

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

DEGRADACIÓN DE METANO EN REACTORES DE PARTICIÓN DE DOS FASES  
LÍQUIDAS Y ACUMULACIÓN DE PHB (POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO)

TESIS  
para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología

PRESENTA

IBT. Nancy Cristal Zúñiga Peña

Director  
Dr. Sergio Revah Moiseev

Fecha  
Enero del 2010

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT”

México D.F. a 7 de Enero del 2010

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

DEGRADACIÓN DE METANO EN REACTORES DE PARTICIÓN DE DOS FASES  
LÍQUIDAS Y ACUMULACIÓN DE PHB (POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO)

que presentó

IBT. Nancy Cristal Zúñiga Peña

Comité Tutorial:

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría

Asesor: Dr. Eduardo Torres Ramírez

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Vocal: Dr. Eduardo Torres Ramírez

Vocal: Dr. Guillermo Baquerizo Araya

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a mis padres por infundir en mí las ganas de estudiar, trabajar y superarme, además de su apoyo incondicional.

A mi hermana que gracias a su compañía y amistad hace que me sienta bien para seguir adelante.

Al Dr. Sergio Revah por haber permitido la realización de este trabajo en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y en el laboratorio de Procesos y Tecnología de la UAM-Cuajimalpa.

Muy en especial a la Dra. Marcia Morales por el apoyo, entusiasmo y fortaleza brindados, junto con el aporte de sus conocimientos y asesorías para poder concluir este trabajo.

Al Dr. Eduardo Torres quien asesoró el trabajo realizado.

Al Dr. Jorge Gracida por sus aportes y constante apoyo a lo largo del proyecto.

A José Rocha Ríos y Sylvie Le Borgne por su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

A CONACyT por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios.

Al Dr. Sergio Huerta y Guillermo Baquerizo por la revisión de este documento.

A mis compañeros de la maestría Donají, Carlina y Carlos, también a mis compañeros de la planta piloto U4, José, Gabriel, Armando, Sergio, Alma, Luis, Katia, Helen, Fernando y Guillermo. En el laboratorio W107, Uriel, Ulises, Matías, Ricardo, Ana, Jesús, Angélica y a todos los que si querer no nombre.

## RESUMEN

Las emisiones de gases que contribuyen al calentamiento global son un grave problema para los ecosistemas y la humanidad debido a sus implicaciones en el cambio climático. Durante las últimas décadas, el crecimiento demográfico y el desarrollo industrial han dado lugar a la acumulación de gases como el CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O que contribuyen al efecto de invernadero. El metano tiene un potencial de calentamiento global (PCG), que es 21-25 veces mayor que el CO<sub>2</sub>.

El metano es un gas de efecto invernadero, cuya concentración promedio en la atmósfera es de alrededor de 1760 ppbv. La degradación de metano ha sido estudiado principalmente en reactores de tanque agitado, biofiltros, biocubiertas y, recientemente, en reactores de partición de dos fases líquidas (TPPB), los cuales tienen como característica principal la adición de una fase no acuosa, como el aceite de silicón, la que aumenta la biodisponibilidad de CH<sub>4</sub> mediante la mejora en los procesos de transferencia de masa del sustrato de la fase gaseosa hacia los microorganismos.

En esta tesis, se estudió la degradación de CH<sub>4</sub> por un consorcio y una cepa aislada del mismo empleando un STR (reactor de tanque agitado) y un TPPB. Al mismo tiempo, se estudió la capacidad de los microorganismos para acumular PHB (poli-β-hidroxibutirato), biopolímero intracelular, biodegradable y con propiedades plásticas similares a las del polipropileno. El PHB se acumula cuando hay limitación de algunos elementos como fósforo y nitrógeno.

La primera etapa de la estrategia experimental consistió en aislar las cepas de un consorcio previamente adaptado al consumo de metano. 17 cepas con capacidad metanótrofa fueron aisladas y se mantuvieron en una atmósfera de CH<sub>4</sub>. El 75% de los aislados fueron Gram negativos. Las 10 cepas con mayor crecimiento sobre metano y metanol fueron elegidas.

Los aislados seleccionados fueron sometidos a una prueba cualitativa de acumulación de PHB. La tinción de fluorescencia mostró que cuatro cepas fueron capaces de acumular PHB, se calcularon las tasas específicas de consumo de CH<sub>4</sub> cuando las cepas no estaban limitadas por nitrógeno.

Posteriormente, se hizo una comparación entre las cepas aisladas y una cepa de colección, *Methylosinus trichosporium* OB3b que tiene una alta capacidad de la degradación de CH<sub>4</sub> (50 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y una acumulación de PHB de hasta 50% p p<sup>-1</sup>. Bajo las mismas condiciones experimentales, utilizando una concentración del metano en el aire 1%, uno de los aislados (C2) mostraron una acumulación de PHB de 56% p p<sup>-1</sup> en comparación con 24% p p<sup>-1</sup> de *Methylosinus trichosporium* OB3b. En cuanto a las tasas de degradación específicas de metano, el C2 alcanzó una tasa específica de consumo de metano de 60 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y *Methylosinus trichosporium* OB3b 77 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, otra cepa estudiada, C147 presentó una acumulación de PHB 21% p p<sup>-1</sup> y una tasa específica de consumo de 139 mg de CH<sub>4</sub> g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La conclusión de este experimento fue que algunos aislados, tales como C2, fueron capaces de acumular alto contenido de PHB con valores incluso más altos que los reportados para otros metanótrofos y que algunos microorganismos como el C147 tienen la capacidad de alcanzar altas tasas de degradación de CH<sub>4</sub>.

Los estudios continuaron a nivel reactor (STR y TPPB) utilizando el aislado C2 y el consorcio. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de entre 33 a 45% en la capacidad de eliminación para el reactor operado con el consorcio y la cepa, respectivamente, debido a la presencia de una fase orgánica en el TPPB.

Las tasas específicas para el consumo de metano fueron de 100 y 16.7 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para el aislado y el consorcio, respectivamente. Los resultados anteriores mostraron que la cepa C2 es más eficaz para el tratamiento de corrientes de gaseosas contaminadas con bajas concentraciones de CH<sub>4</sub>.

El consorcio acumuló el 36% p p<sup>-1</sup> de PHB, al principio de la acumulación de PHB hubo una disminución significativa en la producción de CO<sub>2</sub>, este fenómeno se observó en todos los experimentos con la limitación de nitrógeno y la acumulación de PHB. En el caso de la cepa C2, el efecto del aceite de silicón sobre la cantidad de PHB acumulado osciló entre 34 y 37% p p<sup>-1</sup> para el experimento de STR y TPPB, respectivamente lo que indico que no había efecto en la acumulación de PHB. Durante estos experimentos la velocidad específica de consumo de metano aumentó el 12,5% debido al aceite de silicón, las tasas fueron de 30 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en el STR y 45 mg g<sub>X</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> en TPPB. Estos resultados son comparables y en algunos casos,

superiores a los reportados en la literatura. La cepa C2 fue preliminarmente identificada por técnicas de biología molecular, como *Methylobacterium organophilum*.

Estos experimentos demostraron que durante el tratamiento de CH<sub>4</sub> es posible generar un producto con alto valor agregado, si el metabolismo celular se redirige a la producción de PHB y biomasa reduciendo de esta manera las emisiones de CO<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

The releases of gases that contribute to global warming are a serious problem to ecosystems and humanity for its implications for on the climate change. During the past decades, population growth and industrial development have resulted in accumulation of gases like CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions which contribute mainly to the greenhouse effect. The methane has a global warming potential (GWP) that is 21-25 times greater than CO<sub>2</sub>.

Methane is a greenhouse gas, whose average concentration in the atmosphere is about 1760 ppbv. The methane degradation has been studied mainly in stirred tank reactors, biofilters biocovers and just recently in the two phases partitioning bioreactors (TPPB); its main characteristic is the addition of a non-aqueous phase, such as silicone oil, which increases the CH<sub>4</sub> bioavailability to the microorganisms by improving the processes of mass transfer of substrate from the gas phase in to the microorganisms.

In this thesis, the degradation of CH<sub>4</sub>, by a consortium and a strain isolated from it, was studied using a STR (stirred tank reactor) and a TPPB. At the same time, we studied the ability of microorganisms to accumulate PHB (poly-β-hydroxybutyrate), intracellular biopolymer, biodegradable and plastic properties similar to polypropylene. The PHB accumulates mainly when there is limitation of some elements like nitrogen o phosphorus..

The first stage of the experimental strategy was to isolate the strains from a consortium previously adapted to methane consumption. 17 strains with methanotrophic capacity were isolated and they were maintained in an atmosphere of CH<sub>4</sub>. 75% of the isolates were Gram negative and 10 strains with higher cell growth on methane or methanol were chosen.

The isolates were qualitatively tested for the capability to accumulate PHB. The fluorescence staining showed that four strains were capable of accumulating PHB, also the specific consumption rates of CH<sub>4</sub> were calculated for the isolates grown under non- nitrogen restricted mineral medium.

Afterwards, a comparison was made between the isolates and a collection (ATCC) strain, *Methylosinus trichosporium* OB3b. It has a high capacity for CH<sub>4</sub> degradation of (50 mg gx<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) and a PHB accumulation of up 50% w w<sup>-1</sup>. At the same experimental conditions with a



methane concentration of 1% in air, one of the isolates (C2) showed a PHB accumulation of 56% w w<sup>-1</sup> compared to 24% w w<sup>-1</sup> of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Regarding to the specific degradation rates of methane, the C2 reached a specific rate of methane consumption 60 mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and *Methylosinus trichosporium* OB3b 77 mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, another studied strain, C147, has a PHB accumulation of 21% w w<sup>-1</sup> and a specific consumption rate of 139 CH<sub>4</sub> mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The conclusion of this experiment was that some isolated, such as C2, were able to accumulate high PHB content with values even higher than reported methanotrophs and some other have the ability to reach high CH<sub>4</sub> degradation rates, such as C147.

The studies continued at the 3-L reactor (STR and TPPB) using the C2 isolate and the consortium. The obtained results showed an increase between 33 - 45% on the elimination capacity for the reactor operated with the consortium and the strain, respectively due to the presence of an organic phase in the TPPB.

Specific rates for methane consumption were 100 and 16.7 mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> for the isolate and the consortium, respectively. The above results showed that the isolate C2 is more efficient for the treatment of contaminated gas streams with low CH<sub>4</sub> concentrations.

The consortium accumulated 36% w w<sup>-1</sup> of PHB and, at the beginning of PHB accumulation, there was a significant decrease on CO<sub>2</sub> production, this phenomenon was observed in all experiments with nitrogen limitation and accumulation of PHB. In the case of the tested strain, the effect of silicone oil on the amount of accumulated PHB ranged between 34 and 37% w w<sup>-1</sup> for the experiment in STR and TPPB, respectively. During those experiments the specific methane consumption rate increased 12.5% due to silicone oil in which the result was 30 mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the STR and 45 mg g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in TPPB. These results are comparable and, in some cases, higher than those reported in the literature. The isolate C2 was preliminarily identified by molecular biology techniques such as *Methylobacterium organophilum*. These experiments showed that during treatment of CH<sub>4</sub> is possible to generate a product with high value, if cell metabolism is redirected to the production of PHB and biomass to reduce CO<sub>2</sub> emissions.

## ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	American Type Culture Colecction
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BLE</b>	Biofiltro de lecho escurrido
<b>C147</b>	Microorganismo aislado
<b>C2</b>	Microorganismo aislado
<b>CE</b>	Capacidad de eliminación
<b>Ce</b>	Concentración de entrada ( $\text{g m}^{-3}$ )
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>COV</b>	Compuesto orgánico volátil
<b>Cs</b>	Concentración de salida ( $\text{g m}^{-3}$ )
<b>cSt</b>	Centi Stocks = $1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>EPS</b>	Sustancias exopoliméricas
<b>ER</b>	Eficiencia de remoción
<b>FADH</b>	Formaldehído deshidrogenasa
<b>FDA</b>	Formiato deshidrogenasa
<b>FID</b>	Detector de ionización de flama
<b>Gg</b>	Gigagramos $10^9 \text{ g}$
<b>GHG</b>	Gas de efecto invernadero
<b>IPCC</b>	Panel intergubernamental sobre el cambio climático
<b>MDH</b>	Metanol deshidrogenasa
<b>MMO</b>	Metano monoxigenasa
<b>pMMO</b>	Metano monoxigenasa pariculada
<b>sMMO</b>	Metano monoxigenasa soluble
<b>MMS</b>	Medio de sales minerales
<b>MW</b>	Medio Winogradsky
<b>OCDE</b>	Organización para el desarrollo económico en cooperación

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PHA</b>	Polihidroxialcanoato
<b>PHB</b>	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato
<b>PHB %</b>	Porcentaje del peso de polímero respecto a la biomasa total ( $100 * PHB * (X + PHB)^{-1}$ )
<b>PHBV</b>	Copolímero de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>PPBV</b>	Partes por millón por volumen equivale a $\mu\text{g m}^{-3}$
<b>PPMV</b>	Partes por millón por volumen equivale a $\text{mg m}^{-3}$
<b>PPTV</b>	Partes por millón por volumen equivale a $\text{ng m}^{-3}$
<b>Qg</b>	Caudal del aire + sustrato ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )
<b>R<sub>CH4/X</sub></b>	Velocidad específica de consumo de CH <sub>4</sub> ( $\text{mg}_{\text{CH}_4} \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ )
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>STR</b>	Reactor de tanque agitado
<b>Tg</b>	$10^{12} \text{ g}$
<b>TPPB</b>	Reactor de partición de fases líquidas
<b>Vr</b>	Volumen de trabajo del reactor ( $\text{m}^3$ )
<b>X</b>	Biomasa residual (Cuantificada por el método de Lowry)
<b>XT</b>	Biomasa total (X+PHB)

# Índice general

<b>Resumen</b>	V
<b>Abstract</b>	VIII
<b>Abreviaturas</b>	X

## 1. Introducción

## 2. Antecedentes

2.1 Calentamiento global	3
2.2 El metano un gas que propicia el efecto invernadero	4
2.2.1 Fuentes donde se genera metano	5
2.3 Métodos de tratamiento	7
2.3.1 Procesos naturales	7
2.3.2 Métodos químicos y biológicos	8
2.3.2.1 Métodos biológicos	10
2.4 Fisiología, bioquímica y taxonomía de los microorganismos degradadores de metano	15
2.5 Subproductos generados de la degradación de metano	18
2.5.1 Poli-hidroxi-butirato	19
2.5.1.1 Bioquímica de la síntesis de PHB por bacterias metanotróficas	20

## 3. Justificación

## 4. Objetivos

4.1 Objetivo general	23
----------------------	----

4.2	Objetivos particulares	23
<b>5. Metodología</b>		
5.1	Microorganismos	24
5.2	Medios de cultivo	24
5.3	Reactivos	26
5.4	Técnicas analíticas	26
5.4.1	Determinación de biomasa.	26
5.4.2	Determinaciones cromatográficas	26
5.5	Estrategia de investigación para el aislamiento y caracterización de las cepas puras (primera etapa)	27
5.5.1	Aislamiento de las cepas a partir de un consorcio	27
5.5.2	Características morfológicas de las cepas aisladas	28
5.5.3	Pruebas de crecimiento sobre metano y metanol.	28
5.5.4	Selección de los microorganismos con mejores velocidades específicas de eliminación de metano.	29
5.5.5	Selección de los microorganismos con capacidad de acumulación de PHB.	30
5.5.6	Comparación de las cepas aisladas con <i>Methylophilus</i> <i>trichosporium</i> OB3b ATCC 49242	30
5.6	Experimentos en reactor de tanque agitado con cepas seleccionadas (segunda etapa)	31
5.6.1	Características de los reactores	31
5.6.2	Experimentos planteados para cada población metanotrófica.	32
5.7	Evaluación del desempeño de los reactores	34
5.8	Identificación de las cepas aisladas	34

## **6. Resultados y discusión**

6.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos metanotróficos	35
6.1.1 Aislados y sus características morfológicas.	35
6.1.2 Pruebas de crecimiento con metano o metanol.	37
6.1.3 Velocidades específicas de consumo de metano y pruebas cualitativas de acumulación de PHB.	38
6.1.4 Comparación de las cepas aisladas con <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b ATCC 49242.	39
6.2 Resultados de los experimentos del consorcio y cepa C2 en el reactor de tanque agitado	43
6.2.1 Efecto del aceite de silicón sobre la CE, producción de CO <sub>2</sub> y ER del consorcio.	43
6.2.2 Efecto de la limitación de N sobre la CE, ER, producción de CO <sub>2</sub> , y de PHB con el consorcio.	47
6.2.3 Operación del reactor STR con la cepa C2	51
6.2.4 Efecto de la limitación de N sobre la CE, ER, producción de CO <sub>2</sub> , y de PHB con la cepa C2.	53
6.2.5 Comparación de los resultados obtenidos entre la cepa C2 y el consorcio.	59
6.3 Identificación de la cepa aislada C2	63

## **7. Conclusiones**

## **8. Perspectivas**

## **Apéndices**

A. Método de Lowry.	65
---------------------	----

B. Tinción de Gram.	65
C. Determinación de PHB (prueba cualitativa) Tinción con azul del Nilo A (tinción fluorescente para identificar poly- $\beta$ -hidroxibutirato) [Ostle y Holt, 1982].	66
D. Determinación de PHB (prueba cuantitativa) Adaptaciones a los métodos propuestos por Braunegg et al., 1978; Riis y Mai, 1988.	66
E. Ajustes por el modelo de Gompertz.	67
F. Determinación de la DQO del medio de empleado durante los experimentos de acumulación de PHB.	68

## **Bibliografía**

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Concentraciones de metano en los últimos siglos, deducido a partir de la mediciones de burbujas en hielo [Wahlen, 1993].	4
<b>Figura 2.</b> Fuentes de metano expresadas en Teragramos/año y el porcentaje de su contribución a las emisiones totales.	5
<b>Figura 3.</b> Evolución de las fuentes principales de metano durante el siglo XX.	7
<b>Figura 4.</b> Intervalos de aplicación de métodos químicos y biológicos [Revah y Ortiz, 2004].	10
<b>Figura 5.</b> Representación de un sistema bifásico y uno convencional.	13
<b>Figura 6.</b> Relaciones filogenéticas entre la eubacterias rosas-moradas y algunos metilótrofos basados en las secuencias 16s rRNA.	17
<b>Figura 7.</b> Ruta de mineralización de metano.	18
<b>Figura 8.</b> Degradación de metano y acumulación de PHB, en metanótrofos tipo I y II [Zhang <i>et al.</i> , 2008].	21
<b>Figura 9.</b> Esquema general de la metodología.	33
<b>Figura 10.</b> Pruebas cualitativas de PHB vistas a 320 nm en un microscopio de epifluorescencia (izquierda si + (C147), derecha si ++++ (C2)).	39
<b>Figura 11.</b> Capacidad de eliminación del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).	44
<b>Figura 12.</b> Eficiencia de remoción del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).	45
<b>Figura 13.</b> Velocidad de producción de CO <sub>2</sub> del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).	45
<b>Figura 14.</b> Velocidad de específica de consumo de metano del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).	46
<b>Figura 15.</b> CE, ER y producción de CO <sub>2</sub> del consorcio en un STR (reactor de tanque agitado sin aceite de silicón) limitado por nitrógeno.	48
<b>Figura 16.</b> Biomasa <sub>residual</sub> , producción de PHB y velocidad específica de consumo de CH <sub>4</sub>	49



<b>Figura 17.</b> Comportamiento de la cepa C2 en el STR.	52
<b>Figura 18.</b> Capacidad de eliminación de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).	54
<b>Figura 19.</b> Producción de CO <sub>2</sub> de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB)	54
<b>Figura 20.</b> Eficiencia de remoción de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB)	55
<b>Figura 21.</b> Velocidad específica de consumo de metano de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases	56
<b>Figura 22.</b> Producción de PHB y comportamiento de la biomasa residual de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB)	57
<b>Figura 23.</b> Perfil de acumulación de PHB de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB)	57
<b>Figura 24.</b> Comparación de la cepa con el consorcio en un STR	59
<b>Figura 25.</b> Comparación de la cepa con el consorcio cuando estaban limitadas por nitrógeno	60

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales gases que contribuyen al efecto invernadero [Khalil <i>et al.</i> , 1999]	3
<b>Tabla 2.</b> Tecnologías químicas y biológicas para eliminar compuestos orgánicos presentes en efluentes gaseosas	8
<b>Tabla 3.</b> Degradación de CH <sub>4</sub> en biocubiertas y biofiltros (*Biofiltro de lecho escurrido)	11
<b>Tabla 4.</b> Algunas características de las bacterias metanotróficas	16
<b>Tabla 5.</b> Medio de sales minerales (MMS)	25
<b>Tabla 6.</b> Medio de sales minerales recomendado para la cepa ATCC 49242	25
<b>Tabla 7.</b> Medio de sales Winogradsky (MW)	25
<b>Tabla 8.</b> Medio Luria	25
<b>Tabla 9.</b> Características morfológicas de colonias desarrolladas en placas de agar [Ramírez <i>et al.</i> , 2008]	28
<b>Tabla 10.</b> Microorganismos aislados del consorcio metanotrófico	36
<b>Tabla 11.</b> Resultados de las pruebas de actividad sobre metano ó metanol (Las cepas marcadas con * fueron las seleccionadas para realizar las cinéticas)	37
<b>Tabla 12.</b> Velocidades máximas de consumo de CH <sub>4</sub> y acumulación de PHB	39
<b>Tabla 13.</b> Velocidades de consumo de metano y capacidad de acumulación de PHB de las cepas aisladas y la cepa tipo	40
<b>Tabla 14.</b> Producción de PHB por varias bacterias	41
<b>Tabla 15.</b> Balances de los experimentos realizados con el consorcio	50
<b>Tabla 16.</b> Balances de materia para los experimentos realizados con la Cepa C2	58
<b>Tabla 17.</b> Comparación de los resultados del presente estudio con resultados obtenido por otros autores, en cuanto a la producción de PHB con microorganismos metanotróficos a partir de metanol.	61

# 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire representa un grave problema para la población ya que propicia el efecto invernadero que contribuye al cambio climático y genera alteraciones a los ecosistemas. El efecto del cambio climático varía dependiendo de la vulnerabilidad tanto de la población como del medio ambiente y ha favorecido la aparición de enfermedades como la malaria, dengue y cólera en lugares donde anteriormente no se presentaban. En nuestros días, los daños generados por el cambio climático son palpables a través de la presencia de graves inundaciones, tormentas severas, sequías y climas extremos. Se cree que el cambio climático tendrá efecto sobre la demografía, debido a la migración forzada de la población.

Durante el siglo XVIII y XIX la industrialización y el crecimiento de la población repercutió en la acumulación de gases como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  que contribuyen al efecto invernadero. Aunque los países y organizaciones mundiales emiten leyes y acuerdos para la regulación de las emisiones, el trabajo es difícil y lo acumulado es demasiado.

