



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Cuajimalpa

## CO-CULTIVO DE BACTERIAS METANÓTROFAS Y MICROALGAS PARA LA MITIGACIÓN DE CH<sub>4</sub> Y CO<sub>2</sub>

TESIS

Que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Naturales e Ingeniería

Presenta

M. en C. Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz

Directores

Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesora

Dra. Nancy Cristal Zúñiga Peña

Jurado

Presidente Dr. Elías Razo Flores

Secretaria Dra. Adela Irmene Ortiz López

Vocal Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Vocal Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Junio de 2023



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00022

Matrícula: 2181800262

Co-cultivo de bacterias metanótrofas y microalgas para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Cuajimalpa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ELIAS RAZO FLORES
- DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES
- DR. ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ
- DRA. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ




PATRICIA ELIZABETH RUIZ RUIZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERIA

DE: PATRICIA ELIZABETH RUIZ RUIZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Aprobar

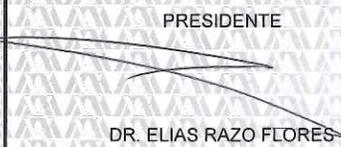
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CNI



DR. JOSE CAMPOS TERAN

PRESIDENTE



DR. ELIAS RAZO FLORES

VOCAL



DR. LUIS CARLOS FERNANDEZ LINARES

VOCAL



DR. ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ

SECRETARIA



DRA. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ

“El Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONAHCYT bajo el número de registro 001466”

Agradecimiento a becas y proyectos:

A CONAHCYT por el apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado (CVU 661471).

A la UAM por la beca para titulación de posgrado otorgada.

Al proyecto PDCPN 2015\_241 por el financiamiento otorgado.



Esta tesis fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa.

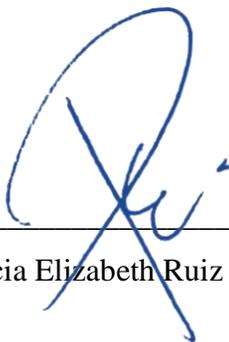
El trabajo experimental fue realizado de enero de 2018 a diciembre de 2022 en el Laboratorio de Bioprocesos y Planta Piloto de Bioprocesos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 19 de junio del año 2023, la que suscribe, Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autora intelectual de la tesis intitulada “Co-cultivo de bacterias metanótrofas y microalgas para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>” realizada bajo la codirección de la Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría y el Dr. Sergio Revah Moiseev y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de los directores del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: [mmorales@cua.uam.mx](mailto:mmorales@cua.uam.mx) y [srevah@cua.uam.mx](mailto:srevah@cua.uam.mx).

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

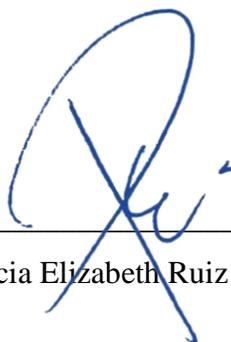


---

Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que, hasta donde es de mi conocimiento, no contiene material previamente publicado o escrito por otras(s) persona(s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que éste fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mis directores y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

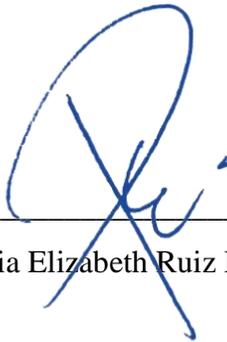


---

Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz

## DECLARACIÓN DE NO LUCRO

La que suscribe, Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz.



---

Patricia Elizabeth Ruiz Ruiz

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, ambos fueron grandes guías para mí y estoy más que agradecida por la oportunidad de trabajar a su lado. A pesar de terremotos, una huelga, una pandemia mundial y un paro estudiantil, siempre conté con el apoyo y las palabras correctas de mis directores, lo que sin duda, me ayudó a ser más resiliente ante los momentos de crisis. Espero poder seguir colaborando con ustedes en los años venideros.

Dra. Marcia. Gracias por ser una gran mentora durante estos años, por su dedicación y atención incansables, por todo el apoyo brindado, por sus consejos y por proporcionar todas las herramientas y recursos para desarrollar este trabajo. En especial, quiero agradecerle por la confianza para dejarme desenvolverme con libertad, por impulsarme a desarrollar mi creatividad y a no detenerme a pesar de los tiempos de incertidumbre. Le admiro y aprecio mucho, usted es mi mayor ejemplo como mujer de ciencia.

Dr. Revah. Muchas gracias por compartir su amplia experiencia y conocimientos conmigo; gracias por motivarme a ser más crítica y a analizarlo todo desde distintos ángulos. Ha sido un gran mentor para mí, siempre disponible para dudas, revisiones y sugerencias; por propiciar un ambiente de trabajo de confianza y de respeto; por proporcionar las herramientas y los recursos para el desarrollo y conclusión de este proyecto. Ha sido un gran guía académico y de vida para mí. Le aprecio mucho.

