% NaCl.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	[CH ₄] (g m ⁻³)	[CO ₂] (g m ⁻³)
0	0	48,07	1,46
1	0	48,20	1,82
2	0	47,24	1,82
3	0	48,16	1,86
7	0	46,27	1,96
9	0	44,99	2,44
10	0	46,10	2,07
14	6,71	41,45	2,82
19	6,93	19,49	4,82
22	7,76	17,21	5,08
23	8,02	15,96	5,65
28	8,53	14,04	5,21
43	7,52	7,16	11,43
48	5,75	1,28	15,55

Tabla de los datos medios del inóculo de lodos frescos activados con 3% NaCl:

Tabla 19: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al inóculo de lodos frescos activados con un 3% NaCl.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	[CH ₄] (g m ⁻³)	[CO ₂] (g m ⁻³)
0	0	51,23	1,37
1	6,98	42,65	1,96
2	9,02	31,88	2,46
3	6,35	19,19	3,82
4	5,59	12,14	4,10
5	5,94	4,88	5,98
6	4,68	3,04	6,30
7	3,65	1,36	6,70

Tabla de los datos medios del inóculo de lodos frescos activados con 6% NaCl:

Tabla 20: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al inóculo de lodos frescos activados con un 6% NaCl.

Tiempo (días)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	[CH ₄] (g m ⁻³)	[CO ₂] (g m ⁻³)
0	0	51,73	1,59
1	6,54	46,60	2,06
2	12,91	39,80	2,63
3	12,95	25,75	3,98
5	7,79	11,50	5,58
8	5,68	3,84	6,74

II.III Experimento “Bio-milking”

Tabla de los datos medios del experimento “bio-milking” con *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z:

Tabla 21: Datos medios para la elaboración de las ilustraciones relativas al experimento “bio-milking” con el inóculo *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z.

		Tiempo (horas)	Ect. Intra (mg L ⁻¹)	Ect. Intra (mg g biomasa ⁻¹)	Ect. Extra (mg L ⁻¹)	Ect. Total (mg L ⁻¹)	Ect. Extra (%)	SST (mg L ⁻¹)
ciclo 1	6%	0 24	0,02 1,85	0,16 11,84	0 0	0,02 1,85	0 0	0,13 0,16
	0%	26 50	0,12 0,16	1,23 1,47	2,42 2,52	2,55 2,68	95,24 93,85	0,10 0,11
ciclo 2	6%	73 97	0,13 3,62	1,15 25,25	2,17 0	2,30 3,62	94,26 0	0,11 0,14
	0%	99 123	0,26 0,15	3,65 1,51	3,58 3,47	3,83 3,62	93,31 95,82	0,08 0,10
ciclo 3	6%	146 170	0,10 2,94	1,05 22,21	2,99 0	3,09 2,94	96,72 0	0,10 0,13
	0%	172 196	0,12 0,23	1,36 1,63	2,78 2,54	2,90 2,77	95,88 91,65	0,09 0,14