La biotecnología ambiental trabaja en pro del desarrollo de tecnologías para controlar la emisión de gases a la atmósfera; así se ha acuñado el término bio-remediación, definida por la OCDE (por sus siglas en inglés, Organización para el Desarrollo Económico en Cooperación), como el conjunto de métodos biológicos aplicables al tratamiento de materiales contaminados (aire, suelo, agua, residuos sólidos, etc.); en este marco, el presente trabajo pretende contribuir en la búsqueda de soluciones al problema que genera el metano ( $\text{CH}_4$ ), gas de efecto invernadero, el cual tiene un potencial global de calentamiento entre 21-25 veces mayor que el  $\text{CO}_2$ .

El metano es producido por bacterias bajo condiciones anaerobias en ambientes húmedos como pantanos, lodos, plantaciones de arroz, rellenos sanitarios, también es producido por el ganado vacuno durante su digestión y como resultado de la extracción y refinación de petróleo.

Existen diferentes configuraciones de reactores biológicos para eliminar metano: reactores de tanque agitado, biofiltros, biolavadores, biocubiertas. Donde una configuración emergente para la degradación de metano son los reactores de partición de dos fases líquidas, la cual

consiste en agregar una fase orgánica inmiscible, como aceite de silicón o hexadecano a una fase acuosa, en donde se encuentran los microorganismos responsables de degradar metano, con esto se mejora la transferencia de masa y disponibilidad del  $\text{CH}_4$  para los microorganismos.

Durante los estudios de degradación de  $\text{CH}_4$ , se descubrió que ciertos microorganismos metanotróficos son capaces de almacenar Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), polímero biodegradable, el cual es almacenado bajo limitación de algunos nutrientes excepto la de carbono.

Hoy en día existe una tendencia a producir compuestos con valor agregado a partir de residuos o productos de desecho. Sólo por citar dos ejemplos, la producción de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos y la obtención de biomasa (proteínas para alimento de ganado) a partir de una corriente gaseosa contaminada con etanol.

En esta tesis se estudia la eliminación de metano en un reactor de mezcla completa por un consorcio metanotrófico previamente obtenido en el grupo de trabajo. Se explora el potencial de ciertas bacterias aisladas de ese consorcio tanto para la degradación de metano como para la acumulación de PHB, evaluando paralelamente la influencia de la presencia de una segunda fase no miscible sobre estos dos aspectos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CALENTAMIENTO GLOBAL

A partir de la revolución industrial en el siglo XVIII y hasta la actualidad la composición atmosférica de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O ha excedido los valores que se dieron durante los 10,000 años previos. El incremento en la concentración de los gases ha provocado la absorción y reemisión de radiación infrarroja hacia la atmósfera y la superficie de la tierra, generando el aumento de la temperatura del planeta en aproximadamente 0.6 °C durante el siglo XX. Esta tendencia se ha atribuido a la acumulación de CO<sub>2</sub> y de otros gases en la atmósfera derivados de la actividad humana [Hansen y Makiko, 2001]. Los principales compuestos que contribuyen al calentamiento global son CO<sub>2</sub> con 0.44 °C, el CH<sub>4</sub> con 0.2 °C, N<sub>2</sub>O con 0.01 °C y CFC-11 & CFC-12 con 0.02 °C.

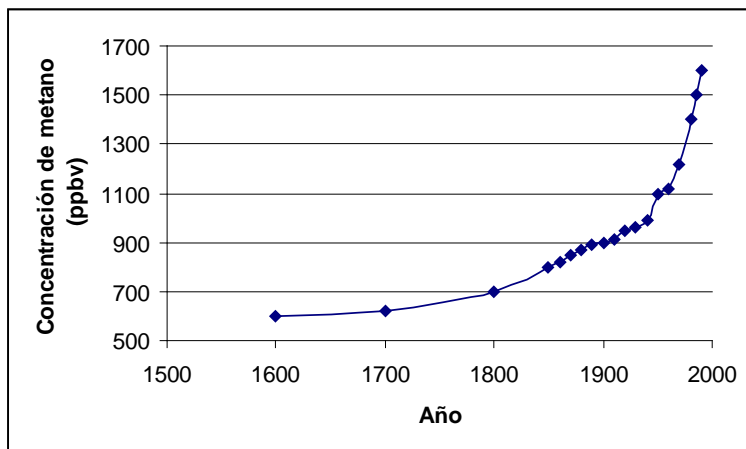
La siguiente tabla muestra a los principales gases del efecto invernadero y sus características.

**Tabla 1.** Principales gases que contribuyen al efecto invernadero [Khalil, 1999].

Especies	Concentración		Velocidad de Incremento (% por año)	Tiempo de decaimiento (año)	Contribución relativa a CO <sub>2</sub> (Mol <sup>-1</sup> )	Contribución al efecto invernadero (%)
	Preindustrial	Presente				
CO <sub>2</sub>	280 ppmv	360 ppmv	1.4	250	1	60-70
CH <sub>4</sub>	700 ppbv	1760 ppbv	2.8	8-12	25	21-25
N <sub>2</sub> O	285 ppbv	311.5 ppbv	0.8	120	200	5
SF <sub>6</sub>	0	3.4 pptv	0.27	3200	2000	8
CFC-11	0	275 pptv	-1.3	50	12000	4
CFC-12	0	515 pptv	4.6	100	15000	8

## 2.2 EL METANO UN GAS QUE PROPICIA EL EFECTO INVERNADERO

El metano ( $\text{CH}_4$ ) es el hidrocarburo más simple atómicamente y más estable. Está presente en la naturaleza y es el compuesto orgánico más abundante en la atmósfera, su potencial global de calentamiento es entre 21-25 veces mayor que el del  $\text{CO}_2$  [Nikiema *et al*, 2006], su vida media en la atmósfera es de 12 años y es muy poco soluble en  $\text{H}_2\text{O}$  ( $28 \text{ mg L}^{-1}$ ). El metano está incluido en el Protocolo de Kyoto pero en menor peso comparado con el  $\text{CO}_2$ . El Panel Intergubernamental sobre el cambio climático (PICC) estima que es posible reducir el efecto del metano sobre el calentamiento global en los próximos 50 años, si nuevas tecnologías se aplican para la colección de metano en la extracción de petróleo, en los rellenos sanitarios, la minería, producción de gas y en las lagunas anaerobias de control de desechos. Una vez colectado el metano es posible removerlo mediante algún método químico o biológico [Hansen y Makiko, 2001]. Las emisiones fugitivas de metano en México fueron de 14,211 Gg asociadas a las emisiones durante la producción de petróleo y gas natural. La tendencia del incremento mundial de  $\text{CH}_4$  se presenta en la Figura 1 [SMARNAT, INE, 2006].



**Figura 1.** Concentraciones de metano en los últimos siglos, deducido a partir de la mediciones de burbujas en hielo [Wahlen, 1993].

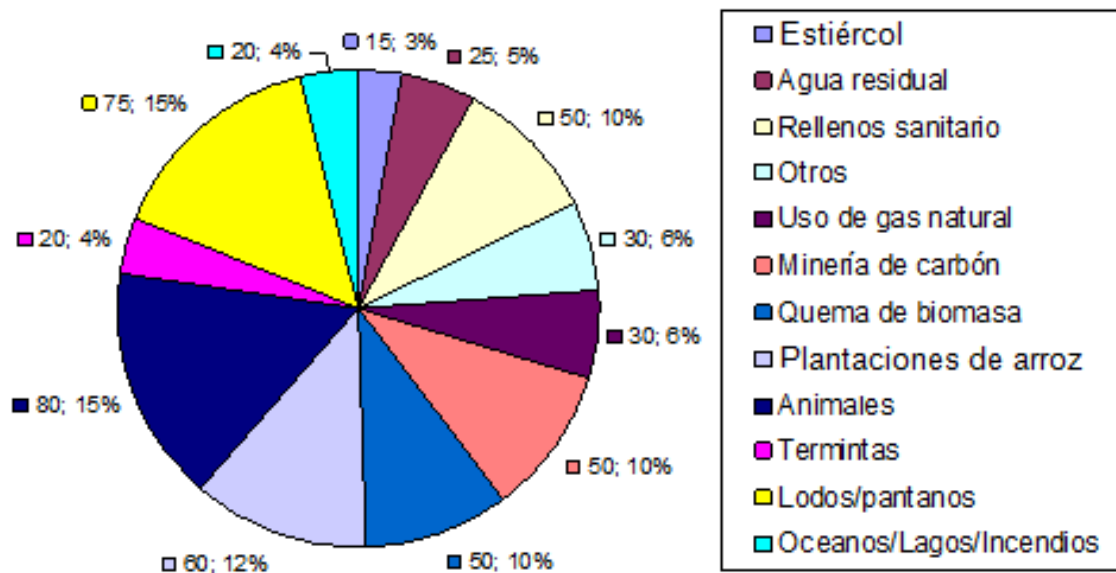
El límite de explosividad del metano está entre 5-15 % en aire [Apel *et al*, 1990], lo que implica que la operación de procesos en este intervalo de concentraciones tiene un riesgo latente de explosión, como es el caso de la exploración de minas y la extracción de gas natural.

### 2.2.1 FUENTES DONDE SE GENERA METANO

El metano es resultado de la digestión anaerobia de materia orgánica, éste es producido por microorganismos presentes en ambientes anóxicos con disponibilidad de compuestos orgánicos, los procesos metabólicos se dividen en tres pasos:

1. Los polímeros de la materia orgánica son hidrolizados a monómeros.
2. Esas moléculas son fermentadas y producen compuestos orgánicos solubles; a través de convertir  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  a formiatos, acetatos y alcoholes principalmente.
3. El acetato y otros ácidos orgánicos son entonces metabolizados a metano y  $\text{CO}_2$ , por microorganismos metanogénicos, que pertenecen al dominio *Archaea*.

La acidificación y generación de metano son procesos sincronizados por asociaciones mutualistas de microorganismos. Se han identificado 12 fuentes diferentes de metano, las cuales se presentan en la Figura 2.



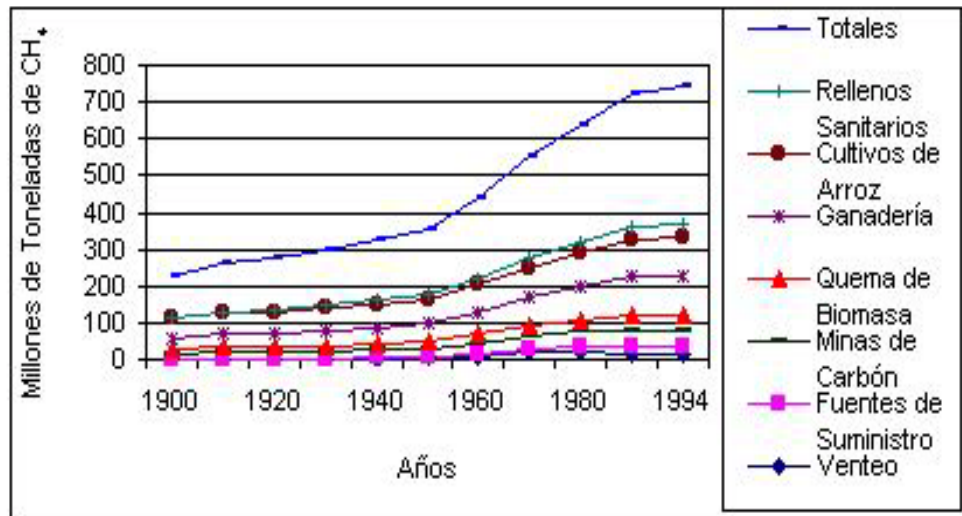
**Figura 2.** Fuentes de metano expresadas en Teragramos/año y el porcentaje de su contribución a las emisiones totales.

Los principales lugares en donde se genera metano se describen a continuación:

- En ambientes subterráneos que son explotados durante actividades mineras de extracción de carbón. El metano es un peligro latente debido a que al combinarse con el oxígeno del aire, puede llegar a un nivel de explosividad (5-15 % en aire).
- Durante la extracción y refinación de petróleo, como un gas de desecho, y también en la extracción y distribución del gas natural [SEMARNAT, INE, 2006].
- Los campos de arroz son la mayor fuente de metano que no puede ser controlada por el hombre. Éstos se encuentran inundados por extensos periodos de tiempo, propiciando condiciones anaerobias para las bacterias que producen metano. Reportes recientes estiman que el metano emitido por los campos de arroz está entre el 10-20% con 50-100 Teragramos año<sup>-1</sup>. La producción de metano en plantaciones de arroz se incrementará ya que la producción de arroz crece entre 1.6-2.8 % cada año desde 1940 [Watanabe *et al.*, 1997].
- En los estómagos de los rumiantes durante la fermentación de los alimentos, la producción anual de CH<sub>4</sub> por esta fuente es 80 Teragramos año<sup>-1</sup>[Watanabe *et al.*, 1997].
- Los rellenos sanitarios son una alternativa donde se eliminan desperdicios sólidos de manera local, también se pueden eliminar desechos industriales, lodos y residuos agrícolas [Hurst *et al.*, 2005]. El biogás es resultado de la degradación anaerobia de desperdicios orgánicos, que han sido colocados en rellenos sanitarios. La producción global de metano por este origen es de 30-70 Teragramos año<sup>-1</sup>.

En la Figura 3 se presentan las emisiones de CH<sub>4</sub> en los últimos 94 años, de acuerdo con sus fuentes emisoras, destacando la contribución de la crianza de ganado y el cultivo de arroz, siguiendo en importancia la quema de biomasa, los rellenos sanitarios y las minas productoras de carbón, finalmente, las emisiones fugitivas resultantes del manejo y almacenamiento de combustibles [Arvizu, 2005].





**Figura 3.** Evolución de las fuentes principales de metano durante el siglo XX.

## 2.3 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Existen diferentes procesos naturales de eliminación de metano, además de los métodos de tratamiento ideados por el hombre. Ambos contrarrestan el metano producido en las diferentes fuentes.

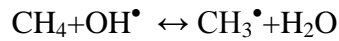
En el caso del metano proveniente de los pantanos, plantaciones de arroz y el procedente de animales los procesos naturales son muy efectivos ya que en estos lugares no es posible coleccionar al metano. Por otra parte, los métodos químicos y biológicos pueden tratar al metano generado en fuentes fijas. El límite de explosividad es un factor muy importante para discernir entre los diferentes métodos como la incineración o un método biológico, ya que si la cantidad de CH<sub>4</sub> en aire no está entre el 5 -15 % en aire no es posible incinerarlo, si la concentración de metano está por arriba del 15 % es necesario diluirlo para que pueda ser incinerado.

### 2.3.1 PROCESOS NATURALES

Durante los procesos naturales se elimina CH<sub>4</sub> gracias a la actividad microbiana presente en la tierra. Estos procesos son la única manera de controlar el metano producido en lugares donde no es posible confinarlo o tratarlo y así prevenir su efecto sobre el calentamiento global.

## ATMÓSFERA

El metano es removido de la tropósfera y estratósfera, gracias a las reacciones de oxidación iniciadas por los radicales OH<sup>•</sup>:



La reacción anterior promueve la formación de formaldehído, hasta convertirlo en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, consumiendo los radicales OH<sup>•</sup>. El metano eliminado por esta vía es de 540 Tg año<sup>-1</sup>. La desventaja es que los radicales OH<sup>•</sup> son constantes y la cantidad de metano en la atmósfera aumenta cada día [Reinoud, 1998].

## AGUA Y SUELOS

Las bacterias metano oxidantes conocidas como metanótrofas son aerobias y están distribuidas en el suelo y agua principalmente. Ellas son importantes reguladoras del flujo de metano de la biósfera a la atmósfera [Gunnar *et al.*, 2004]. Se ha calculado que el metano emitido anualmente es de 700 Tg año<sup>-1</sup>, y que la reducción gracias a la acción de los microorganismos es de 30 Tg año<sup>-1</sup> [Pawlowska *et al.*, 2006].

### 2.3.2 MÉTODOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.

En la tabla 2 se muestran algunas tecnologías para eliminar compuestos orgánicos como el metano [Revah y Morgan, 2005].

**Tabla 2.** Tecnologías químicas y biológicas para eliminar compuestos orgánicos presentes en efluentes gaseosos.

Tecnología	Principio	Consideraciones
Absorción	El contaminante es transferido del gas a un líquido absorbente por un gradiente de concentración. Las soluciones absorbentes incluyen agua, sosa caústica, aminas y algunos hidrocarburos. El absorbente empleado dependerá de las características de solubilidad de	La eficiencia depende de la solubilidad del contaminante, que también depende de la temperatura, presión y el pH. Pueden lograrse con

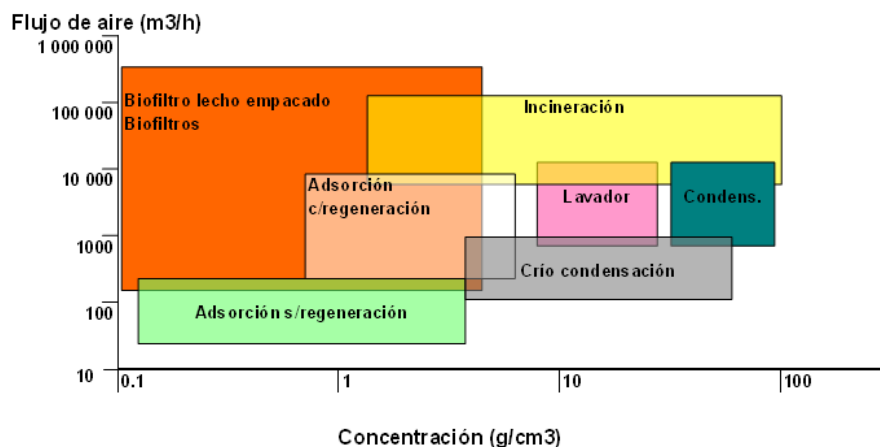
Lavadores químicos	<p>los compuestos orgánicos volátiles (COV) a remover.</p> <p>Proceso de absorción con reacción. Se usa para controlar olores oxidando los contaminantes con hipoclorito u otro oxidante químico. El oxidante se consume al reaccionar por lo que es necesario agregarlo continuamente.</p>	<p>torres de aspersión o empacadas.</p> <p>Se pueden generar compuestos indeseables por la oxidación química parcial. Pueden ser torres de aspersión o empacadas.</p>
Incineración	<p>Los contaminantes son oxidados a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en quemadores. Se requiere generalmente una corriente de combustible suplementario. Pueden emitirse además NO<sub>x</sub>, CO, HCl y otros COV potencialmente peligrosos.</p>	<p>La combustión sólo es posible cuando la concentración de metano en el aire está dentro los límites de explosividad [Apel <i>et al.</i>, 1990]</p>
Membranas selectivas	<p>El aire contaminado pasa a través de membranas selectivas en donde los COV son selectivamente absorbidos y concentrados.</p>	<p>Tecnología emergente, altos costos.</p>
Oxidaciones avanzadas	<p>Uso de oxidantes más potentes (UV, O<sub>3</sub>) o catalizadores que generan (TiO<sub>2</sub>) para oxidar a los contaminantes del aire.</p>	<p>Tecnología emergente de alto costo.</p>
Sistemas biológicos,	<p>Los contaminantes son mineralizados (H<sub>2</sub>O, S, SO<sub>4</sub>, CH<sub>4</sub>, NO<sub>x</sub>, HCl) por medio de microorganismos que se encuentran inmovilizados o en suspensión.</p>	<p>Comprenden sistemas como biocubiertas, biofiltros, éstos son de gran interés por los bajos costos de operación; incluye reactores de partición de dos fases [Muñoz <i>et al.</i>, 2007; Rocha <i>et al.</i>, 2009]</p>

### 2.3.2.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

#### BIOFILTROS Y BIOCUBIERTAS

La biofiltración es una tecnología viable para el control de la contaminación del aire proveniente de fuentes estacionarias. Algunas configuraciones de reactor para el tratamiento de efluentes gaseosos son: biofiltros, biofiltros de lecho escurrido y biolavadores, los cuales representan soluciones económicamente atractivas y efectivas, útiles para el tratamiento de contaminantes en bajas concentraciones. Estas tecnologías se basan en la habilidad natural de microorganismos para convertir contaminantes orgánicos a dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos y biomasa [Revah y Ortiz, 2004]. La biofiltración ofrece una ventaja muy grande al operar a presión atmosférica normal y temperatura ambiente [Nikiema *et al.*, 2007]. Desafortunadamente, la biofiltración no es apropiada cuando la actividad microbiana es inhibida (ej. altas concentraciones de COV que pueden ser tóxicas) o cuando existen limitaciones de transferencia de masa de los contaminantes y del oxígeno desde la fase gas a la fase sólida o líquida [Muñoz *et al.*, 2007]. Aunado a lo anterior, la biofiltración puede presentar problemas como formación de canales y dificultad para mantener las condiciones homogéneas para la fase biótica [Revah y Ortiz, 2004], y puede ocurrir taponamiento en los biofiltros de lecho escurrido o cuando existe una alimentación periódica de nutrientes por exceso de producción de biomasa.

Dentro de las ventajas de los biofiltros es que pueden tratar eficientemente corrientes con alto flujo y baja concentración de contaminante en comparación con otros métodos de eliminación [Figura 4].



**Figura 4.** Intervalos de aplicación de métodos químicos y biológicos [Revah y Ortíz, 2004].

En los biofiltros se considera que el proceso es satisfactorio cuando se llega a la mineralización.

Si bien desde el punto de vista de eliminación de contaminantes por métodos biológicos es aceptable, la controversia surge debido a que estos procesos producen CO<sub>2</sub> que es también un gas del efecto invernadero (GHG por sus siglas en inglés). Sin embargo debido a que parte del carbono es utilizado para crecimiento (biomasa), las emisiones de CO<sub>2</sub> son menores comparadas con tecnologías como la incineración donde todo el carbono se va hacia la producción de CO<sub>2</sub>. [Nikiema *et al.*, 2006].

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en diferentes experimentos con biocubiertas y biofiltración.

Las biocubiertas son capas de composta madura que contienen a los microorganismos metanótrofos. Éstas presentan diversas ventajas operacionales como una área de tratamiento grande, alta retención para aumentar la eficiencia de oxidación y una larga duración para flujos bajos de metano. Otra ventaja de esta tecnología es su aplicación *in situ* en el tratamiento de metano procedente de la extracción del gas natural o de rellenos sanitarios. En la Tabla 3 se muestra el intervalo de eliminación de metano por unidad de área, en el caso de las biocubiertas, el rango está entre 0.3-16 g m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.** Degradación de CH<sub>4</sub> en biocubiertas y biofiltros.

Biocubiertas		Biofiltros	
CE (g m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	Referencia	CE (g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	Referencia
2.0	Whalen <i>et al.</i> , 1990	21	Sly <i>et al.</i> , 1993
0.3	Jones y Nedwell, 1993	20	Streese y Stegman, 2003
5-7	Kightley <i>et al.</i> , 1995	29.2	Nikiema <i>et al.</i> , 2006
1-16	Humer y Lechner, 1999	22 <sup>(a)</sup> TBR	Rocha <i>et al.</i> , 2009
		51 <sup>(b)</sup> TBR-TPPB	

<sup>(a)</sup>Biofiltro de lecho escurrido, <sup>(b)</sup> Biofiltro de lecho escurrido con aceite de silicón

En el caso de los biofiltros la capacidad de eliminación en su configuración normal es de hasta  $29.2 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ ; cuando se agregó aceite de silicón en ese biofiltro de lecho escurrido, la Capacidad de eliminación (CE) aumentó a  $51 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  [Rocha *et al.*, 2009]. En algunos biofiltros se ha observado que la temperatura en el lecho del biofiltro se incrementa, esto a consecuencia de la reacción de biodegradación dentro de los rellenos sanitarios o sistemas que tratan efluentes con altas cargas de contaminantes [Nikiema *et al.*, 2006, Morales *et al.*, 1998]. En particular se ha observado que la temperatura puede influir sobre las poblaciones presentes e influenciar la composición de los lípidos en las bacterias, lo anterior se observó en un cultivo puro de *Methylococcus capsulatus* [Gunnar *et al.*, 2004].