A mi asesora Dra. Cristal Zúñiga por su siempre pronta atención, consejos y revisiones durante el desarrollo de este proyecto. A mi jurado de examen: Dra. Irmene Ortiz, Dr. Alfredo Martínez, Dr. Elías Razo y Dr. Luis Carlos Fernández, por su valiosísimo tiempo para las revisiones y acertadas aportaciones a este trabajo, lo aprecio mucho. Al maestro Sergio Hernández por todo tu apoyo y eficiencia para resolver cualquier situación en el laboratorio. Al Dr. Gabriel Vigueras por su apoyo con el procesamiento de muestras para el análisis elemental. A la Dra. Tania Gómez por su apoyo en la ejecución de los experimentos de microcosmos y fuentes de N.

A los grandes amigos que hice en este camino. Alexis, amigo gracias por todas las charlas de vida y de ciencias, por las aventuras en volcanes activos (y vivir para contarlos), por tu confianza y por ser un gran equipo, te aprecio y admiro muchísimo. Adrián, güero gracias por la motivación y tu apoyo constante, te aprecio y admiro mucho mi *team* norteño. Los días de cafecito, cervezas y charlas con ustedes, hicieron la diferencia. A Tania, amiga muchas gracias por tu amistad todos estos años, desde la maestría has sido un gran ejemplo para mí, te aprecio muchísimo, nos vemos en Europa ;). A Sol por tu amistad y apoyo con cualquier tema de vida, gatos o ciencia. A Brenda y Violeta por su confianza y por echarme la mano de vez en cuando con los experimentos, espero haber contribuido positivamente en su formación académica. A los alumnos que en el camino formaron parte del equipo metanótrofo, Geovanni, Porfirio, Vero, Mitzi... y a mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos y Planta Piloto, mucho éxito en sus proyectos de vida.

A mis papás Briscia y Daniel, por creer siempre en mí y apoyarme en cada decisión de este largo camino. Gracias por prepararme con las mejores herramientas para la vida y por

impulsar en mí el constante crecimiento. Los amo. A mi hermana Diana. Sister, siempre serás mi role model. Gracias por brindarme tu apoyo incondicional, por entenderme como nadie y ser mi mayor pilar toda la vida, te amo.

A mis mejores amigas Ana Pati, Beti y Thelma. Gracias por ser mi red de apoyo desde hace más de 17 años... toda una vida juntas, sin importar la distancia, siempre he contado con ustedes en cada momento de crisis y de logros ¡Son las mejores! Las amigas salvan vidas, las amo. A mis amigos Claudia, Tori, Ariel, Chikis, Luna, gracias por sus constante apoyo y las reuniones pandémicas por zoom y una que otra reunión presencial (justas y necesarias), los quiero mucho.

A mi esposo René. Gracias por ser mi mejor equipo y por nuestra familia tan bonita: los michis tú y yo. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu paciencia, por creer en mí y por ser mi mayor porrista. Gracias por acompañarme en este viaje de vida, por aventarte a la aventura conmigo, sea irnos lejos de nuestra tierra para cumplir sueños y metas, en otra ciudad, otro estado u otro continente (¡ya casi!); o sea escalar montañas y volcanes conmigo, siempre sin miedo y con mucha ambición para ir por más. Escogí al mejor compañero de vida. Los esfuerzos siguen dando resultados. Estoy muy orgullosa de nosotros. Se logró. Te amo.

*A todas las **mujeres** científicas que me han guiado,  
motivado e inspirado con su ejemplo.*

# ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE.....	10
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABLAS .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN .....	16
ABSTRACT .....	18
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	20
1.1. ANTECEDENTES .....	22
1.1.1. Gases de efecto invernadero: CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> .....	22
1.1.2. Tecnologías para el tratamiento de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .....	27
1.1.3. Microorganismos que intervienen en la oxidación de CH <sub>4</sub> y fijación de CO <sub>2</sub> ....	33
1.1.4. Co-cultivos: sinergia entre bacterias y microalgas.....	38
1.2. ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN .....	44
1.3. JUSTIFICACIÓN .....	48
1.4. HIPÓTESIS.....	50
1.5. OBJETIVOS .....	50
1.5.1. OBJETIVO GENERAL .....	50
1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	51
CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE DIFERENTES CONDICIONES DE CO-CULTIVO EN MICROCOSMOS.....	52
2.1. INTRODUCCIÓN .....	52
2.2. METAS .....	53
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.3.1. Microorganismos y medios de cultivo .....	54
2.3.2. Ensayos en microcosmos: Proporción inicial de biomasa y concentración de CH <sub>4</sub> .....	55
2.3.3. Caracterización molecular del CMA: CMA1 y CMA2 .....	57
2.3.4. Distribución de poblaciones por citometría de flujo .....	58
2.3.5. Ensayos en microcosmos: Fuentes de nitrógeno.....	58
2.3.6. Procedimientos analíticos.....	59
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	61