Para el caso de biofiltros metanotróficos acoplados a rellenos sanitarios, su actividad puede disminuir debido a los cambios en la presión parcial del metano y oxígeno, lo que significa que la población metanótrofa es regularmente privada del metano y oxígeno por largos periodos [Gerbert *et al.*, 2003; Gunnar *et al.*, 1998].

## **REACTORES DE PARTICIÓN DE DOS FASES LÍQUIDAS**

El tratamiento de COV en un bioreactor se basa en la capacidad aerobia de los microorganismos heterotróficos para usarlos como fuente de carbono y energía. Esto implica que los contaminantes y el oxígeno deben ser transferidos de la fase gaseosa a la fase acuosa donde ellos pueden ser metabolizados por los microorganismos.

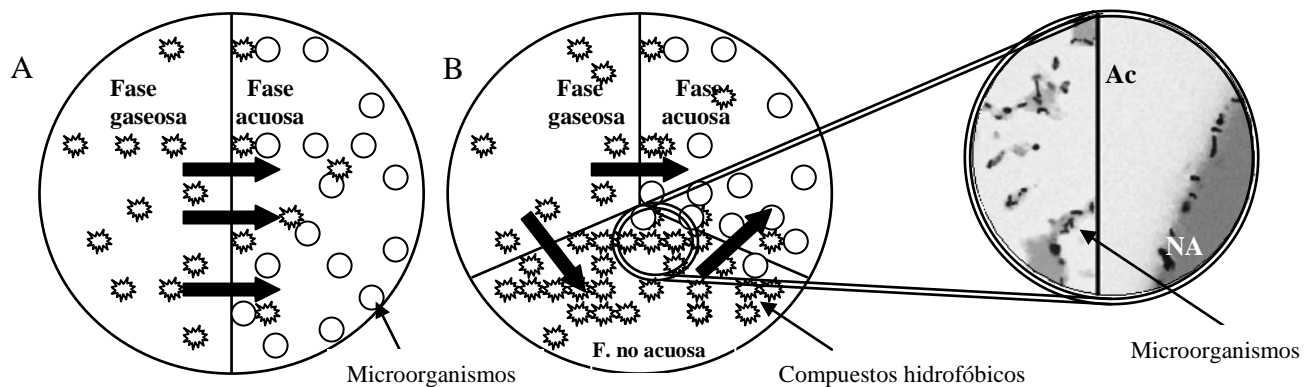
Los reactores de partición con dos fases líquidas o reactores bifásicos, TPPBs (por sus siglas en inglés, Two-Phase Partitioning Bioreactor), surgieron a finales de los 80s, su finalidad fue superar dos aspectos de las limitaciones encontradas en los sistemas de remoción de contaminantes: la alta toxicidad de algunos sustratos o productos celulares que resultan en la inhibición microbiana y además en el deterioro de la actividad catalítica; la otra limitación superada es la baja afinidad por el agua de los sustratos poco solubles en fase acuosa [Arriaga *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007].

Los TPPBs son una modificación, a cualquier configuración de reactor, que consiste en adicionar una segunda fase. Esto se ha aplicado recientemente en tanques agitados y biofiltros de lecho escurrido. Su uso se ha propuesto para reducir la limitación debida a la transferencia

de masa, que se presenta regularmente en tratamientos biológicos con gases y vapores poco solubles en agua, los TPPBs pretenden extender el intervalo de aplicación biológica en el tratamiento de aire contaminado.

Los reactores de dos fases contienen una fase no acuosa (ej. Hexadecano, aceite de silicón) agregados a una fase acuosa. La fase no acuosa mejora la transferencia de los COV hidrofóbicos y oxígeno a los microorganismos, ésta deberá ser no biodegradable, no volátil, inmisible y biocompatible con el contaminante a fin de tener buena partición. Una fase orgánica que ha demostrado cumplir con todas propiedades es el aceite de silicón. Sin embargo, el uso de aceite de silicón tiene como inconveniente su elevado costo.

La Figura 5 muestra el transporte de sustratos hidrofóbicos como el metano y el oxígeno en: A) Un sistema convencional (fase gas-líquido) donde la remoción de los contaminantes está limitada por la transferencia del sustrato de la fase gas hacia la fase acuosa. En este caso el coeficiente de partición del metano en agua es de 33.5 [Zenhao *et al.*, 1992], con una solubilidad de  $22.5 \text{ mg L}^{-1}$  y B) Un reactor de partición de dos fases líquidas (acuosa-orgánica) donde globalmente la cantidad de sustrato en el sistema se incrementa debido a la presencia de una fase orgánica. En este caso el metano es más soluble en la fase orgánica, que en la acuosa presentando un coeficiente de partición  $3.2 \pm 0.2$  en aceite de silicón [Rocha *et al.*, 2009].



**Figura 5.** Representación de un sistema A) convencional (fase gas- fase acuosa) y B) un reactor de partición (fase gas-fase no acuosa (NA)- fase acuosa (Ac)); se muestra la interacción de los microorganismos con la fase NA, fotografía tomada de Carolan *et al.*, 2005.

En el caso del TPPB se cree que algunos microorganismos pueden adherirse a la fase no acuosa y consumir el sustrato directamente de ella. De acuerdo a los estudios de Carolan *et al.*, 2005, una gran parte de las bacterias están asociadas a la fase orgánica y están localizadas cerca de la interface acuosa-orgánica de donde toman los elementos necesarios para su crecimiento [Figura 5].

#### Aplicaciones recientes de los reactores de dos fases

Estudios previos de Daugulis, 2001; Arriaga *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007 han confirmado que la adición de una segunda fase orgánica puede incrementar hasta en 100 veces la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa de sistemas biológicos, mejorando significativamente la eficiencia de remoción en las diferentes configuraciones de reactor utilizadas.

Como se mencionó anteriormente entre las configuraciones de bioreactor disponibles para el tratamiento y control de la contaminación del aire están: biofiltros, biofiltros de lecho escurrido y biolavadores, que tienen un costo accesible, pero los reactores bifásicos presentan mejores capacidades de eliminación que los biofiltros, esto se ha demostrado para el tratamiento de efluentes donde se eliminan sustratos como benceno, tolueno, hexano y estireno [Arriaga *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007].

En un estudio realizado en la UAM-Iztapalapa se comparó la CE de un reactor de lecho escurrido y un tanque agitado, ambos sistemas son inoculados con bacterias metanotróficas. Se comprobó que la adición de un agente acuoso inmisible al 10 % en  $v v^{-1}$  en el medio mejoraba un 41% la CE del tanque agitado, presentando un incremento en la CE de 75 a 106  $g m^{-3} h^{-1}$ , bajo esta situación la velocidad máxima específica de consumo de metano fue de 25  $mg g_x^{-1} h^{-1}$  y hubo un aumento del 131% en la CE del biofiltro de lecho escurrido (Tabla 3) donde la tasa específica de consumo de metano mayor fue de 15  $mg g_x^{-1} h^{-1}$  [Rocha *et al.*, 2009].



## 2.4 FISIOLÓGÍA, BIOQUÍMICA Y TAXONOMÍA DE LOS MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE METANO

Las bacterias encargadas de la degradación de metano (CH<sub>4</sub>) se conocen como metanótrofas. Ellas son generalmente Gram-negativas y constituyen un sub-grupo de metilótrofos dentro de los géneros gama y alfa de las proteobacterias, ya que se especializan en la degradación de compuestos que tienen un solo átomo de carbono, lo utilizan como donador de electrones y como única fuente de carbono para la generación de energía [Madigan *et al.*, 2003].

Los organismos metanotróficos se agrupan en tres clasificaciones dependiendo de la forma como asimilan el carbono.

Los estudios filogenéticos de 16S rRNA han confirmado la diferencia entre metanótrofos, tipo I y tipo II [Gunnar *et al.*, 2004], los metanótrofos tipo I crecen más rápido que los tipo II cuando el nitrógeno inorgánico no es una limitante [Visscher y Cleemput, 2003], los tipo X conjugan características tanto de los organismos del tipo I como del tipo II.

Pertencen al tipo I: *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacterium*, *Methylocaldum*, *Methylophaga*, *Methylosarcina*, *Methylothermus*, *Methylohalobius* y *Methylosphaera*; que asimilan formaldehído por la ruta de la ribulosa monofosfato y sus membranas celulares están principalmente hechas de ácidos grasos de 14 y 16 carbonos. Estos microorganismos están clasificados como aerobios obligados.

Al Tipo II pertenecen: *Methylocystis*, *Methylocella*, *Methylocapsa* y *Methylosinus*, que usan la ruta de la serina para la asimilación de formaldehído (intermediario en la degradación de CH<sub>4</sub>), sus membranas contienen ácidos grasos de 18 carbonos organizados en la periferia de la célula; el género *Methylocella* también puede usar otros compuestos como acetato, piruvato, malato y etanol. Estas son bacterias aerobias facultativas [Asenjo y Suk, 1986].

Las bacterias del Tipo X se agrupan dentro del género *Methylococcus*, que combina propiedades de los tipos I y II, es decir, utiliza ácidos grasos de hasta 16 carbonos y la asimilación de formaldehído hacia dos rutas el ciclo de la ribulosa monofosfato y la ruta de serina [Donovan *et al.*, 2005].

La mayoría de los metanótrofos pertenecen a los microaerófilos obligados, prefiriendo concentraciones de oxígeno menores a la atmosférica [Pawlowska, 2006], dentro de los tres

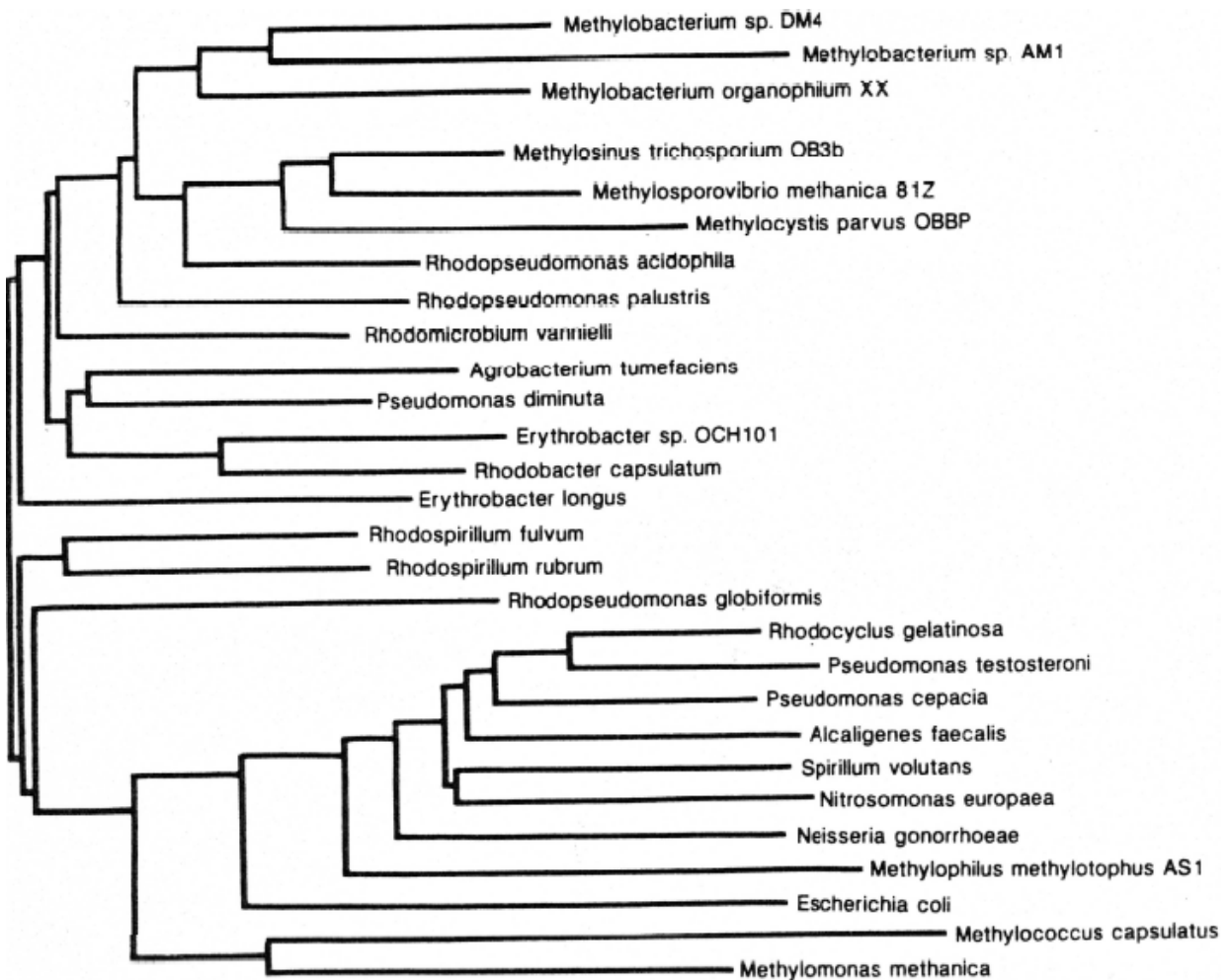
tipos, existen bacterias termófilas, acidófilas, alcalófilas y halófilas. En la Tabla 4 se presentan algunas características microscópicas de las bacterias metanotróficas.

**Tabla 4.** Algunas características de las bacterias metanotróficas [Madigan *et al.*, 2003].

Organismo	Morfología	Grupo 16S rRNA	Forma de resistencia	Ruta de asimilación de C	Fijación del N <sub>2</sub>	DNA (GC mol %)
<i>Methylomonas</i>	Bacilo	$\gamma$	Cuerpos con cistes	Ribulosa monofosfato	No	50-54
<i>Methylomicrobium</i>	Bacilo	$\gamma$	Ninguno	Ribulosa monofosfato	No	49-60
<i>Methylobacterium</i>	De coco a cocobacilo	$\gamma$	Cuerpos con cistes	Ribulosa monofosfato	No	50-54
<i>Methylococcus</i>	Coco	$\gamma$ y $\alpha$	Cuerpos con cistes	Ribulosa monofosfato	Sí	62-64
<i>Methylosinus</i>	Bacilo o vibriode	$\alpha$	Exospora	Serina	Sí	63
<i>Methylocystis</i>	Bacilo	$\alpha$	Exospora	Serina	Sí	63
<i>Methylocella</i>	Bacilo	$\alpha$	Exospora	Serina	Sí	61

Los microorganismos metilótrofos; *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Methylobacterium organophilum* XX y *Methylocystis parvus* OBBP se han estudiado por sus capacidades sobresalientes para degradar metano o metanol y acumular polímeros biodegradables, cuando estos dos sustratos se utilizan como única fuente de carbono y energía. Debido a las relaciones filogenéticas entre las eubacterias rosas-moradas, se puede establecer un acercamiento con otros géneros de microorganismos que producen polímeros biodegradables asimilando fuentes de carbono diferentes, como *Wautersia* que utiliza glucosa o sacarosa. En la Figura 6 se muestran las relaciones con otras especies. Una gran parte de la capacidad metanotrófica se debe a que los microorganismos son capaces de sintetizar la enzima metano monoxigenasa (MMO), ésta es la pieza clave de la descomposición del metano. Existe en dos formas: MMO

particulada (pMMO) y MMO soluble (sMMO); la pMMO está presente en todos los metanótrofos conocidos [Murrell y Radajewski, 2000]. Se sabe que los metanótrofos tipo I tienen principalmente pMMO, que tienen un crecimiento más rápido y son más específicas para metano que las que tienen sMMO (tipo II y X). Aunque pMMO se desarrolla rápidamente es más sensible a la variación en los nutrientes como cobre, nitrógeno y la concentración de metano, esto puede ser un criterio para seleccionar algún tipo de bacterias en especial.



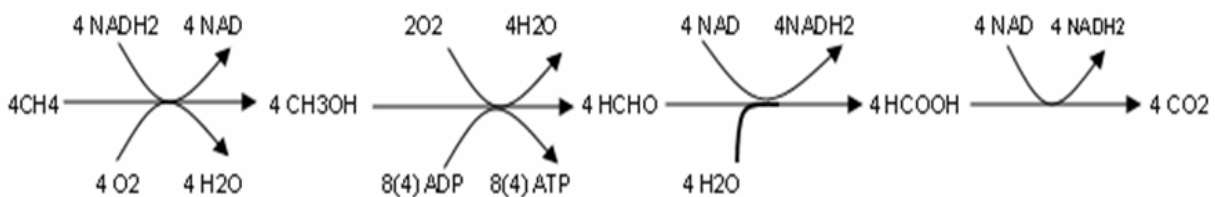
**Figura 6.** Relaciones filogenéticas entre la eubacterias rosas-moradas y algunos metilótrofos basados en las secuencias 16S rRNA.

Por otro lado, la sMMO es muy estable en varios ambientes, la más extensa caracterización de la enzima sMMO dice que contiene una hidroxilasa que está formada de tres componentes (A, B y C) formando un complejo [Stainthorpe *et al.*, 1990; Murrell y Radajewski, 2000]. Existen diferentes estudios a nivel macro en donde se han determinado las concentraciones óptimas de los cofactores involucrados con la actividad MMO como son  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  [Shah *et al.*, 1996; Wendland *et al.*, 2001; Helm *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008].

## 2.5 SUBPRODUCTOS GENERADOS DE LA DEGRADACIÓN DE METANO

Las bacterias metanótrofas han atraído considerable interés, por sus aplicaciones potenciales para la producción de proteína celular simple y polímeros exocelulares, en la síntesis orgánica y la degradación de hidrocarburos alifáticos clorados [Bilbo *et al.*, 1992]; todo con el objetivo de producir compuestos con valor agregado a partir de residuos. Las bacterias metanótrofas juegan un papel muy importante en el ciclo global del carbono [Donovan *et al.*, 2005], también en los procesos de bio-remediación tal como la degradación del metano producido de manera anaerobia, y para la producción en grandes cantidades de químicos como metanol a partir de sustratos baratos [Murrell y Radajewski, 2000].

El metano degradado por métodos biológicos puede ser mineralizado a través de una serie de reacciones, donde la enzima más estudiada es la metano monooxigenasa, primera enzima involucrada en la degradación. En la Figura 7 se muestra su mineralización. Por otra parte, se han encontrado bacterias metanótrofas, que son capaces de producir polímeros exocelulares e intracelulares simultáneamente durante su ciclo natural de vida.



**Figura 7.** Ruta de mineralización de metano.

Basados en las investigaciones en laboratorio se sabe que la velocidad de oxidación de metano declina a partir de la formación de sustancias exopoliméricas (EPS) [Bilbo *et al.*, 1992]. La síntesis de exopolisacáridos en bacterias depende de la proporción carbono/nitrógeno del medio, cabe mencionar que los metanótrofos termotolerantes son los productores más activos de EPS.

Los productores de EPS que usan gas natural son: *Methylomonas rubra* 15sh, *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100 y *Methylobacter luteus* 12b; en principio, éstos son usados para obtener EPS en la industria petrolera en plantas móviles usando los gases ricos en metano [Malashenko *et al.*, 2001].

Dentro de los subproductos generados a partir de metano está el PHB (Poli- $\beta$ -hidroxibutirato), el cual es un polímero biodegradable.

#### 2.5.1 POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB).

El PHB, es un polihidroxialcanoato (PHA), el más estudiado de este tipo de poliésteres, una gran variedad de microorganismos bajo limitación de nitrógeno y fosfato pueden acumular PHB siempre y cuando la fuente de carbono esté en exceso o no sea un limitante. Este es un biopolímero natural, biodegradable y tiene propiedades térmicas similares a los plásticos sintéticos como el polipropileno (PP), fue el primer miembro de los PHAs identificado y estudiado a detalle.

El PHB tiene alta cristalinidad (55-80 %), su temperatura de fusión es de 175 °C, tiene propiedades como resistencia a la humedad y pureza óptica. La degradación del PHB se da en 4 semanas, mientras la degradación de polipropileno tarda cientos de años [Lee *et al.*, 1995]. El PHB se almacena en forma de gránulos intracelulares, como fuente de reserva de energía esto se ha observado en metanótrofos tipo I y II [Wilshusen *et al.*, 2004].

El PHB por sus características biodegradables tiene aplicaciones biomédicas en la producción de hilos, alfiles, suturas y grapas quirúrgicas, para tapar heridas, reemplazar huesos y láminas dentro de un cuerpo, también se utiliza para la lenta liberación de medicamentos y puede ser sustituto de tejido muerto o no funcional; otras aplicaciones son en la manufactura de artículos como máquinas de afeitar, utensilios, pañales, productos para la higiene femenina,

contenedores de cosméticos, shampoo, etc.; también puede usarse para empacar comida y en la encapsulación de agroquímicos como insecticidas, fertilizantes y herbicidas además es un intermediario para la síntesis de varias drogas.

Sin embargo el precio del PHB está de entre 15-30 dólares por kilo [Serafim *et al.*, 2004] y dado que se ha estimado que 30% del valor de su producción corresponde a la fuente de carbono podría estimarse una reducción en su precio, de esa misma magnitud, por el uso de una fuente sin valor y alto impacto ambiental como lo es el metano [Choi y Lee, 1997].

#### 2.5.1.1 BIOQUÍMICA DE LA SÍNTESIS DE PHB POR BACTERIAS METANÓTROFICAS

La ecuación para la síntesis de PHB a partir de CH<sub>4</sub> es:



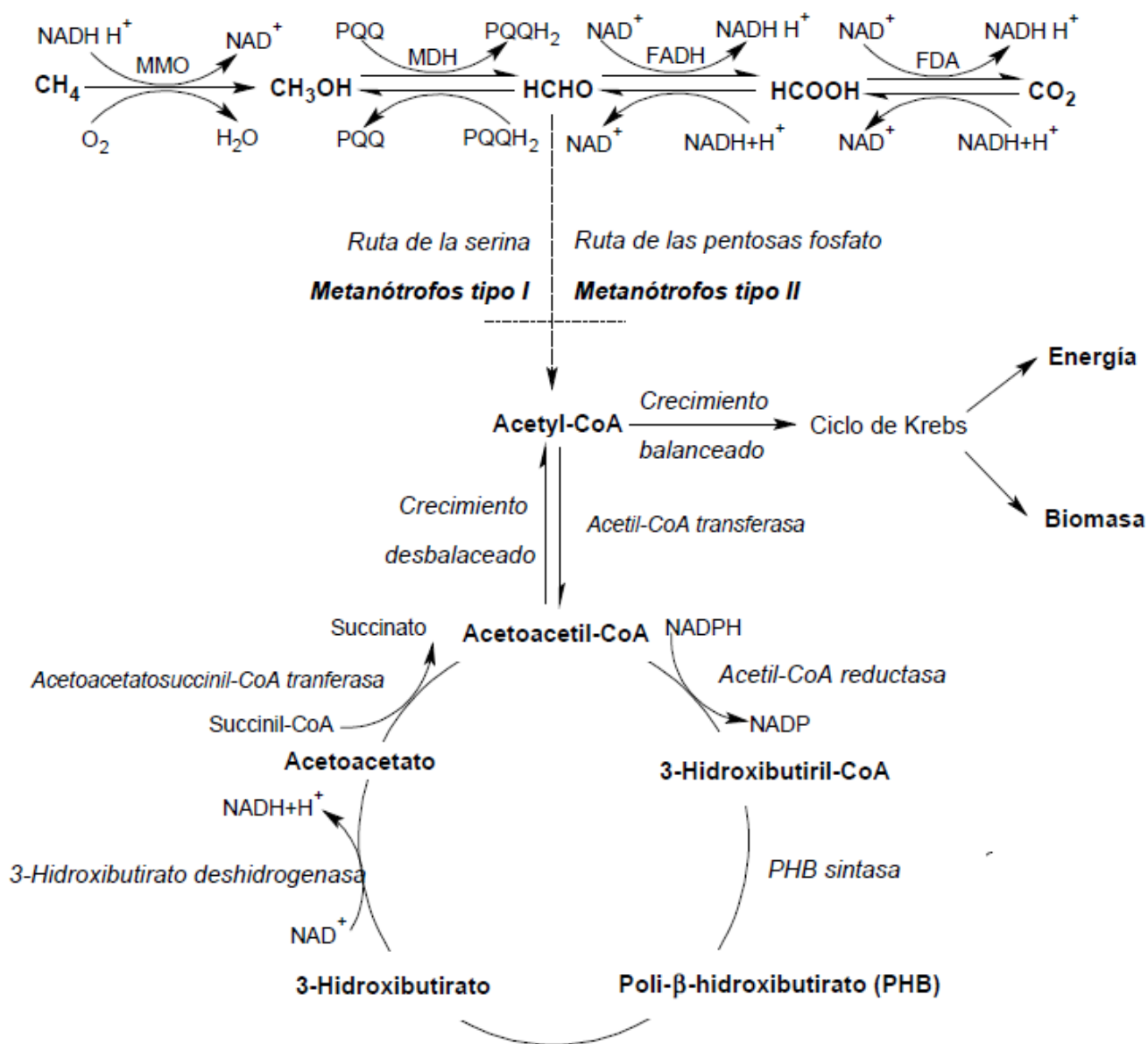
En la Figura 8 se muestra la ruta de degradación del CH<sub>4</sub> y la producción del PHB. Dicha ruta muestra que el crecimiento celular depende de la producción de energía intracelular (ATP) durante la oxidación de metano. Lo anterior implicaría que el carbono removido se dirigiría a la síntesis de biomasa cuando no hay limitación por nutrientes [Xing *et al.*, 2006]. El conocimiento y análisis de la ruta ha dirigido a la implementación de diferentes acciones con la finalidad de incrementar ya sea la degradación de metano o la acumulación de PHB.

De esta manera se ha reportado que el citrato tiene un efecto positivo sobre la degradación de CH<sub>4</sub>, cuando la concentración de citrato es de 0.3 g L<sup>-1</sup>, puede satisfacer el ciclo de Krebs, lo que mejoraría la acumulación de PHB. Bajo estas condiciones la síntesis de biomasa se vería inhibida y los flujos de carbono serían redirigidos hacia la acumulación de PHB [Zhang *et al.*, 2008].

Además del incremento en la productividad se ha visto la necesidad de mejorar algunas propiedades del PHB ya que existen algunas desventajas: la primera es su bajo punto de fusión y la baja elasticidad que es del 5% comparada con el polipropileno que es de 400%.

Por lo cual es un polímero frágil, se han realizado varios intentos por disminuir esta característica introduciendo algunos monómeros.

En un estudio realizado por Días *et al.*, 2005 se probó el efecto de la adición de propionato sobre el tipo de PHA acumulado, teniendo como resultado la acumulación de copolímeros de  $\beta$ -hidroxibutirato y  $\beta$ -hidroxivalerato (PHBHV), este experimento se realizó con un consorcio que tenía como fuente de carbono acetato, el resultado obtenido fue un PHA con menor fragilidad.



**Figura 8.** Degradación de  $\text{CH}_4$  y acumulación de PHB, en metanótrofos Tipo I y II [Zhang *et al.*, 2008].

## 4. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa para abatir los problemas causados por el efecto invernadero es reducir la cantidad de gases emitidos a la atmósfera como el metano. El metano es el segundo gas que más contribuye al efecto invernadero y es generado en diversos procesos industriales como la extracción y refinación de petróleo, durante la extracción de gas natural, en rellenos sanitarios, plantaciones de arroz, por rumiantes y campos inundados o pantanos principalmente.

Hay bacterias que mineralizan el metano y también existen bacterias capaces de sintetizar compuestos de interés industrial como el PHB, teniendo al metano como única fuente de carbono. Este tipo de bacterias están dentro del grupo de las metanótrofas.

El proceso estudiado en esta tesis pretende disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero ya que una parte del carbono del metano será destinado a la producción de biomasa y PHB en lugar de ser mineralizado.

En el laboratorio de emisiones gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidades Iztapalapa-Cuajimalpa, se adaptó y estudió un consorcio capaz de degradar metano, el cual fue ensayado en dos configuraciones de reactor, biofiltro de lecho escurrido y tanque agitado. Sin embargo, no se abordó el estudio de las poblaciones microbianas presentes en el consorcio y su capacidad para degradar individualmente al  $\text{CH}_4$  ya que es posible que algunos de los microorganismos tengan mayor eficiencia estando aislados que dentro de un consorcio. La mejora se puede ver reflejada tanto en sus tasas de consumo de metano como en su capacidad de acumular PHB.

Profundizando en estos aspectos el estudio propuesto en este trabajo de tesis contribuirá al mejoramiento del tratamiento del metano y a la síntesis de compuestos de alto valor agregado. Lo anterior considerando que se producirá a partir de una fuente de carbono gratuita y de alto impacto ambiental.

Es por ello que en este trabajo se determinarán qué cepas metanotróficas dentro del consorcio, previamente obtenido, tienen mejores resultados en cuanto a la degradación de metano y acumulación de PHB. Para ello se utilizarán reactores de partición de dos fases (TPPB) que son una alternativa innovadora para el tratamiento de efluentes gaseosos poco solubles.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la degradación de metano en un reactor de dos fases inoculado con poblaciones metanotróficas y determinar si dichos microorganismos tienen la capacidad de acumular PHB.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Caracterizar del reactor operado con el consorcio para la degradación de metano
2. Determinar y caracterizar a las poblaciones microbianas aisladas del consorcio en cuanto a su capacidad metanótrofa y de acumulación de PHB
3. Estudiar el efecto que tiene la limitación de nitrógeno sobre la acumulación de PHB en las bacterias aisladas del consorcio.
4. Estudiar el efecto de un agente no acuoso (aceite de silicón) sobre la eliminación de metano, el crecimiento de microorganismos y acumulación de PHB

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 MICROORGANISMOS

Para realizar el aislamiento se partió de un consorcio de microorganismos metanótrofos previamente adaptado al consumo de CH<sub>4</sub> y estudiado por Rocha *et al.*, 2009, el cual fue obtenido de la planta de tratamiento de aguas residuales de la UAM-Iztapalapa (México, D.F.).

Se adquirió la cepa *Methylosinus trichosporium* OB3b de ATCC (por sus siglas en inglés, American Type Culture Collection) depositada con el número 49242. La cual pertenece al Phylum *Proteobacteria*, Clase “*Alphaproteobacteria*” a la Familia “*Methylocystaceae*” Género “*Methylosinus*”. Este microorganismo es un metanótrofo tipo II, con gran capacidad de acumulación de PHB, aerobio, mesófilo, neutrófilo y no soporta condiciones de halofilia. El tamaño del microorganismo es de 0.5-1.5 x 1.5-3.0 µm.

### 5.2 MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo del consorcio se utilizó el medio de sales minerales (MMS) descrito por Aaronson, 1970; cuya composición aparece en la Tabla 5. Para la cepa *Methylosinus trichosporium* OB3b se utilizó el medio recomendado por ATCC el cual se presenta en la Tabla 6 y será identificado a lo largo de la tesis como MMS ATCC. En los estudios de limitación por N se utilizó el medio Winogradsky (MW) presente en la Tabla 7. Todos los compuestos de cada medio fueron disueltos en 1L de agua destilada y el pH se ajustó a 7 utilizando NaOH 0.2 N y HCl 0.3 N [Brenner *et al.*, 2005].

**Tabla 5.** Medio de sales minerales (MMS)

Compuesto	Cantidad
NaNO <sub>3</sub>	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.2 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1.0 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	90 mg
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	5 µg
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	70 µg
MoO <sub>3</sub>	10 µg
KCl	40 µg
CaCl <sub>2</sub>	15 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µg
MnSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	10 µg
H <sub>2</sub> O	1 L

**Tabla 6.** Medio de sales minerales recomendado por ATCC (MMS ATCC).

Compuesto	Cantidad
KHPO <sub>4</sub>	0.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.54 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1.0 g
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	4.0 mg
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	100 µg
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	30 µg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	300 µg
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	200 mg
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	10 µg
NiCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	20 µg
NaMoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	60 µg
H <sub>2</sub> O	1 L

**Tabla 7.** Medio de sales Winogradsky  
(MW)

Compuesto	Cantidad
KHPO <sub>4</sub>	0.25 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.125 g
NaCl	0.25 g
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.5 mg
Mn(SO <sub>4</sub> )	2.5 mg
H <sub>2</sub> O	1 L

**Tabla 8.** Medio Luria

Compuesto	Cantidad
Extracto de Levadura	5.0 g
Bacto Triptona	10.0 g
NaCl	8.7 g
H <sub>2</sub> O	1 L

### 5.3 REACTIVOS

- Gas Metano al 99.9% de Praxair, México.
- Azul del Nilo A (Sigma-Aldrich, USA).
- Aceite de silicón [poly(dimethylsiloxane) 200 fluido con una viscosidad de 20 cSt y densidad de 0.95 g mL<sup>-1</sup>] fue adquirido de Sigma-Aldrich (USA), compuesto no biodegradable ni tóxico para los microorganismos.
- PHB e Hidroxibutirato (Sigma-Aldrich, USA).
- Dicloroetileno 99.9% (JT Backer)
- 1-Propanol 99.9% (JT Backer)

### 5.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 5.4.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA.

La concentración de biomasa residual (X) en las botellas serológicas y el reactor se determinó por el método de Lowry. En el caso de los experimentos con limitación de N, la biomasa total (X<sub>T</sub>) será el resultado de la suma de la X cuantificada por el método de Lowry más la cantidad de PHB estimada por CG. El método de Lowry es un método indirecto, que cuantifica la cantidad de proteína soluble; el contenido de proteína es el 50% de X, este dato fue corroborado al realizar una comparación entre el peso seco y la cantidad de biomasa estimada con el método de Lowry.

Las muestras se hidrolizan con NaOH 0.2 N en baño maría y se usó un espectrofotómetro con  $\lambda=540$  nm (UV/Vis Lambda 11, Perkin-Elmer, Alemania), el detalle de esta técnica se encuentra en el Apéndice A.

#### 5.4.2 DETERMINACIONES CROMATOGRÁFICAS.

La concentración de metano se midió en un cromatógrafo de gases con detector FID (Agilent Technologies, 6890N, Palo Alto, CA, USA) equipado con una columna AT-WAX 25 m × 0.25 mm × 0.25  $\mu$ m (Alltech, Deerfield, IL, USA) . Los flujos de helio (gas acarreador), hidrógeno y aire fueron de 25, 40 y 250 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. A su vez, la concentración

de CO<sub>2</sub> fue medida usando el mismo cromatógrafo con una columna Porapak Q 80/100 6' × 1/8" y un detector TCD cuyo flujo de helio (gas acarreador) es de 20 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas del inyector, horno y ambos detectores se mantuvieron a 250, 70 y 210°C, respectivamente. El volumen de inyección en todas las determinaciones fue de 0.1 mL.

Para medir el PHB se utilizó el mismo cromatógrafo con el detector FID con los mismos flujos especificados anteriormente.

La temperatura del horno fue de 160 °C, las del detector e inyector de 250 °C y 200 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL, se modificaron los procedimientos propuestos por Riis y Mai (1988) y Braunegg (1978) para la extracción del polímero y posterior esterificación de los monómeros para poder cuantificarlos por cromatografía de gases.

## **5.5 ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS PURAS (PRIMERA ETAPA)**

### **5.5.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS A PARTIR DE UN CONSORCIO**

Se tomó una alícuota del consorcio, se realizaron diluciones desde 10<sup>-1</sup>-10<sup>-6</sup> en solución salina. Se tomaron 100 µL de cada dilución y fueron esparcidas por medio de perlas de vidrio sobre cajas petri con MMS gelificado con 14 g L<sup>-1</sup> de goma gellan. Las cajas se incubaron a 30 °C en atmósfera de metano utilizando un desecador, lo que permitió que los microorganismos presentes consumieran metano como única fuente de carbono, una vez observado crecimiento se realizó la resiembra por estriado en cuadrante radial para aislar a los microorganismos, las placas sembradas se guardaron a 30 °C en atmósfera de metano; a manera de controles se colocaba una copia de cada caja fuera del desecador, prueba que permitiría realizar el aislamiento de microorganismos metanótrofos únicamente.
















Después de varios pases de estría en cuadrante radial en placa, se comprobó la pureza de los aislados al crecerlos en tubos de 15 mL con 3 mL de medio Luria, la composición del medio se muestra en la Tabla 8.

Una vez detectado crecimiento, el producto de los tubos de 15 mL se cultivó en agar bacteriológico por extensión en placa usando perlas de vidrio, este procedimiento se realizó con cada microorganismo aislado.

### 5.5.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

Las cepas se caracterizaron por algunos métodos clásicos, como morfología colonial y tinción de Gram. El procedimiento ejecutado para realizar la tinción de Gram se muestra en la Apéndice B. En la Tabla 9 se muestran las características morfológicas del crecimiento bacteriano, cuando los microorganismos son cultivados en medio sólido.

**Tabla 9.** Características morfológicas de colonias desarrolladas en placas de agar [Ramírez *et al.*, 2008].

Tipo	Característica				
Forma	a) Puntiforme 	b) Circular 	c)Amiboide 	d)Rizoide 	e) Fusiforme 
Bordes	a) Entero 	b) Ondulado 	c)Lobulado 	d)Crenado 	e)Filamentoso 
Elevación	a) Plana 	b)Elevada 	c)Convexa 	d)Rugosa 	e)Umbonada 
Textura	a)Viscosa	b)Membranosa	c)Butirosa	d) Seca	
Color	a)Blanquecino	b)Amarillo	c)Rosa	d)Tornasol	e) Etcétera

### 5.5.3 PRUEBAS DE CRECIMIENTO SOBRE METANO Y METANOL.

En botellas serológicas de 25 mL se agregaron 3 mL de MMS, los dispositivos fueron cerrados con tapones de plástico y aros de aluminio. Las unidades de estudio se esterilizaron adjuntando tres controles, un control de esterilidad y otro para garantizar que no hubiera fuga

de sustrato gaseoso a lo largo del experimento. Los controles fueron monitoreados para metano y metanol.

Posteriormente se añadió una asada de cada microorganismo en su respectiva unidad de estudio perfectamente etiquetada, esto se realizó por duplicado en condiciones de esterilidad.

Para adicionar los sustratos, en el caso del CH<sub>4</sub> se desplazaron 10 mL de aire y se sustituyeron con 10 mL de metano; para el metanol se agregaron 30 µL a cada unidad de estudio, todo se guardó a 30 °C con una agitación de 180 rpm durante 15 días, después se observó el comportamiento de los controles una vez comprobada la esterilidad del medio y que los controles de sustrato se mantuvieron, el crecimiento se registró cualitativamente a través de espectrofotometría a 660 nm.

#### 5.5.4 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON MEJORES VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE ELIMINACIÓN DE METANO.

Las pruebas se realizaron bajo condiciones de esterilidad en botellas serológicas y matraces de 125 mL con 20 mL de MMS, los dispositivos fueron cerrados con válvulas Mininert (VICI). Se extrajeron 3 mL de aire de la fase gaseosa de la unidad de estudio que fueron sustituidos por 3 mL de metano. Los microcosmos se inocularon con los microorganismos que presentaban mejor crecimiento durante el experimento realizado con metano y metanol, la cantidad de biomasa inicial fue de 2 mg a cada botella, de igual manera se corrieron controles de esterilidad del medio y presencia de sustrato.

El experimento duró 350 h aproximadamente y se midió el CH<sub>4</sub> cada 24 h. Los experimentos se mantuvieron a una agitación de 180 rpm y 30 °C. Al iniciar y finalizar el experimento se midió la cantidad de biomasa presente.

El consumo de metano se ajustó al modelo de Gompertz para determinar las velocidades máximas de consumo de metano y posteriormente las tasas específicas de consumo de metano [Acuña *et al.*, 1999], este modelo nos permite realizar una aproximación con base en los datos generados y sus errores a las velocidades máximas de consumo de sustratos o generación de productos, cuando estos datos tienen un comportamiento sigmoideo, el fundamento teórico del modelo se muestra en la Apéndice E.

### 5.5.5 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE PHB.

Las cepas con mayor crecimiento sobre CH<sub>4</sub> y metanol se cultivaron bajo limitación de nitrógeno en medio MW (Tabla 7). Los microorganismos se crecieron previamente en un medio rico en nitrógeno (MMS); después fueron centrifugados a 13000 rpm por 5 min y resuspendidos en medio MW, el procedimiento de lavado de nitrógeno se repitió dos veces. Posteriormente se transfirieron a un matraz que contenía MW (20 % del volumen total). El medio MW es un medio sin nitrógeno, esto propicia un cambio en el metabolismo celular concluyendo en la acumulación de carbono, hidrógeno y oxígeno en forma de PHB, por lo tanto la acumulación de PHB no está asociada al crecimiento y es por eso que no se considera el cambio en la cantidad de biomasa residual presente.

Los matraces se airearon una vez por semana y se les adicionó el 10 % de metano v v<sup>-1</sup> en aire cada vez. Después de 30 días de cultivo se realizó la técnica cualitativa con Azul de Nilo A, técnica de fluorescencia que detecta la presencia de PHB mediante observaciones directas al microscopio, este procedimiento se realizó para identificar si los microorganismos aislados eran capaces de acumular PHB (Apéndice C).

### 5.5.6 COMPARACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS CON *Methylosinus trichosporium* OB3b ATCC 49242

Las cepas aisladas que presentaron mejores capacidades de eliminación y con la habilidad de acumular PHB se cultivaron en medio MW al igual que la cepa tipo.

Como primer paso se realizó la propagación de las cepas, la propagación de los aislados se hizo en medio de sales mineral MMS y en el caso de la cepa tipo se utilizó el medio recomendado por ATCC, el proceso de propagación duro 15 días.

Las cepas propagadas se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min y se resuspendieron en medio MW dos veces. Posteriormente se transfirieron a un matraz que contenía MW en un 20% del volumen total, se desplazó el 10% de aire presente en la botella y se sustituyó por metano.

Se determinó la cantidad de biomasa inicial y final por el método de Lowry. Se monitoreó el CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por CG durante el consumo de la primera adición de CH<sub>4</sub> para tener una concentración del 10% en el headspace. Con esta cinética se calcularon las velocidades



específicas de consumo de metano y producción de CO<sub>2</sub> de cada microorganismo. Una vez concluida la primer cinética los matraces fueron aireados una vez por semana y se les readicionaba metano para tener una concentración de 10% v v<sup>-1</sup> en aire cada vez.

Después de 40 días de cultivo se determinó la cantidad de PHB acumulada mediante la técnica cromatográfica de PHB (Apéndice D).

## **5.6 EXPERIMENTOS EN REACTOR DE TANQUE AGITADO CON CEPAS SELECCIONADAS (SEGUNDA ETAPA)**

Una vez seleccionada la cepa con mejores velocidades de degradación de metano y con capacidad de acumulación de PHB, se hizo una comparación entre el consorcio y la cepa aislada en un reactor de partición de dos fases líquidas, donde se analizó el efecto del aceite de silicón al 10% v v<sup>-1</sup> en el medio, esta cantidad de aceite de silicón fue la óptima recomendada y ensayada por Arriaga *et al.*, 2006, Muñoz *et al.*, 2007 y Rocha *et al.*, 2009. Como variables respuesta se midió el consumo de CH<sub>4</sub>, producción de CO<sub>2</sub> y PHB. Estos experimentos se planearon para comprobar el efecto del agente inmisible (aceite de silicón) presente en la fase acuosa sobre las variables respuesta anteriormente mencionadas.

Se plantearon otros experimentos donde se estudió la capacidad de los microorganismos para acumular PHB y también el efecto del aceite de silicón sobre el proceso de acumulación del polímero. A continuación se muestran las características de los reactores utilizados y los experimentos realizados en cada caso. Cabe mencionar que se trató de igualar las condiciones de operación para ambos reactores y que la cantidad de metano alimentada fue la misma.

### **5.6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS REACTORES.**

Para los estudios con el consorcio se utilizó un reactor BIOFLO III (New-Brunswick Inc.) con capacidad de 3.5 L (volumen de trabajo, 2 L) y una agitación de 500 rpm. El flujo del gas fue de 0.42 L min<sup>-1</sup> (Correspondiente a 0.21 VVM y un tiempo de residencia de 4.8 min<sup>-1</sup>), la carga promedio para los experimentos fue de 74 g<sub>CH<sub>4</sub></sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>.

Para los experimentos con la cepa aislada previamente seleccionada se utilizó un reactor cz-control (Applikon) con capacidad de 3.5 L (volumen de trabajo 2L), agitación de 500 rpm,

con metano al 1% en aire con un flujo de aire de  $0.4 \text{ L min}^{-1}$  (0.2 VVM), carga de  $86.5 \text{ g m}^{-3}\text{h}^{-1}$  y un tiempo de residencia de 4.9 min.

En ambos reactores se controló la temperatura a  $30^\circ\text{C}$  y el pH a  $7\pm 0.05$  con NaOH 0.2 N y HCl 0.3 N; el metano estuvo contenido en una bolsa Tedlar de capacidad de 15 L; el sustrato fue alimentado con una bomba peristáltica (Masterflex, Cole Palmer 7543-30. Vernon Hilla IL USA) con flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Las bombas utilizadas fueron previamente calibradas.

### 5.6.2 EXPERIMENTOS PLANTEADOS PARA CADA POBLACIÓN METANOTRÓFICA. CONSORCIO

En el reactor Bioflo III previamente descrito se inoculó 0.5 g de biomasa del consorcio, operado con un volumen de medio de 2L, el reactor fue alimentado con metano al 1% v v<sup>-1</sup> en aire de manera constante hasta alcanzar una densidad celular de  $4 \text{ g}_x \text{ L}^{-1}$ . La biomasa producida en el bioreactor fue centrifugada y dividida en 3 partes iguales. Con el consorcio se realizaron tres experimentos, dos fueron planteados para probar el efecto del aceite de silicón al adicionar 0 ó 10%; el efecto esperado sería sobre la CE, eficiencia de remoción, producción de CO<sub>2</sub> y la velocidad específica de consumo de metano. Estos experimentos se realizaron utilizando medio MMS.

También se realizó un experimento con 0% aceite y limitado por N para determinar si el consorcio era capaz de acumular PHB. Todos los experimentos se realizaron a partir del inóculo resultante de la propagación en medio MMS, con el propósito de asegurar que los microorganismos presentes en el consorcio sean los mismos durante todos los experimentos planeados.

### MICROORGANISMO AISLADO

Los experimentos a nivel reactor se realizaron una vez que se probó la acumulación de PHB. La propagación de los microorganismos fue igual a la realizada para el consorcio.

Los experimentos hechos con los microorganismos aislados permitieron evaluar el efecto del aceite de silicón sobre la acumulación de PHB. En este caso se hicieron experimentos con 10 y 0 % aceite de silicón cuando el sistema estuvo limitado por nitrógeno. Se realizó un control con 0% aceite de silicón sin limitación de N.

En la Figura 9 se muestra un esquema general de la metodología seguida; el control local respecto a las condiciones de operación de los reactores fue el mismo que se planteó previamente.



**Figura 9.** Esquema general de la metodología.

## 5.7 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS REACTORES.

La capacidad de un sistema de tratamiento de contaminantes gaseosos puede caracterizarse usando cálculos estándar, éstas son una medida del funcionamiento de los reactores. La carga alimentada (L), capacidad de eliminación (CE) y la eficiencia de remoción (ER) son las más utilizadas y se definen como:

$$L=C_e \cdot Q_g^{-1} \cdot V_r^{-1} \quad [\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}]$$

$$CE = (C_e - C_s) \cdot Q_g \cdot V_r^{-1} \quad [\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}]$$

$$ER=(C_e - C_s) \cdot 100 \cdot C_e^{-1} \quad [\%]$$

Donde  $C_e$  y  $C_s$  son la concentraciones de entrada y salida del reactor [ $\text{g m}^{-3}$ ],  $Q_g$  es el caudal aire + sustrato [ $\text{m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ] y  $V_r$  es el volumen de trabajo del reactor [ $\text{m}^3$ ]. La CE mide la máxima cantidad degradada del sustrato referida al volumen del reactor, mientras que la ER expresa el porcentaje removido de metano respecto al total alimentado.

## 5.8 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS.

Se propagó a las cepas seleccionadas en medio Luria, después de 3 días de resguardo a 30 °C se extrajo el DNA con el kit MoBio específico para bacterias. Posteriormente se realizó PCR del gene 16S rDNA con los *primers* Bac8f y 1492r, una vez concluida la PCR se purificó el DNA con el Kid Wizard SV gel y PCR *clean-up system* marca PROMEGA; el producto de la purificación se envió a secuenciar a las instalaciones de la UNAM, IBT en Cuernavaca, se ejecutó una búsqueda en Blast para comparar la secuencias obtenidas con bases datos existentes.

El programa de PCR fue el siguiente, un precalentamiento a 105 °C por 45 s posteriormente a 95 °C por 2 min, luego se continua con 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 56 °C por 30 s y para finalizar cada ciclo con 72 °C 1 min, una vez concluidos los ciclos se somete el producto de PCR a 72 °C por 5 min.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de acuerdo a la estrategia experimental planteada en la sección de materiales y métodos. Las actividades se planearon con la finalidad de seleccionar una cepa del consorcio. Los criterios para la selección de la cepa fue que presentaran tasas de consumo de metano aceptables y capacidad de acumulación de polímeros intracelulares, específicamente PHB. Primero se mostrarán los resultados obtenidos con relación al aislamiento y selección de la cepa y posteriormente se mostrarán los resultados obtenidos por las poblaciones metanotróficas a nivel reactor.

### **6.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS METANOTRÓFICOS**

#### **6.1.1 AISLADOS Y SUS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.**

Para la clasificación de cada microorganismo aislado se reporta su color, forma, bordes, elevación y textura se clasificación según lo mostrado en la Tabla 9 [Ramírez *et al.* 2008].

Las características de los 17 microorganismos aislados crecidos en medio MMS gelificado con goma gellan se muestran en la Tabla 10.

Como se puede observar, el 75% son bacterias Gram negativas, este resultado concuerda con lo reportado por Brenner *et al.*, 2005, que establece que la mayoría las bacterias metilótrofas o metanótrofas pertenecen al Phylum BXII de Proteobacteria y tienen como principal característica una tinción Gram negativa, aunque también existen algunas bacterias metanotróficas que son Gram positivas. Cada una de las cepas fue propagada y conservada en cajas petri para posteriormente realizar las pruebas de actividad sobre metano y metanol.

**Tabla 10.** Microorganismos aislados del consorcio metanotrófico.

<b>Microorganismos aislados</b>							
<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Bordes</b>	<b>Elevación</b>	<b>Textura</b>	<b>Gram</b>
1	C1	Blanca opaco	Ameboidea	Lobulado	Elevada	Viscosa	-
2	C2	Rosa	Circular con halo	Negativa	Convexa	Membranosa	-
3	C3	Amarillo Brillante	Circular	Entero	Convexa	Butirosa	+
4	C5	Grisácea/transparente	Ameboidea	Lobulado	Plana	Membranosa	+
5	C6	Blanca	Circular	Entero	Elevada	Negativa	-
6	C8	Amarillo canario	Ameboidea	Lobulado	Convexa	Viscosa	-
7	C10	Blanca opaca con intensidad al centro	Circular	Ondulados	Plana	Seca	-
8	C64	Crema muy claro	Ameboidea	Lobulado	Plana	Seca	+
9	C66	Grisácea/transparente	Ameboidea	Lobulado	Plana	Seca	-
10	C74	Transparente	Ameboidea	Crenado	Plana	Membranosa	-
11	C77	Amarilla ocre	Circular	Ondulados	Convexa	Negativa	-
12	C78	Beige	Ameboidea	Lobulado	Rugosa	Negativa	-
13	C121	Opaca	Circular con halo	Lobulado	Plana	Membranosa	-
14	C147	Crema tornasol	Circular fusiforme	Entero	Plana	Butirosa	-
15	C148	Blanca	Circular	Crenado	Elevada	Viscosa	-
16	C152	Blanco opaco	Ameboidea	Ondulados	Plana	Positiva	+
17	C156	Amarilla ocre	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	-

### 6.1.2 PRUEBAS DE CRECIMIENTO CON METANO O METANOL

Una vez realizado el aislamiento y comprobada la pureza de cada cepa, los 17 microorganismos aislados se caracterizaron a través de pruebas de actividad sobre metano o metanol, el resultado se basó en la cuantificación de la biomasa por espectrofotometría a al final del experimento (Tabla 11). Es importante mencionar que el procedimiento fue realizado por triplicado y los resultados fueron reproducibles en cada caso. Basado en lo anterior se seleccionaron 10 microorganismos nombrados como C2, C8, C10, C66, C64, C74, C77, C147 y C156, los cuales presentaron mejor crecimiento con metano o metanol usando cada sustrato como única fuente de carbono y energía, todas fueron Gram negativas con excepción de C7 y C64.

**Tabla 11.** Resultados de las pruebas de actividad sobre metano ó metanol  
(Las cepas marcadas con \* fueron las seleccionadas para realizar las cinéticas).

Número	Etiqueta	Actividad en Metano	Actividad en metanol
1	C1	++	*
2	C2*	++++	****
3	C3*	++	**
4	C5	+	**
5	C6	++	*
6	C8*	+++	**
7	C10*	++	***
8	C64*	++	***
9	C66*	++	***
10	C74*	++	**
11	C77*	++	***
12	C78	+	**
13	C121	++	*
14	C147*	++++	****
15	C148	+	**
16	C152	++	*
17	C156*	++++	***

### 6.1.3 VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE METANO Y PRUEBAS CUALITATIVAS DE ACUMULACIÓN DE PHB.

Una vez concluidas las pruebas de actividad se realizaron cinéticas para determinar la tasa de consumo de metano, este experimento fue realizado en medio MMS. Las bacterias sometidas a este procedimiento fueron las 10 cepas seleccionadas previamente, al mismo tiempo se realizaron pruebas cualitativas de acumulación de PHB. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Como se observa las velocidades específicas de consumo de metano oscilaron entre 6.7 y 91.6  $\text{mg}_{\text{CH}_4} \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$ , el intervalo es amplio así que permitió discernir entre las cepas aisladas. Se seleccionaron las cepas con mejores velocidades específicas de consumo de metano y acumulación de PHB. De esta manera se mostró que la cepa C2 tenía alto contenido de PHB. Las observaciones con el microscopio de epifluorescencia para esta cepa se presentan en la Figura 10.

Cuatro de las 10 cepas sometidas a la prueba de fluorescencia con Azul del Nilo A dieron positivo al tener la capacidad de acumular PHB. Se asume que la intensidad de la fluorescencia está relacionada con la cantidad de PHB intracelular, ya que se estandarizó la cantidad inicial de microorganismos cultivados en el medio MW bajo la presencia de metano durante el mismo tiempo.

En este experimento se probó que, dentro del consorcio metanotrófico, hay microorganismos que cuentan con la habilidad de sintetizar compuestos de reserva como el PHB, la cual es activada cuando hay alguna limitación nutricional en el medio de cultivo ya sea por N o P, principalmente, siempre y cuando las células encuentren la fuente de carbono en concentraciones normales o en exceso, según lo reportado por Senior y Dawes, 1973; Wendland *et al.*, 2001.

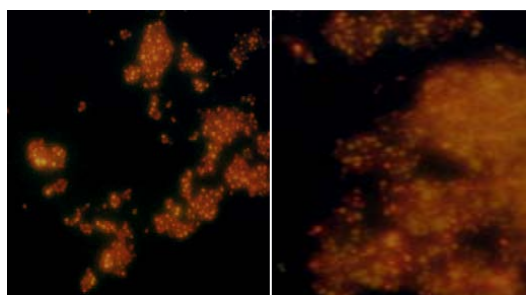
Los resultados de las pruebas cualitativas fueron evidencia de la acumulación de PHB y se tomó como un criterio de selección.

De esta prueba podemos concluir que la cepa C2 y C147 son las más aptas dentro de los microorganismos aislados del consorcio y para compararse con la cepa tipo.



**Tabla 12.** Velocidades máximas de consumo de CH<sub>4</sub> y acumulación de PHB.

Nombre	R <sub>CH4/X</sub>	PHB
	[mg <sub>CH4</sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	
C2	34.9±0.7	++++
C3	7.6±0.08	++
C8	13.9±0.14	+
C10	30.4±0.65	No
C64	11.1±0.1	No
C66	12.7±0.13	No
C74	6.7±0.18	No
C77	9.4±0.1	No
C147	91.6±0.6	++
C156	13.3±0.5	No



**Figura 10.** Pruebas cualitativas de PHB vistas a 320 nm en un microscopio de epifluorescencia (Izquierda + (C147), Derecha ++++ (C2)).

#### 6.1.4 COMPARACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS CON *Methylosinus trichosporium* OB3b ATCC 49242

Como última fase de selección se realizó una comparación con una cepa de colección, ésta permitió ubicar el desempeño de los microorganismos metanotróficos aislados en la UAM dentro del contexto científico. Las especies aisladas se compararon con una cepa de colección

*Methylosinus trichosporium* OB3b reportada como una de las mejores degradadoras de metano y acumuladoras de PHB [Shah *et al.*, 1996].

El objetivo de este estudio fue someter a los microorganismos a las mismas condiciones de operación, para determinar sus velocidades específicas de eliminación de metano, formación de CO<sub>2</sub> y PHB. En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos. Como puede apreciarse, la cepa aislada C2 presenta mayor acumulación de PHB que *Methylosinus trichosporium* OB3b. Por otro lado la cepa C147 presenta velocidades de consumo de metano del doble de las reportadas para *Methylosinus trichosporium* OB3b.

**Tabla 13.** Velocidades de consumo de metano y capacidad de acumulación de PHB de las cepas aisladas y la cepa tipo.

Cepa	R <sub>CH<sub>4</sub>/X</sub> [mg <sub>CH<sub>4</sub></sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	R <sub>CO<sub>2</sub>/X</sub> [mg <sub>CO<sub>2</sub></sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	% PHB* Acumulado (p/p)
<i>Methylosinus trichosporium</i>			
OB3b	77.8 ± 3.89	90 ± 5.24	24.54 ± 4.2
Aislado C2	60 ± 1.62	32 ± 2.34	56.98 ± 3.8
Aislado C147	139 ± 2.641	55 ± 1.22	21.87 ± 2.5

\* El porcentaje de PHB se calculó a partir de la fracción que representa la cantidad de PHB cuantificada entre la biomasa total (PHB\*X<sub>T</sub><sup>-1</sup>\*100).

En cuanto a las velocidades de consumo de metano, la cepa C2 presenta velocidades de consumo en el orden de las reportadas para *Methylosinus trichosporium* OB3b, la cual está reportada que puede alcanzar valores entre 39-50 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y tiene la capacidad de acumular hasta el 50% en peso seco de PHB, para concentraciones de metano entre 20-50% v v<sup>-1</sup> en aire, respectivamente. Estas condiciones de operación permiten una mayor disponibilidad entre el metano para los microorganismos ya que de cada 33 g de metano en el reactor, solamente 1 g está disponible para el consumo de los microorganismos [Shah *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2009].

Bajo las condiciones de estudio la cepa tipo solamente fue capaz de acumular el 24 % en peso de PHB, siendo superada por la cepa C2 la cual logró acumular hasta el 56 % en peso de PHB.

En la Tabla 14 se muestran diversos microorganismos utilizados para la producción de PHB que usan diferentes fuentes de carbono incluyendo la cepa C2 obtenida en este trabajo.

**Tabla 14.** Producción de PHB por varias bacterias.

Microorganismo	Fuente de carbono	Contenido de PHB (%)	Referencia
<i>Alcaligenes eutrophus</i> *	Gluconato	46-85	[Liebergesell <i>et al.</i> , 1994]
	Propionato	26-36	
	Octanoato	38-45	
<i>Bacillus megaterium</i>	Glucosa	20	[Mirtha <i>et al.</i> , 1995]
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 1267	Fructosa/ metanol	30	[Ackerman y Babel, 1997]
<i>M. extorquens</i> (ATCC 55366)	Metanol	40-46	[Borque <i>et al.</i> , 1995]
<i>M. organophilum</i>	Metanol	52	[Choi y Lee, 1997]
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucosa	40	[Takeda <i>et al.</i> , 1995]
<i>Methylocystis sp.</i>	Metano 50%	47	[Helm <i>et al.</i> , 2006]
<i>Methylosinus trichosporium</i>	Tricloro etileno-	12-50	[Shah <i>et al.</i> , 1996]
	Metano		
Aislado C2	Metano	56	Este estudio

\*Actualmente clasificada como *Wautersia eutropha*.

Como se puede observar, el PHB obtenido por la cepa C2 supera la cantidad acumulada por diferentes microorganismos y sustratos como: metanol, glucosa, fructosa y otros. Lo anterior a pesar de la limitación a la transferencia de masa del gas hacia el líquido que presenta el CH<sub>4</sub> en comparación de los sustratos mencionados anteriormente, todos ellos extremadamente solubles en agua y 100% disponibles para las células al momento de realizar la biotransformación. Los resultados de la cepa C2 superan lo reportado por Borque *et al.*, 1995; Mirtha *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 1995; Ackerman y Babel, 1997 y Helm *et al.*, 2006.

Solo en dos trabajos se usa metano como sustrato (Shah *et al.*, 1996 y Helm *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de *Methylocystis* la concentración de metano manejada fue de 50% en aire, si tomamos en cuenta el aspecto de solubilidad y que la cantidad de metano disponible es proporcional a la concentración en la fase gas según Henry, en la investigación de Helm *et al.* 2006 se usa una concentración de metano 50 veces mayor a la empleada en esta tesis. Sí se utiliza metano al 50 % en aire, la posibilidad de una explosión se presenta al diluirse en aire y estar dentro de los límites de explosividad (5-15 % en aire), además sí consideramos que la velocidad específica de consumo de metano de *Methylocystis sp.* bajo esas condiciones es de  $77 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$  y la comparamos con la de la cepa C2 de  $60 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ , es posible que no valga la pena sacrificar la seguridad con esa pequeña diferencia en la velocidades de consumo. Por otro lado, Choi y Lee (1997) señalaron que el costo de la fuente de carbono empleada durante un proceso de producción de PHB a escala industrial implica el 30 % del costo total de operación. Si se adoptara el uso de sustratos, como el metano, provenientes de gases residuales sería posible reducir los precios del proceso de producción de PHB. Lo anterior implicaría una mayor competitividad a nivel económico de los plásticos verdes comparado con los plásticos derivados del petróleo, recordando que el sustrato propuesto, en este caso, es gratuito y de alto impacto ambiental.

Analizando las potencialidades de la cepa C147, presentó una velocidad específica de consumo de metano del doble comparada con la cepa tipo. Durante este trabajo no fue posible continuar con el estudio de esta cepa debido a la dificultad para su aislamiento; aunado a esto la cepa C147 obtuvo una acumulación menor de PHB (21.87 %), lo que la descartó por cuestión del tiempo de desarrollo de esta tesis.

Por otro lado, el cambio en el metabolismo celular es evidente ya que los microorganismos provenían de un medio en donde no estaban limitados por ningún elemento, por lo tanto la disminución en las tasas de producción de  $\text{CO}_2$  indica el redireccionamiento del uso de la fuente de carbono hacia la acumulación de PHB. En este aspecto las velocidades de producción de  $\text{CO}_2$  de los aislados son menores que la presentada por *Methylosinus trichosporium* OB3b (Tabla 13), lo que implicaría menores emisiones de  $\text{CO}_2$  a la atmósfera.

A manera de conclusión de esta primera etapa experimental, se determinó que la cepa C2 es la que presenta mejor capacidad de acumulación de PHB y su velocidad específica de consumo

de metano está en el orden de los resultados obtenidos por la cepa tipo. Es por esto que se decidió probar a la cepa C2 a nivel reactor y estudiar su comportamiento bajo limitación de nitrógeno, además de estudiar el efecto que tiene el aceite de silicón sobre la acumulación de PHB.

## **6.2 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DEL CONSORCIO Y CEPA C2 EN EL REACTOR DE TANQUE AGITADO (SEGUNDA ETAPA).**

### **6.2.1 EFECTO DEL ACEITE DE SILICÓN SOBRE LA CE, ER Y PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> DEL CONSORCIO.**

Se realizó un experimento en el que se planeó comparar el efecto del aceite de silicón sobre el desempeño del reactor. Primero se monitoreó al consorcio en el reactor, el cual fue previamente inoculado con una parte de la biomasa obtenida durante la propagación, a lo largo del primer experimento denominado STR (por sus siglas en inglés, Reactor de Tanque Agitado); se adicionaron 2 L de MMS, durante el cultivo la cantidad de biomasa promedio fue de  $1.27 \text{ g L}^{-1}$ , el siguiente experimento se realizó sustituyendo el 10% de medio por aceite de silicón por lo tanto se adicionaron 1.8 L de MMS a este experimento se le denotará como TPPB (por sus siglas en inglés, Bioreactor de partición de dos fases líquidas). Como se muestra en las Figuras 11-14 el efecto de la adición de aceite de silicón en el sistema fue favorable, observándose un incremento en la remoción de CH<sub>4</sub> desde el inicio del experimento. Lo anterior sugiere una mejora en los procesos de transferencia de masa y asociado a ello la biodegradación aumenta, además este incremento en la remoción se ve reflejado en un aumento de la producción de CO<sub>2</sub>.

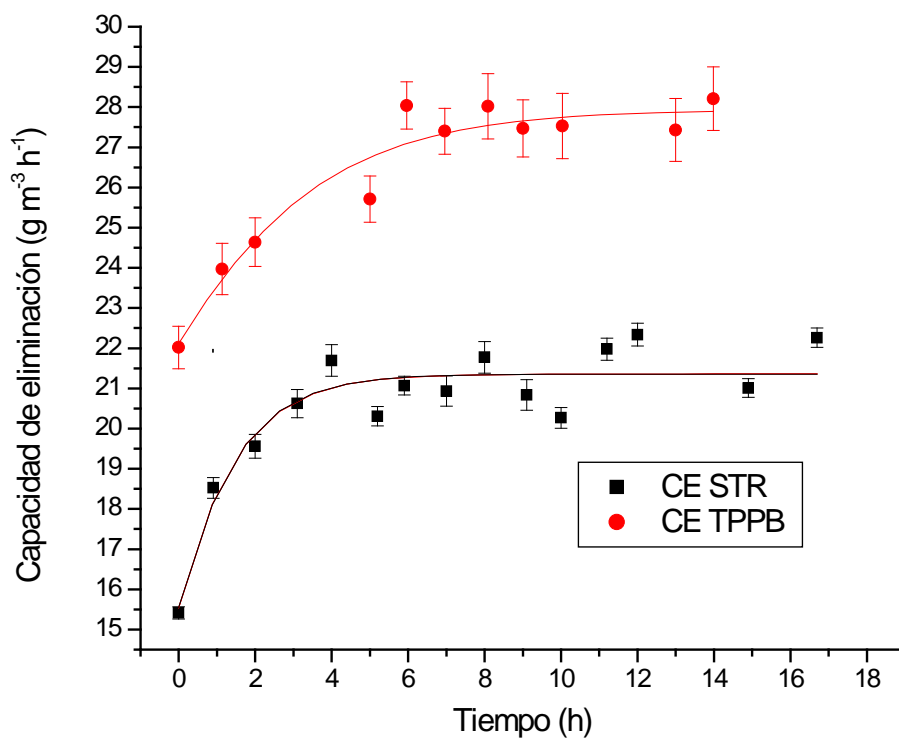
Este resultado es consistente con lo reportado por Nielsen *et al.*, 2005 quienes demostraron el aumento en la transferencia de masa (oxígeno) debido a la adición de una fase orgánica.

El coeficiente de partición global del metano en el sistema TPPB se calculó a partir de los coeficientes individuales del CH<sub>4</sub> en agua (33.5) y en aceite de silicón (3.2) [Rocha *et al.*, 2009], considerando las fracciones utilizadas para aceite de silicón (0.1) y la fase acuosa (0.9), respectivamente. El coeficiente de partición del sistema incluyendo al aceite de silicón fue de 17.05 lo que representa que el CH<sub>4</sub> disponible aumentó al doble con respecto a un sistema

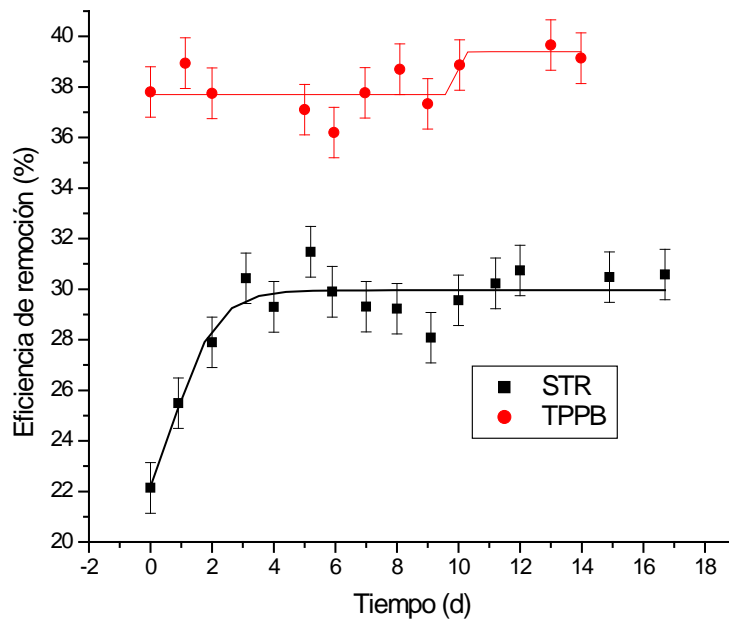
consistente únicamente de la fase acuosa. Lo anterior concuerda con el incremento inicial en la eliminación de  $\text{CH}_4$  y producción de  $\text{CO}_2$ , presentado en las Figuras 11 y 13.

Ya en estado estacionario la CE mejoró un 25% por la adición del aceite de silicón; en cuanto a la eficiencia de remoción ésta también se incrementó en un 24% aproximadamente.

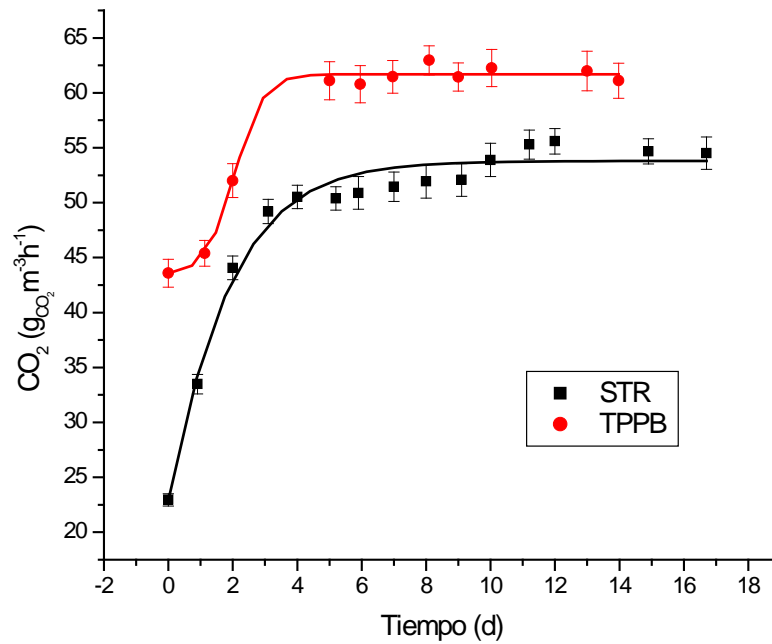
La Figura 13 muestra que la producción de  $\text{CO}_2$  se elevó un 17.8 % aproximadamente, según los resultados obtenidos en estos experimentos, hay evidencia de que el aceite de silicón mejora la eliminación de metano y como consecuencia la producción de  $\text{CO}_2$  y eficiencia de remoción.



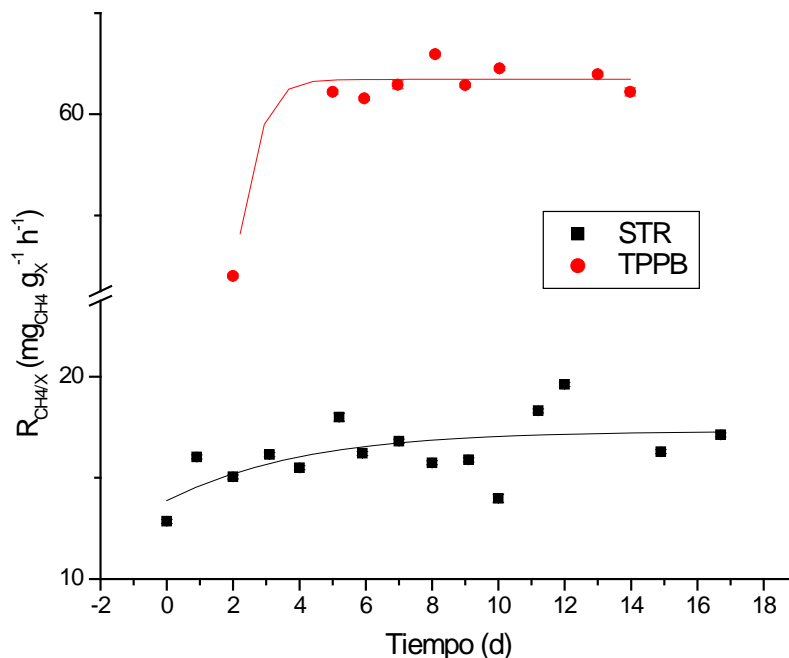
**Figura 11.** Capacidad de eliminación del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR)



**Figura 12.** Eficiencia de remoción del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).



**Figura 13.** Velocidad de producción de CO<sub>2</sub> del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).



**Figura 14.** Velocidad de específica de consumo de metano del consorcio con aceite de silicón 10% (TPPB) y 0% (STR).

Se calculó la velocidad específica de consumo de metano, a partir de los datos generados durante los dos estudios realizados y se comprobó que existió un aumento del 72 % resultado de la adición del aceite de silicón durante la biotransformación (Figura 14). Si se compara el efecto del aceite de silicón con el estudio realizado por Rocha *et al.*, 2009, ellos sólo mejoraron el 40 % la velocidad específica de consumo de metano, es posible que el efecto del aceite de silicón dependa de la capacidad de los microorganismos para adaptarse a la segunda fase.

Se puede concluir que hay un efecto positivo por la presencia del aceite de silicón sobre todas las variables involucradas con la degradación de metano, ya que éstas mejoraron entre 17 y 72% los resultados, por lo tanto los microorganismos presentes en el consorcio no son afectados por la presencia del aceite de silicón.



## 6.2.2 EFECTO DE LA LIMITACIÓN DE N SOBRE LA CE, ER, PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub>, Y DE PHB CON EL CONSORCIO.

Se realizó un experimento para determinar si el consorcio metanotrófico era capaz de acumular PHB. La estrategia utilizada fue colocar microorganismos en un medio carente de nitrógeno. Esto produciría un cambio en el metabolismo celular, los resultados obtenidos durante este experimento se muestran a continuación.

La Figura 15 muestra el comportamiento del consorcio bajo limitación por N en un STR; la CE en promedio durante todo el experimento fue de  $20 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , si comparamos el valor del experimento anterior de  $21 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  en donde no había limitación de nitrógeno podemos concluir que la limitación de nutrientes para el consorcio no afecta su CE.

En el caso de la producción de CO<sub>2</sub> disminuye de forma notable; cuando los microorganismos son inoculados comienzan a producir CO<sub>2</sub> de forma normal en una cantidad aproximada de  $45 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a medida que pasa el tiempo la limitación por nitrógeno afecta la producción de CO<sub>2</sub> y ésta va disminuyendo hasta alcanzar un valor de  $22 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  aproximadamente.

Este comportamiento se debe al desvío del metabolismo celular y a la activación de la maquinaria enzimática encargada de producir PHB, ya que una parte del carbono asimilado por el consorcio es almacenado en forma de PHB o liberado como CO<sub>2</sub>, coincidiendo con lo reportado por Asenjo y Suk, 1986.

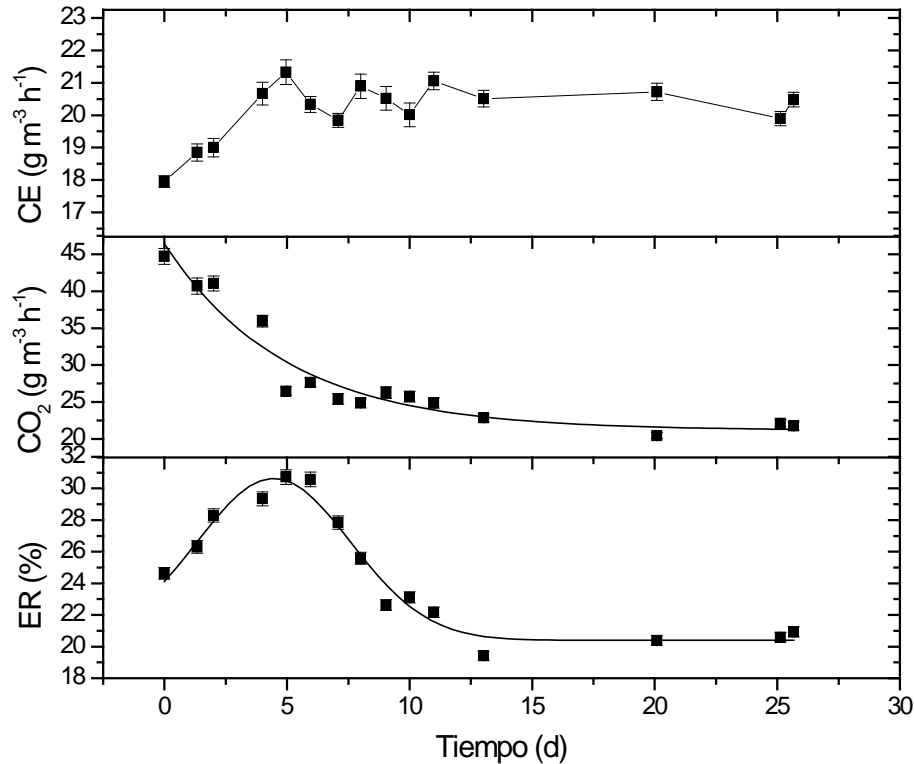
En el caso de la ER sucede algo parecido, la eficiencia de remoción del 30% es alcanzada en el lapso de 5 días, después de este tiempo comienza la declinación de la ER hasta establecerse en el 20%.

En la Figura 15 también podemos observar que los microorganismos se adaptan al cambio nutricional durante los primeros 10 días de proceso, después de este periodo la CE, ER y producción de CO<sub>2</sub> permanecieron constantes en valores por debajo de los presentados cuando no había limitación de nitrógeno.

Para el CO<sub>2</sub> la producción disminuyó el 60 % y la ER disminuyó el 30 %, resultados que concuerdan con lo reportado por Wendland *et al.*, 2001, Shah *et al.*, 1996.

La disminución de la producción de CO<sub>2</sub> podría indicar la acumulación de PHB.

Bajo este esquema, se evitaría la emisión de CO<sub>2</sub> a partir del tratamiento biológico de CH<sub>4</sub>, aunado a la síntesis de compuestos de interés biotecnológico.

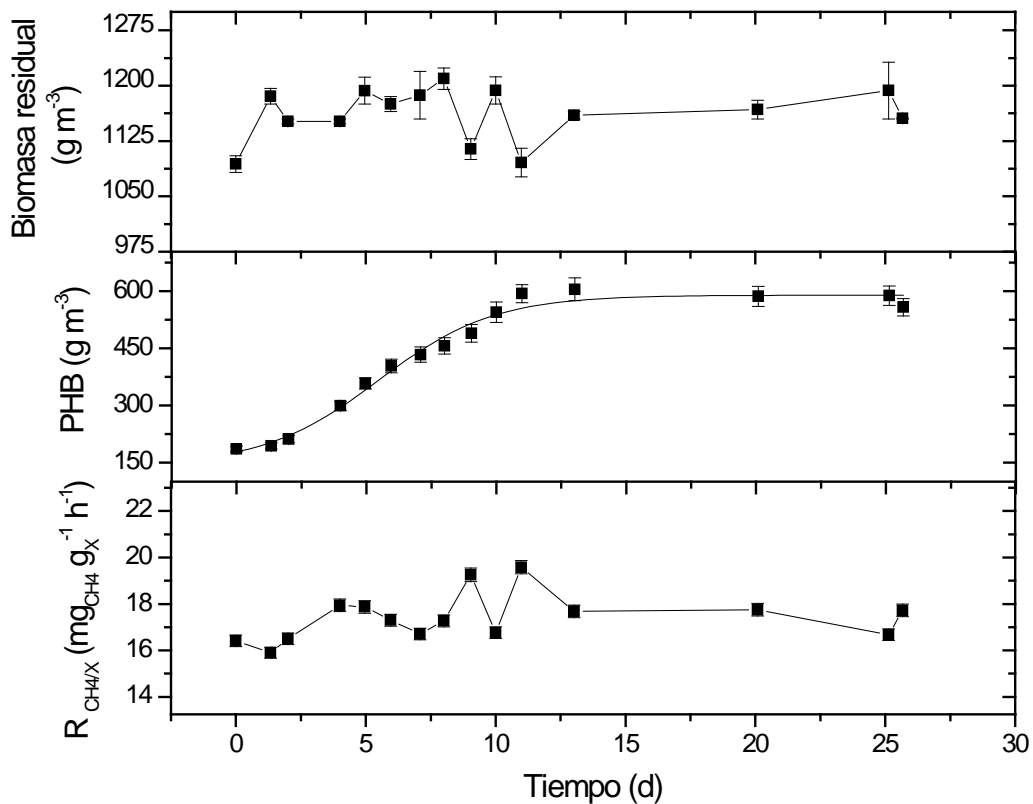


**Figura 15.** CE, ER y producción de CO<sub>2</sub> del consorcio en un STR (reactor de tanque agitado sin aceite de silicón) limitado por nitrógeno.

En la Figura 16 se presenta al comportamiento de la biomasa residual, formación de PHB y la velocidad específica de consumo de metano, cabe mencionar que durante el estudio de un compuesto intracelular como el PHB la biomasa total será la cantidad de PHB cuantificada mas la biomasa residual (medida por el método de Lowry); el concepto biomasa residual surge como la biomasa activa y responsable de las actividades catalíticas de mantenimiento y formación de PHB principalmente; en la Figura 16 podemos ver que la velocidad específica de degradación de CH<sub>4</sub> no fue afectada debido a la limitación por nitrógeno, conservando su valor en 17 mg gx<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La velocidad específica de crecimiento es conservada, el valor obtenido es del orden del obtenido por Rocha *et al.*, 2009 de 25 mg gx<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

El PHB se produce en respuesta al estrés nutricional al que se somete el microorganismo, el PHB es almacenado por la célula como material de reserva, éste confiere resistencia a los microorganismos capaces de acumularlo, para poder estimar la cantidad de PHB es necesario calcular la biomasa total; la biomasa total es la suma de la biomasa residual estimada por el método de lowry y la cantidad de PHB presente.

En este experimento la producción de PHB fue aumentando hasta alcanzar una capacidad de acumulación de PHB de 34%  $p p^{-1}$ .



**Figura 16.** Biomasa<sub>Residual</sub>, producción de PHB y velocidad específica de consumo de CH<sub>4</sub> del consorcio en un STR.

La Tabla 15 muestra los balances de carbono para los tres experimentos; como se puede observar la recuperación de carbono como PHB, CO<sub>2</sub> y biomasa a partir del metano consumido son cercanos al 100 % para los experimentos con y sin aceite de silicón; en el

balance de la etapa de acumulación de PHB no hay producción de biomasa ya que debido a la falta de nitrógeno hay crecimiento celular.

En dicha tabla se muestra el balance de carbono, el cual cierra satisfactoriamente, lo cual nos habla de la eficiencia del método para la cuantificación de PHB ya que durante otros experimentos reportados se considera una pérdida de PHB durante los procesos de extracción y esterificación [Riis y Mai, 1988; Braunegg *et al.*, 1978], durante esta investigación también se probó la eficiencia de la hidrólisis resultando en 88% de efectividad.

**Tabla 15.** Balances de carbono de los experimentos realizados con el consorcio

Balance del consorcio sin limitaciones de nitrógeno en el reactor STR					
	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	Biomasa	PHB	Fracción de carbono cuantificado
Total (g m <sup>-3</sup> )	348.90	765.00	100	-----	
Carbono (g m <sup>-3</sup> )	261.68	208.36	50	-----	
Fracción de C		<b>0.80</b>	<b>0.19</b>	-----	<b>0.99</b>
Balance del consorcio sin limitaciones de nitrógeno en el reactor TPPB					
Total (g m <sup>-3</sup> )	369.93	807.0	150	-----	
Carbono (g m <sup>-3</sup> )	277.45	220.8	75	-----	
Fracción de C		<b>0.80</b>	<b>0.2</b>	-----	<b>1</b>
Consortio limitado de nitrógeno en el reactor STR					
Total (g m <sup>-3</sup> )	521.00	668.98	-----	418.00	
Carbono (g m <sup>-3</sup> )	390.70	182.40	-----	233.30	
Fracción de C		<b>0.4</b>	-----	<b>0.60</b>	<b>1</b>

### 6.2.3 OPERACIÓN DEL REACTOR STR CON LA CEPA C2.

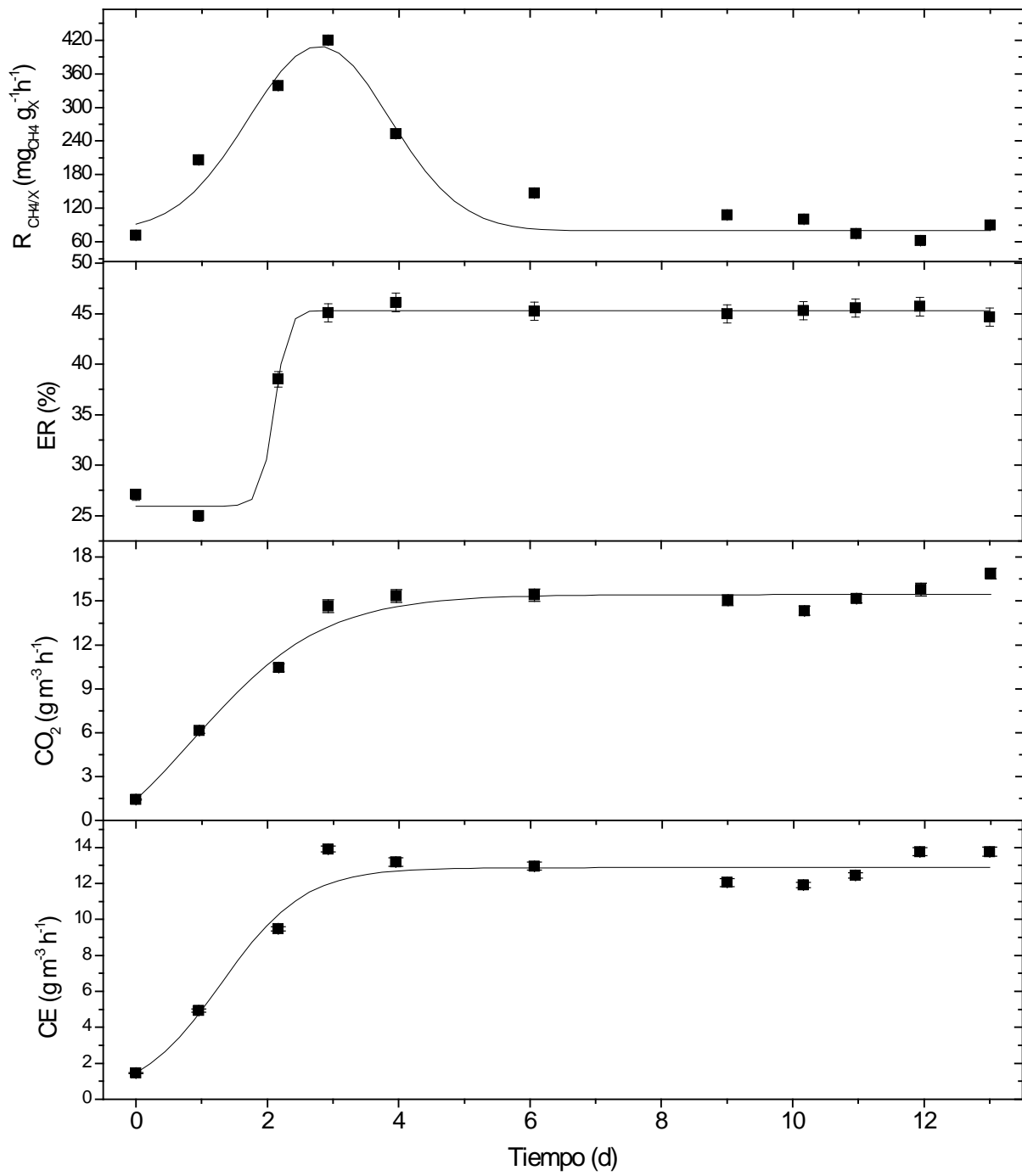
En el reactor cz-control se inoculó al aislado C2 el cual demostró tener una velocidad específica de consumo de metano de 60 g g<sub>x</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y con una capacidad de acumular PHB de 56% p p<sup>-1</sup> durante los experimentos en microcosmos. A manera de control, se corrió un experimento en donde no había limitaciones nutricionales y no se adicionó aceite de silicón,

con el objeto de analizar el comportamiento de la cepa sin perturbaciones ambientales, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 17.

Durante el cultivo de la cepa C2 en el reactor de tanque agitado se observó una CE de  $14 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , con una producción de  $\text{CO}_2$  de  $16 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y un eficiencia de remoción del 45%, el comportamiento de estas variables a lo largo del experimento se muestran en la Figura 17.

La velocidad específica de degradación de  $\text{CH}_4$  osciló entre  $400$  y  $100 \text{ mg gx}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el valor más alto se registró durante la fase de crecimiento de los microorganismos, hasta alcanzar  $100 \text{ mg gx}^{-1} \text{ h}^{-1}$  en estado estacionario. La velocidad específica de consumo de  $\text{CH}_4$  aumentó un 40% respecto a la medida en microcosmos, es posible que el reactor de tanque agitado provea de mejores condiciones para la transferencia de masa y esto se vió reflejado en el aumento del consumo de metano. A manera de conclusión la cepa aumentó su velocidad específica de consumo de metano, al ser estudiada a nivel reactor, presentó una ER de 45% valor nunca alcanzado por el consorcio, hasta este punto se demuestra que la velocidad de eliminación específica de la cepa es mejor que la del consorcio ya que es posible que en el consorcio haya microorganismos con menor afinidad por el  $\text{CH}_4$ . La cepa alcanzó velocidades parecidas a las determinadas en microcosmos para la cepa C147, indicando que la cepa C2 tiene capacidades de eliminación de  $\text{CH}_4$  comparables con el aislado C147 y que éstas están en función de las condiciones de operación del reactor (velocidad de agitación y aireación) [Nielsen *et al.*, 2003].

La recuperación de carbono, de acuerdo al balance, para este experimento fue del 89%, el carbono no cuantificado puede deberse al error experimental. Sin embargo esta falta de carbono no se presentó en los experimentos realizados con el consorcio, es posible que el microorganismo aislado destine parte del carbono a la formación de pigmentos, los cuales no fueron cuantificados.



**Figura 17.** Comportamiento de la cepa C2 en el STR.

#### 6.2.4 EFECTO DE LA LIMITACIÓN DE N SOBRE LA CE, ER, PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub>, Y DE PHB CON LA CEPA C2.

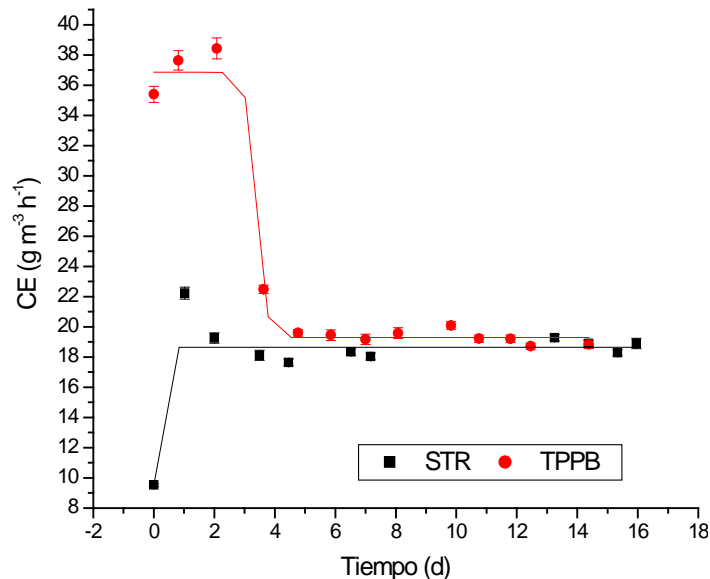
Se realizó un experimento en donde se probó el efecto del aceite de silicón sobre la acumulación de PHB. Para ello al medio limitado por nitrógeno (MW) se agregó 10% de aceite de silicón y posteriormente se inoculó a la cepa aislada C2, la cual tiene la capacidad de acumular PHB hasta el 56% p p<sup>-1</sup>.

Se observó un fenómeno acoplado entre el efecto del aceite de silicón y la limitación por nitrógeno. La adaptación de la cepa C2 coincidió con el periodo del consorcio en que se adaptó a la limitación por nitrógeno. En la Figura 18 se observa el efecto del aceite de silicón durante los primeros cuatro días del experimento donde la CE aumentó el 50% respecto al experimento cuando no hubo aceite llegando a valores de hasta 38 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup>. Después de 4 días se alcanzó el estado estacionario en donde la CE se estabilizó en 19 g m<sup>-3</sup>h<sup>-1</sup> en las dos configuraciones de reactor utilizadas. El fenómeno observado durante los primeros 4 días coincide con lo reportado por Nielsen *et al.*, 2003; donde el efecto de la fase orgánica puede mejorar los procesos de transferencia de masa entre el 33-58.3 %.

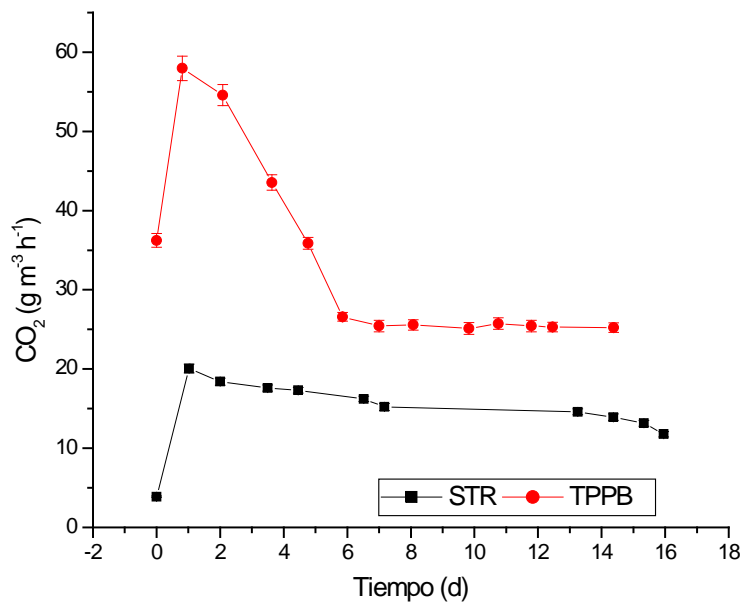
Por otro lado se observan fluctuaciones en la CE durante los primeros 4 días de biotransformación. Este comportamiento ha sido descrito por Littlejohns y Daugulis, 2009, mostrando que las fluctuaciones se deben a la adición de la segunda fase y la demanda metabólica de los microorganismos. Después de 4 h donde no se aprecia el efecto del aceite de silicón sobre las variables respuesta que involucran la degradación de CH<sub>4</sub>, es posible que el comportamiento relacione al efecto del aceite de silicón solamente durante las primeras horas y posteriormente la remoción de CH<sub>4</sub> sólo dependa de las características metabólicas de la cepa.

En la Figura 19 se muestra el efecto de la limitación de nitrógeno sobre la producción de CO<sub>2</sub>, en el caso de TPPB hay una mayor producción de CO<sub>2</sub> debido a que el metano consumido también lo fue. Durante todo el experimento la producción de CO<sub>2</sub> fue disminuyendo a causa del cambio del metabolismo celular en donde el carbono asimilado en forma de CH<sub>4</sub> se convierte a CO<sub>2</sub> y PHB. En la Figura 20 se puede observar que la eficiencia de remoción tiene un comportamiento parecido, la ER aumenta a lo largo de 4 días hasta alcanzar un valor de

64% por la presencia del aceite de silicón. Después de 5 días aproximadamente, se alcanza un estado estacionario para el reactor de partición de dos fases líquidas y el reactor de tanque agitado donde la ER es del 22.5 %.

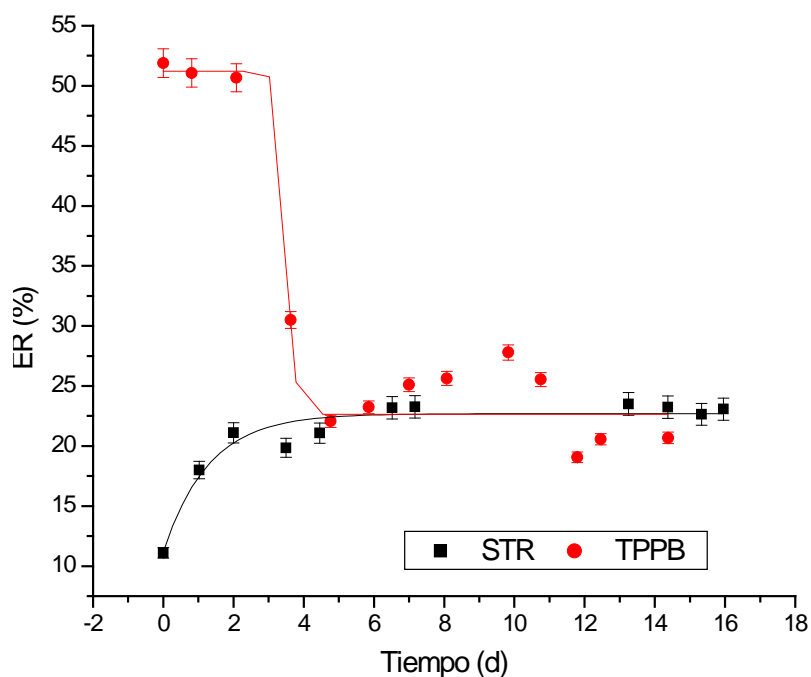


**Figura 18.** Capacidad de eliminación de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).



**Figura 19.** Producción de CO<sub>2</sub> de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).



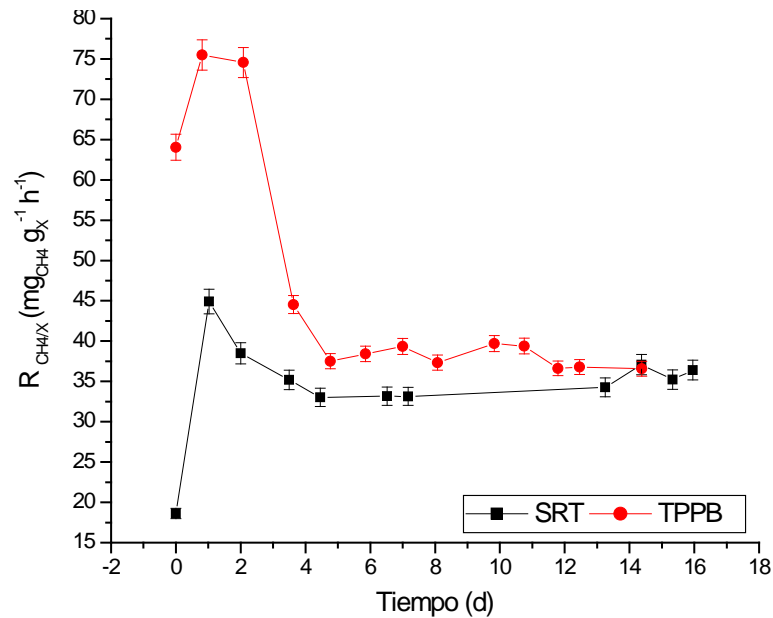


**Figura 20.** Eficiencia de remoción de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).

La velocidad específica de degradación de  $\text{CH}_4$  superó los  $75 \text{ mg (g}_x \text{ h)}^{-1}$  por la presencia del aceite de silicón ya que aumentó la  $R_{\text{CH}_4/\text{X}}$  47% comparado con el resultado de  $40 \text{ mg (g}_x \text{ h)}^{-1}$  obtenido sin aceite de silicón.

Ambas velocidades están por debajo de la estimada en el experimento anterior de  $100 \text{ mg (g}_x \text{ h)}^{-1}$  donde la cepa C2 no estaba limitada con ningún elemento. Bajo estas condiciones, el metano consumido se utilizó para la producción de biomasa y  $\text{CO}_2$ . En este caso, la producción de  $\text{CO}_2$  sólo disminuye un 25 % en comparación del efecto observado para la limitación de nitrógeno del 60 % sin la presencia de aceite de silicón.

Es posible que la velocidad de consumo de metano esté relacionada con la velocidad de crecimiento del microorganismo y ésta sea la justificación para la disminución de las velocidades; cabe mencionar que al limitar a los microorganismos por nitrógeno el crecimiento de la biomasa es despreciable, entonces el metano asimilado lo utilizan para la acumulación de PHB, mantenimiento celular y producción de  $\text{CO}_2$ .

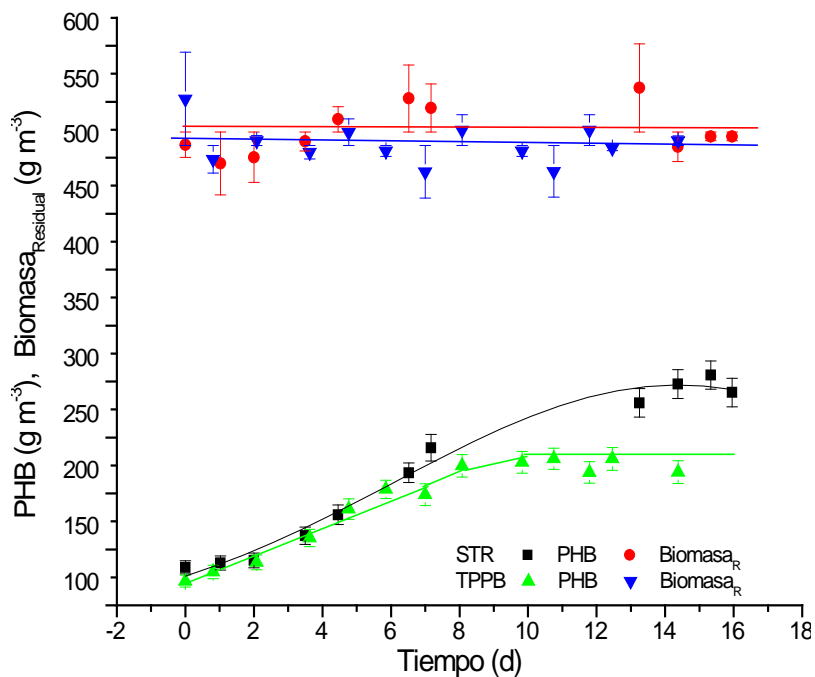


**Figura 21.** Velocidad específica de consumo de metano de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).

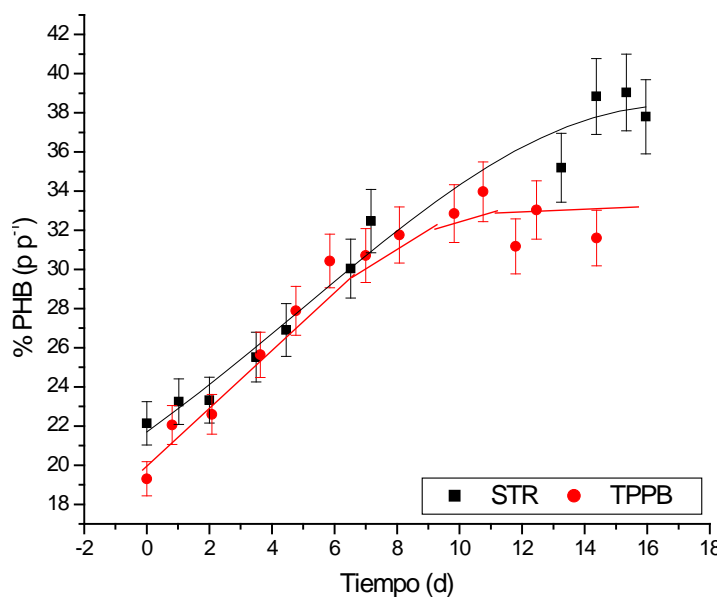
En el STR, el PHB acumulado alcanzó una concentración de hasta  $275 \text{ g m}^{-3}$  y en el TPPB fue de  $225 \text{ g m}^{-3}$ , la cantidad de biomasa presente a lo largo del experimento fue de  $500 \text{ g m}^{-3}$ , donde la biomasa residual presente permaneció aparentemente constante a lo largo de los dos experimentos (Figura 22).

Las concentraciones de PHB alcanzadas son un indicativo de que el aceite de silicón sólo tiene efecto en los procesos de transferencia de masa del  $\text{CH}_4$ . Lo que propicia que el metano esté disponible para ser metabolizado con mayor rapidez hacia la producción de  $\text{CO}_2$ , es posible que el microorganismo necesite un periodo previo de adaptación a la presencia del aceite de silicón.

En estudios en botellas serológicas se demostró que la cepa C2 puede acumular hasta el 56% en  $\text{p p}^{-1}$  de PHB, durante este experimento se alcanzó el 39% de acumulación, es posible que las condiciones operacionales del reactor no estén optimizadas. El perfil de acumulación se muestra en la Figura 23.



**Figura 22.** Producción de PHB y comportamiento de la biomasa residual de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).



**Figura 23.** Perfil de acumulación de PHB de la cepa C2 limitada por nitrógeno en un reactor de tanque agitado (STR) y un reactor de partición de dos fases líquidas (TPPB).

Los balances de carbono de los dos experimentos se muestran en las Tablas 16. En los balances se añade la columna polímeros exocelulares, ya que los microorganismos metanótrofos son capaces de sintetizar polisacáridos del tipo dextranas. Esto solamente se probó con los experimentos realizados con la cepa C2 el protocolo utilizado se muestra en el Apéndice F. Para ambos experimentos la cantidad de carbono que se dirige hacia la síntesis de estos polímeros se encontró entre 13 y 16 % para el STR y TPPB, respectivamente; con esto la fracción de carbono cuantificada en ambos experimentos fue del 89% (Tabla 16), el carbono no cuantificado se puede deber al error de medición experimental.

**Tabla 16.** Balances de materia de la cepa C2 limitada por nitrógeno.

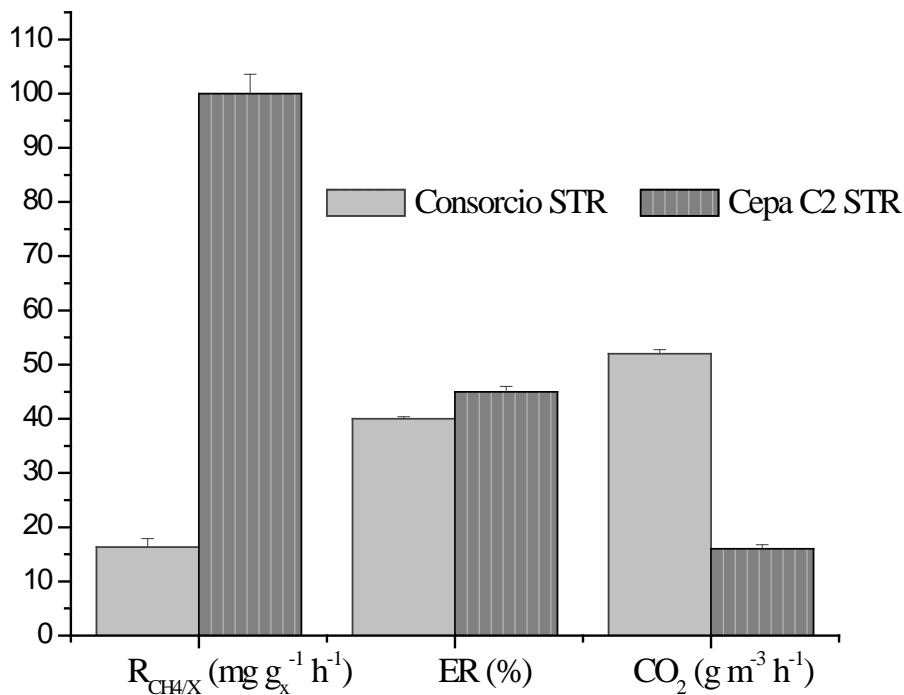
Cepa C2 limitada por nitrógeno en el reactor STR						
	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	Biomasa	PHB	Polímeros Exocelulares (Dextranas)	Fracción de carbono cuantificado
Total (g m <sup>-3</sup> )	294.95	246.97	-----	172.00	70.11	
Carbono (g m <sup>-3</sup> )	221.21	67.36	-----	96.00	35.05	
Fracción de C		<b>0.30</b>	-----	<b>0.43</b>	<b>0.16</b>	<b>0.89</b>
Cepa C2 limitada por nitrógeno en el reactor TPPB						
Total (g m <sup>-3</sup> )	334.85	481.97	-----	109.00	68.23	
Carbono (g m <sup>-3</sup> )	251.14	131.45	-----	60.84	34.11	
Fracción de C		<b>0.52</b>	-----	<b>0.24</b>	<b>0.13</b>	<b>0.89</b>

Según los resultados obtenidos durante todos los experimentos en donde se estudió la acumulación de PHB, a partir de los 12 días de biotransformación la cantidad de PHB permanece constante, este es un indicativo de que el proceso fue concluido y los procesos de

separación y recuperación del polímero deben comenzar, esta sería la estrategia a seguir durante los procesos de degradación de metano y acumulación de PHB.

#### 6.2.5 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS ENTRE LA CEPA C2 Y EL CONSORCIO.

La Figura 24 muestra la eficiencia de remoción, la  $R_{CH_4/X}$  y producción de  $CO_2$  específicas, por la cepa C2 y el consorcio. Se puede observar que la cepa tiene  $R_{CH_4/X}$  mayor a la del consorcio lo que implica un incremento del 84% en la actividad específica. Este resultado es mejor que lo presentado por los biofiltros en la Tabla 3. En el estudio realizado dentro del grupo de trabajo con el consorcio metanotrófico por Rocha *et al.*, 2009 se encontró que la  $R_{CH_4/X}$  fue de  $25 \text{ mg g}_x^{-1}\text{h}^{-1}$  con el STR y de  $15 \text{ mg g}_x^{-1}\text{h}^{-1}$  usando el biofiltro de lecho escurrido (BLE), ambos resultados se registraron como consecuencia de la adición del aceite de silicón. En este caso, la adición de aceite de silicón mejoró la degradación de metano un 41% para el STR y un 131% en el BLE, esto muestra que la cepa estudiada presenta tasas de consumo de metano 75% mejores que el consorcio estudiado.



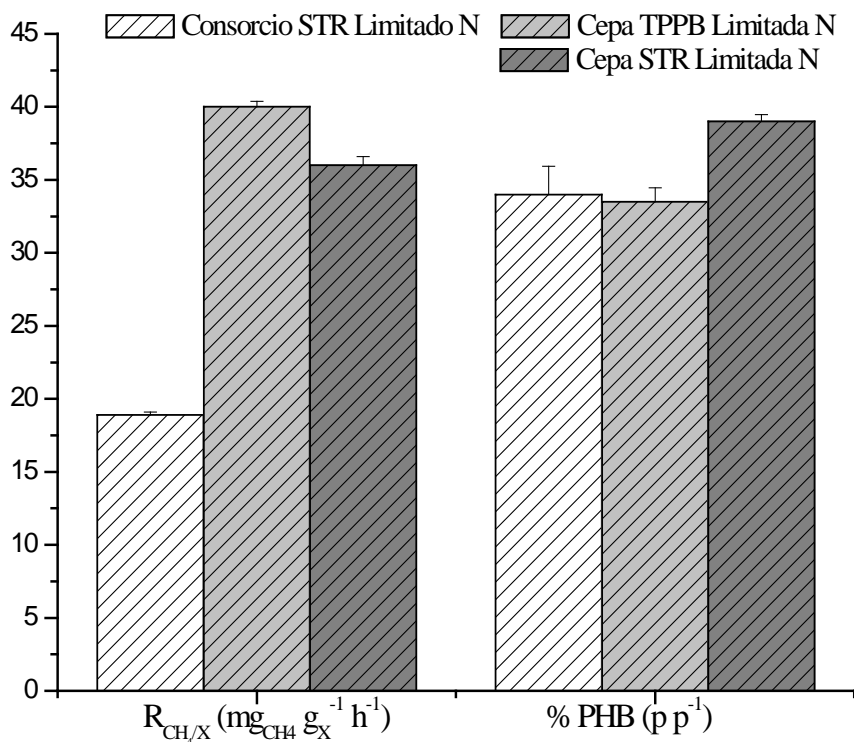
**Figura 24.** Comparación de la cepa con el consorcio en un STR.

La fracción de C-CO<sub>2</sub> producido a partir de C-CH<sub>4</sub> es de 0.53 para la cepa y 0.78 en el consorcio, indicativo de que la cepa es capaz de sintetizar una mayor cantidad de biomasa a partir de CH<sub>4</sub> y eventualmente producir PHB. En cuanto a la eficiencia de remoción con la cepa pura se observó que es un 13% mayor.

Al poner en contacto a los microorganismos con la segunda fase (aceite de silicón), se podrían presentar algunos cambios respecto a la R<sub>CH<sub>4</sub>/X</sub> ya que era posible que los microorganismos no pudieran adaptarse a la segunda fase líquida.

Al adicionar aceite de silicón la R<sub>CH<sub>4</sub>/X</sub> se incrementó solamente un 65%, es importante mencionar que la fracción de carbono para la producción de biomasa de la cepa permaneció constante en 0.47 y para el consorcio cambió de 0.22 a 0.19.

Con los experimentos limitados por nitrógeno se conservó la superioridad de la cepa pura con una mejor R<sub>CH<sub>4</sub>/X</sub>, el porcentaje de PHB en promedio en todos los casos osciló entre el 33.5-39% p p<sup>-1</sup>, el valor mayor fue para la cepa pura estudiada en el reactor de tanque agitado (Figura 25).



**Figura 25.** Comparación de la cepa con el consorcio cuando estaban limitadas por nitrógeno.

**Tabla 17.** Comparación de los resultados del presente estudio con resultados obtenido por otros autores, en cuanto a la producción de PHB con microorganismos metanotróficos a partir de metanol.

Microorganismo	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Productividad (g <sub>PHB</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Productividad (mg <sub>PHB</sub> g <sub>x</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Contenido de PHB (%)	Referencia
<i>Methylobacterium extorquens</i>	132	0.98	7.4 ± 0.3	35	Hosseini <i>et al.</i> , 2009
<i>Methylobacterium sp.</i>	172	0.83	4.8	28.9	Kim <i>et al.</i> , 2003
<i>M. extorquens</i>	107	0.48	4.4	42.5	Borque <i>et al.</i> , 1995
Consorcio en un STR	1.17	0.0021	1.83±0.074	34	Este estudio
Cepa C2 en STR	0.290	0.00065	1.24 ± 0.050	39.5	Este estudio
Cepa C2 en TPPB	0.230	0.00082	1.61 ± 0.073	33.5	Este estudio

En la Tabla 17 se muestran las productividades máximas de acumulación de PHB donde las calculadas con este estudio fueron determinadas ajustando los datos al modelo de Gompertz (Apéndice E). También se muestran las productividades volumétricas reportadas para otros microorganismos metanotróficos, estas productividades son considerablemente mayores a las calculadas para los microorganismos obtenidos en nuestro trabajo. Sin embargo, al estimar las productividades específicas éstas son del mismo orden de magnitud aunque todas son mayores que las determinadas durante este estudio. En parte la diferencia puede deberse a que el sustrato empleado en esos casos fue metanol, compuesto soluble en agua y completamente disponible para los microorganismos de esta forma se puede llegar a alcanzar crecimiento balanceado para obtener altas concentraciones celulares. En el caso del uso de metano como sustrato y debido a su baja solubilidad el crecimiento y metabolismo dependen tanto de la disponibilidad de este como de la habilidad de los microorganismos para consumirlo; aún así

las productividades calculadas en este estudio son comparables con las reportadas. Producir PHB a partir de metanol implicaría un costo extra debido al sustrato y en el caso del metano no es así ya que es un residuo contaminante, esto continuaría con la tendencia biotecnológica de generar compuestos de valor agregado como biopolímeros o en el caso de la patente citada donde se generan biocombustibles a partir corrientes contaminadas con etanol (PCT patente mundial WO 2008/0286854 A1).

### **6.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPA AISLADA C2**

Se lograron leer 2 secuencias de 159 y 285 pb duplicados de la cepa C2 se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos y se identificó a la cepa como *Methylobacterium organophilum*, con el 98% de confianza, las secuencias se muestran a continuación.

#### 6.3.1 Secuencia C2

```
TCCTAGGGGGCGGGCTAAAAATGGCAAGTCGAACGCATCCTTCGGGATGAGTGGC
AGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTACCCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGGAA
ACTTGAGCCCATACCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGT
```

#### 6.3.2 Secuencia C2 duplicado

```
TGGGGAAAAAGGGGGAGGGTTACCTGCAGTCGAACGCATCCTTCGGGATGAGTG
GCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTACCCTTCGGTTCGGAATAACTCAGGG
AAACTTGAGCTAATACCGGATACGCCCTTTTGGGGAAAGGTTTACTGCCGAAGGA
TCGGTCCGCGTCTGATTAGTTAGGTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGAT
CAGTAGCTGGTCTGAG
```



## 7. CONCLUSIONES

1. Se determinó cualitativamente y cuantitativamente la presencia de PHB en la cepa aislada C2 y el consorcio metanotrófico.
2. La cepa C2 tiene mayor velocidad de degradación específica de metano que el consorcio, 5.5 veces mayor cuando no hay ninguna limitación nutricional y no hay segunda fase inmisible.
3. La cepa C2 presenta velocidades específicas de degradación de metano superiores a las reportadas por otros microorganismos con alta capacidad para degradar metano como *Methylosinus trichosporium* OB3b y *Methylocystis* sp.
4. La cepa C2 puede acumular hasta el 56 % en peso de PHB.
5. El aceite de silicón en el reactor mejora un 33 % la biodegradación de CH<sub>4</sub> para el consorcio y un 12.5 % para la cepa pura. Esto hace de los reactores de partición de dos fases líquidas una alternativa prometedora para mejorar la remoción de CH<sub>4</sub> a bajas concentraciones.
6. La presencia de una fase no acuosa como el aceite de silicón en el medio no afecta la acumulación de PHB, pero mejora la CE y los procesos de transferencia de masa al inicio de la biotransformación.
7. Existe la posibilidad de generar un bioproceso para la remoción de metano a bajas concentraciones y acumulación de un biopolímero de interés industrial ya que los microorganismos estudiados son capaces de realizar este proceso.

## **8. PERSPECTIVAS**

El estudio de la degradación de metano y la evidencia de que hay cepas capaces de acumular PHB en el consorcio estudiado, abre diferentes posibilidades para continuar la investigación.

Una es mejorar la producción de PHB a nivel reactor a través de modificar las condiciones de operación (agitación, carga, etc), así como la composición del medio de cultivo.

Otra vía de estudio es profundizar en el conocimiento del metabolismo del metano por medio de herramientas de ingeniería metabólica, como el análisis de flujos metabólicos, modificaciones en las condiciones de operación adicionando diferentes cosustratos, los cuales podrían aumentar la cantidad de PHB acumulado.

## APÉNDICES

### A. MÉTODO DE LOWRY

La concentración de biomasa se determinó por medio de método de cuantificación de proteína soluble de Lowry. La curva de calibración se realizó utilizando una solución estándar de proteína. Análisis de muestras.

- 1.-Se centrifuga 1 mL de muestra a 13 000 rpm (hacer 3 repeticiones).
- 2.-Al sedimento (pellet) se agrega 1000  $\mu$ L de NaOH 0.2 N, se agita hasta disolver el pellet completamente.
- 3.-Se somete a baño María en agua hirviendo, por 15 min.
- 4.-Se deja enfriar
- 5.-Tomar 200  $\mu$ L de muestra obtenida
- 6.-Se adicionan 100 $\mu$ l de reactivo (Bio-Rad, Dc Protein Assay, Reagent A, Catalog 500-0113) y agitar
- 7.-Se adicionan 800 $\mu$ L de reactivo (Bio-Rad, Dc Protein Assay, Reagent B, catalog 500-0114) y agitar
- 8.-Se deja reposar por 15 minutos en la oscuridad
- 9.-Se lee a  $\lambda = 750$  nm.

Blanco que permita calibrar el espectrofotómetro, el cual se prepara con 200  $\mu$ l de agua destilada y siguiendo los pasos descritos a partir del punto 2.

### B. TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es un método realizado para distinguir a las bacterias con pared celular de las que no la tienen. Los pasos para realizar dicha tinción, son los siguientes:

1. Tomar una asada y ponerla en el portaobjetos y diluirla con agua destilada.
2. Poner 1 gota de cristal violeta (tinción de Gram) durante 1 minuto.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Poner 1 gota de lugol durante 1 minuto.
5. Enjuagar, nuevamente, con agua destilada.
6. Limpiar con decolorante (Acetona 50 % y etanol 50 %) hasta lavar todo el tinte.

7. Enjuagar una vez más con agua destilada.
8. Poner una gota de safranina durante 1 minuto
9. Enjuagar con agua destilada.

### **C. DETERMINACIÓN DE PHB (PRUEBA CUALITATIVA)**

#### **Tinción con Azul del Nilo A (Tinción fluorescente para identificar Poly- $\beta$ -hidroxibutirato) [Ostle y Holt, 1982].**

##### Soluciones

1. Preparar una solución 1 % de Azul del Nilo A, para disolver el Azul del Nilo es necesario aplicar un calor moderado durante la agitación. Una vez disuelta la mayor cantidad de Azul del Nilo A la solución debe ser filtrada a través de una membrana estéril de 0.45  $\mu\text{m}$ .
2. Solución de ácido acético al 8 %

Procedimiento. Se coloca una gota de muestra sobre un portaobjetos, éstas son fijadas con calor y cubiertas con la solución de Azul del Nilo, después la muestra es fijada nuevamente con un calor de aproximadamente 55 °C por 10 min. Después de la tinción el portaobjetos es lavado con la solución de ácido acético por 1min después de que ésta seco se coloca en cubreobjetos.

Características del microscopio.

Se utilizó el microscopio Olympus que cuenta con una lámpara de epifluorescencia con una longitud de onda de 420 nm.

### **D. DETERMINACIÓN DE PHB (PRUEBA CUANTITATIVA)**

#### **Adaptaciones a dos métodos propuestos por Braunegg *et al.*, 1978; Riis y Mai, 1988.**

##### Soluciones

1. Preparar una solución de 2.0 g de ácido benzoico en 50 mL de propanol, usado como estándar interno.
2. Preparar una solución de 1-propanol con HCl al 20 %.

Procedimiento: Centrifugar 3 mL de muestra en 2 tubos eppendorf (1.5 mL c/u) a 10000 rpm durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y adicionar 1 mL de propanol ácido al 20%

(Solución 2), primero 0.5 mL en el tubo eppendorf, resuspender y vaciarlo en un tubo HACH con rosca, después agregar otros 0.5 mL para enjuagar el tubo eppendorf y vaciarlo en el tubo HACH nuevamente. Adicionar al tubo 2 mL de dicloroetileno, sellarlos con cinta teflón, poner a 100°C durante 4h en el digestor HACH. Una vez concluido el tiempo, enfriar a temperatura ambiente y adicionar un mL de agua desionizada y agitar vigorosamente durante 1min. Dejar reposar y esperar a que se formen las dos fases, tomar la fase orgánica (inferior) con una pipeta pasteur colocarla en un vial, posteriormente se filtra y se inyecta al cromatógrafo de gases 1 µL de muestra siempre y cuando el CG ya haya alcanzado las condiciones antes mencionadas. El tiempo de retención del β -hidroxibutirato y ácido benzoico es de 3.5 min y 4.5 min respectivamente.

### E. AJUSTES POR EL MODELO DE GOMPERTZ

El modelo de Gompertz (Acuña, 1999) es una manera estadística de ajustar los datos a un modelo determinístico, el cual tiene la forma:

$$Sc = \alpha \exp\{-\beta e^{-kt}\}$$

Que se obtuvo de la ecuación diferencial:

$$\frac{dSc}{dt} = -KSc \log \frac{Sc}{\alpha}$$

La obtención de la segunda derivada permite identificar la tasa de cambio de consumo de sustrato.

$$\frac{d^2Sc}{dt^2} = K \left( \log \frac{Sc_0}{\alpha} + 1 \right) \frac{dSc}{dt}$$

Donde  $Sc = \alpha / e$  en el punto de inflexión que corresponde al valor máximo de la tasa de consumo de sustrato, por lo tanto:

$$q_{CH4} = 0.368 K \cdot \alpha = \frac{dSc}{dt_{\max}} = -K \left( \frac{\alpha}{e} \right) \log \left( \left( \frac{\alpha}{e} \right) / \alpha \right) = K \frac{\alpha}{e}$$

La ventaja de usar el modelo de Gompertz es que describe a los datos experimentales para obtener una tasa de consumo máxima. Para ajustar el modelo de Gompertz se pueden utilizar programas comerciales como, por ejemplo, Kaleida, Origin, Statistica, NCSS y Excel.

#### **F. DETERMINACIÓN DE LA DQO DEL SOBRENADANTE EN LOS EXPERIMENTOS DE ACUMULACIÓN DE PHB.**

Para la determinación de DQO se siguió con el protocolo descrito por HACH [APHA, 1998]; donde a tubos con los reactivos  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$  se les adicionó 1 mL del medio previamente filtrado con una membrana de 0.4  $\mu m$ . La mezcla se agitó vigorosamente con un shaker durante 1 min. La mezcla se digirió a 150 °C por 1.5 h en un digestor marca HACH.

Una vez concluido el paso de digestión se midió absorbancia a 650 nm. Se realizó una curva de calibración de 0-250 ppm de DQO teniendo como estándar glucosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson S (1970) *Experimental Microbial Ecology*, 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, New York, pp. 109-111.
- Ackerman JU, Babel W (1997) Grown associated synthesis of PHB in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of internal bottleneck. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 144-149.
- Acuña M, Pérez F, Revah S (1999) Microbial and kinetic aspect of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng.* 63:175-184
- American Public Health Association (1998) *Standard Method for the examination of water and wastewater*, 20th ed., p. 5-17, method 5220 D.
- Apel WA., Dugan PR, Wiebe MR (1990) Use of methanotropic bacteria in gas phase bioreactors to abate methane in coal mine atmospheres. *Fuel.* 70:1001-1003.
- Arriaga S, Muñoz R, Hernández S, Guieysse B, Revah S (2006) Gaseous Hexane Biodegradation by *Fusarium solani* in Two Liquid Phase Packed-Bed and Stirred-Tank Bioreactors. *Environ. Sci. Technol.* 40:2390-2395.
- Arvizu FJL (2005) Registro histórico de los principales países emisores. <http://www.efecto-invernadero\Instituto Nacional de Ecología.mht>, Noviembre 2009.
- Asenjo JA, Suk JS (1986) Microbial conversion of methane into Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB): Growth and intracellular product accumulation in a type II methanotroph. *J. Ferment. Technol.* 64(4):271-278.
- Bilbo CM, Arvin E, Holst H, Splid H (1992) Modelling the growth of methane-oxidizing bacteria in a fixed biofilm. *Wat.Res.* 26(3):301-309.
- Borque D, Pomerleau Y, Groleau D (1995) High cell density production of PHB from methanol by *Methylobacterium extorquens* production of high molecular mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 367-376.

- Braunegg G, Sonnleimer B, Lafferty RM (1978) A Rapid Gas Chromatographic Method for the determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6:29-37.
- Brenner DJ, Krieg NR, Stanley JT, Garrity GM (2005) *Begey's Manual of determinative bacteriology* Second Edition Volumen Two Part A y B. Springer.
- Carolan T, MacLeod, Daugulis AJ (2005) Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochem.* 40:1799-1805.
- Choi JI, Lee SY (1997) Process analysis and economic evaluation for PHB production by fermentation. *Bioprocess Eng.* 17:335-342.
- Daugulis AJ (2001) Two-Phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics. *Trends Biotechnol.* 19:457-462.
- Días ML, Serafim SL, Lemos PC, Reis AM, Olivera R (2005) Mathematical Modelling of a Mixed Culture Cultivation Process for the Production of Polyhydroxybutyrate, *Biotechnol Bioeng*, 92(2):145-160.
- Donovan PK, Anthony C, Murrell, C (2005) Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends Microbiol.* 13(5):195-198.
- Gerbert J, Groengroeft A, Miehllich G (2003) Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Manag.* 23: 609-619.
- Gunnar B, Sundh I, Svensson B (2004) Microbial oxidation of methane at different temperatures in landfill cover soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 48: 305-312.
- Gunnar B, Sundh I, Tunlid A, Frostegard A, Svensson B (1998) Microbial oxidation of methane at high partial pressures in an organic landfill cover soil under different moisture regimes. *FEMS Microbiol Ecol.* 26: 207-217.
- Hansen JE and Makiko S (2001) Trends of measured climate forcing agents, *PNAS.* 98(26).
- Helm J, Wendland KD, Rogge G, Kappelmeyer U (2006) Characterizing a stable methane-utilizing mixed culture used in the syntesis of high-quality biopolymer in an open system. *J. Appl. Microbiol.* 101:387-395.
- Hosseini M, Beagom Z, Farahani V, Shojaosadati E, Abbas A, Ramin K, Vazifekhoran H



- (2009) Effect of feed composition on PHB production from methanol by HCDC of *Methylobacterium extorquens* (DSMZ 1340). J Chem Technol Biotechnol. 84(8)1136-1139.
- Humer M. y Lechner P (1999) Alternative approach to the elimination of greenhouse gases from old landfills. Wast. Manag. Res. 17:443-452.
- Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (2005) Manual of environmental microbiology. American society for microbiology. ASM PRESS. Washington, D.C.
- Littlejohns VJ, Daugulis AJ (2009) A two phase partitioning airlift bioreactor form the treatment of BTEX contaminated gases. Biotechnol. Bioeng. 103(6)1077-1086.
- Jones HA y Nedwell DB (1993) Methane emisión and methane oxidation in land-fill cover soil. FEMS Microbiol. Ecol. 102:185-195.
- Khalil MAK (1999) Non-CO2 greenhouse gases in the atmosphere. Annu. Rev. Energy Environ. 24:645-61
- Kightley D, Nedwell DB, Cooper M (1995) Capacity for methane oxidation in landfill cover soils measured in laboratory-scale soil microcosms. Appl. Environ Microbiol. 61:592-610.
- Kim P, Kim JH, Oh DK (2003) Improvement in cell yield of *Methylobacterium* sp. by reducing the inhibition of medium components for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production. Microbiol Biotech. 19:357-361.
- Lee SY, Middelberg AP, Lee YK (1995) Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. Biotechnol Let. 19(10)1033-1035.
- Liebergesell M, Sonomoto K, Madkour M (1994) Purification of characterization of the PHB sintasa from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of PHB granules. Eur J Biochem. 226:71-80.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2003) Brock Biología de los microorganismos 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España
- Malashenko YR, Pirog TP, Romanovshaya VA, Sokolov IG, Grinberg TA (2001) Search for methanotrophic producers of exopolysaccharides. Appl. Biochem Microbiol. 37(6):599-

602.

- Mirtha EF, López NI, Méndez BS (1995) Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in PHB synthesis. *Can J Microbiol.* 41(1):77-79.
- Morales M, Revah S, Auria R (1998) Star-up and the effect of gaseous ammonia additions on a biofilter for the elimination of toluene vapors. *Biotech. Bioeng.* 60(4):483-491.
- Muñoz R, Villaverde S, Guieysse B, Revah S (2007) Two-phase partitioning bioreactors for treatment of volatile organic compounds. *Biotechnol Advances.* 25:410-422.
- Murrell JC, Radajewski S (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol.* 151:807-814.
- Nielsen DR, Daugulis AJ, Mcleallan PJ (2003) A novel method of simulating oxygen mass transfer in two phase partitioning bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 83:735-742.
- Nielsen DR, Daugulis AJ, Mcleallan PJ (2005) A restructured framework for modelling oxygen transfer in two phase partitioning bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 91:773-777.
- Nikiema J, Bibeau L, Brzezinski R, Heitz M (2006) Biofiltration of methane: An experimental study. *Chem Eng J.* 113:111-117.
- Nikiema J, Brzezinski R, Heitz M. (2007) Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6:261-284.
- Ostle A y Holt JG (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Sartin for Poly- $\beta$ - Hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1):238-241.
- Pawlowska M y Stepniewski (2006) An influence of methane concentration on the methanotrophic activity of a model landfill cover. *Ecol. Eng.* 26:392-395.
- Ramírez GRM, Luma MB, Velazquez MO, Vierna GL, Mejía CA, Tsuzuki RG, Hernandez G (2008) Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de química de la UNAM
- Reinoud S (1998) Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochem.* 41:23-51
- Revah S y Morgan-Sagastume JM (2005) Methods for odor and VOC control. In: Z. Shareefdeen and A. Singh, Editors, *Biotechnology For Odour And Air Pollution*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany (2005) pp. 29–64.

- Revah SM, Ortiz LI (2004). Fundamentos de casos exitosos de biotecnología moderna. Bolivar, ZF, 625-658.
- Riis V and Mai W (1988) Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hidroxibutiric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J. Chrom. 445:285-289.
- Rocha RJ, Sergio B, Sergio H y Sergio R (2009) Methane degradation in two-phase partition bioreactors. Chem Eng J. 152:289-292.
- Rodríguez AS, Valdman B, Madereiros SA (2009) Analysis of methane biodegradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Brazilian J. Microbiol. 40:301-307.
- SEMARNAT, INE (2006) Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología México tercera comunicación nacional ante la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. Pag 52-57.
- Senior PJ, Dawes EA (1973) The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 134, 225-238.
- Serafim S, Lemos P, Oliveira R, Reis M (2004) Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. Biotechnol Bioeng. 87(2)145-160
- Shah NN, Hanna ML, Taylos RT (1996) Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b: Characterization of PHB production under methane-dependent grown conditions. Biotech. Bioeng. 49:161-171.
- Sly LI, Bryant LY, Cox JM, Anderson JM (1993) Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres. J. Appl. Microbiol. Biotech. 39:400-404.
- Stainthorpe AC, Less A, Salmond PC, Dalton H, Murell C (1990). The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Gene. 91:27-34.
- Streese J, Stegman R (2003) Microbiol oxidation of CH<sub>4</sub> from old landfills in biofilters. Wast. Manag. 23:573-580.
- Takeda M, Matsuoka H, Hamana H, Hikuma M (1995) Biosynthesis of PHB by *Sphaerotilus natans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:31-34.
- Visscher AD, Cleemput OV (2003) Induction of enhanced methane oxidation in soils: NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

- inhibition patterns. *Soil Biol Biochem.* 35:907-913.
- Wahlen M. (1993). The global methane cycle. *Annu. Rev. Earth Planet* 21:407-426
- Watanabe I, Hashimoto T, Shimoyama A (1997). Methane-oxidizing activities and methanotrophic populations associated with wetland rice plants. *Bio Fertil Soils.* Springer- Verlag. 24:261-265.
- Wendland KD, Jechorek M, Helm J, Stottmeister U (2001) Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.* 86:127-133.
- Whalen SC, Reece WS, Sandbeck KA (1990) Rapid methane oxidation in a landfill cover soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3405-3411.
- Wilshusen JH, Hettiaratchi JPA, Stein VB (2004) Long-term behavior of passively aerated compost methanotrophic biofilter columns. *Waste Manag.* 24:643-653.
- Xing X, Wu H, Luo M, Wang B (2006). Effects of organic chemicals on growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochem Eng J.* 31:113-117.
- Zenhao D, Moller N, Green J, Weare J (1992) The prediction of methane solubility in natural waters to high ionic strength from 0 to 250 °C and from 0 to 1600 bar. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 1451-1460.
- Zhang Y, Xina C, Chen L, Songa H, Xia C (2008) Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *J Nat. Gas Chem.* 17:103-109.

# AGRADECIMIENTOS

México D.F. a 7 de Enero del 2010

Agradezco a Dios y a mis padres por infundir en mí las ganas de estudiar, trabajar y superarme, además de su apoyo incondicional.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis a mi hermana que gracias a su compañía y amistad hace que me sienta bien para seguir adelante.

## DEGRADACIÓN DE METANO EN REACTORES DE PARTICIÓN DE DOS FASES LÍQUIDAS Y ACUMULACIÓN DE PHB (POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO)

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa, Director del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y en el laboratorio de Procesos y Tecnología de la UNAM Cuernavaca

que presentó

Muy en especial a la Dra. Marcia Morales por el apoyo, entusiasmo y fortaleza brindados, junto con el aporte de sus conocimientos y asesorías para poder concluir este trabajo.

IBT. Nancy Cristal Zúñiga Peña

Al Dr. Eduardo Torres quien asesoró el trabajo realizado.

### Comité Tutorial:

Al Dr. Jorge Gracida por sus aportes y constante apoyo a lo largo del proyecto

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

A los Dr. Marcia Morales y Eduardo Torres por su colaboración en el desarrollo de esta tesis.

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarra

Asesor: Dr. Eduardo Torres Ramírez

A CONACYT por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios.

### Jurado:

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa

Presidente: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Secretario: Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

A mis compañeros de la maestría Daniela, Carlina y Carlos, también a mis compañeros de la planta piloto C-4, José, Gabriel, Armando, Sergio, Luis, Katia, Hebe, Fernando y Guillermo.

Vocal: Dr. Eduardo Torres Ramírez

Vocal: Dr. Guillermo Baquerizo Araya

todos los que si quier no nombre.