2.4.1. Efecto de la proporción inicial de biomasa y concentración de CH <sub>4</sub> .....	61
2.4.2. Destino del carbono en los co-cultivos .....	67
2.4.3. Distribución de los grupos microbianos (citometría de flujo).....	69
2.4.4. Diversidad molecular del CMA .....	71
2.4.5. Efecto de la fuente de nitrógeno.....	76
2.5. CONCLUSIONES PARCIALES .....	80
2.6. RECOMENDACIONES.....	81
<b>CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL CO-CULTIVO EN UN FOTOBIOREACTOR DE TANQUE AGITADO.....</b>	<b>82</b>
3.1. INTRODUCCIÓN .....	82
3.2. METAS .....	83
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
3.3.1. Pruebas en lote con iluminación continua y control de pH fotónico .....	84
3.3.2. Lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .....	85
3.3.3. Procedimientos analíticos.....	86
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	88
3.4.1. Lote con iluminación continua (sin control de pH).....	88
3.4.2. Lote con control de pH fotónico .....	91
3.4.3. Lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .....	96
3.5. CONCLUSIONES PARCIALES .....	106
3.6. RECOMENDACIONES.....	106
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>107</b>
4.1. CONCLUSIONES .....	107
4.2. PERSPECTIVAS.....	109
5. REFERENCIAS .....	110
6. ANEXOS.....	120
7. SEMBLANZA, PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	133

# LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.1.</b> Configuración esquemática de los principales biorreactores reportados en literatura para la mitigación de CH <sub>4</sub> .	28
<b>Figura 1.2.</b> Configuración esquemática de los fotobiorreactores más comunes para la captura de CO <sub>2</sub> con microalgas.	30
<b>Figura 1.3.</b> Distribución de diferentes especies de carbono inorgánico en función del pH.	31
<b>Figura 1.4.</b> Descripción general del metabolismo metanotrófico y los metanótrofos involucrados.	34
<b>Figura 1.5.</b> Reacciones luminosas y de asimilación de carbono en la fotosíntesis.	36
<b>Figura 1.6.</b> Estrategia experimental general de este estudio.	51
<b>Figura 2.1.</b> Reactor de tanque agitado para el enriquecimiento del CMA.	54
<b>Figura 2.2.</b> Columna de burbujeo utilizada para la propagación de <i>S. obtusiusculus</i> .	55
<b>Figura 2.3.</b> Botellas serológicas utilizadas para los ensayos en microcosmos.	57
<b>Figura 2.4.</b> Consumo de CH <sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 1:1 y 3:1 con 4% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	63
<b>Figura 2.5.</b> Consumo de CH <sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 1:1 y 3:1 con 8% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	63
<b>Figura 2.6.</b> Consumo de CH <sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 4:1 y 5:1 con 4% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	66
<b>Figura 2.7.</b> Consumo de CH <sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 4:1 y 5:1 con 8% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	66
<b>Figura 2.8.</b> Distribución del carbono (% C) para los experimentos de proporciones de biomasa CMA-SO y los controles CMA.	68
<b>Figura 2.9.</b> Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final de los ensayos 1:3 y 3:1 con 8% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	71
<b>Figura 2.10.</b> Abundancia de filamentos bacterianos durante los experimentos CMA1 y CMA2.	72
<b>Figura 3.1.</b> Fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) con luces LED utilizado para evaluar el co-cultivo CMA-SO durante los ensayos en lote.	85
<b>Figura 3.2.</b> Fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) con sistema Arduino y unidad LED utilizados para evaluar el co-cultivo CMA-SO durante la operación en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	86
<b>Figura 3.3.</b> Datos del co-cultivo CMA-SO en el FBTA durante el experimento en lote con iluminación continua.	89

<b>Figura 3.4.</b>	Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final dentro del FBTA durante el experimento en lote con iluminación continua.	91
<b>Figura 3.5.</b>	Datos del co-cultivo CMA-SO en el FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico.	93
<b>Figura 3.6.</b>	Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final dentro del FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico.	95
<b>Figura 3.7.</b>	Biomasa producida acumulada y nitrógeno consumido durante la operación del co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	96
<b>Figura 3.8.</b>	Crecimiento de biomasa y concentración de nitrógeno durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	97
<b>Figura 3.9.</b>	Observación del co-cultivo con un aumento de 40X al microscopio óptico.	97
<b>Figura 3.10.</b>	Recuentos celulares de <i>Scenedesmus obtusiusculus</i> durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	98
<b>Figura 3.11.</b>	Biomasa producida acumulada graficada contra el nitrógeno consumido durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	99
<b>Figura 3.12.</b>	Composición de la fase gaseosa a lo largo del tiempo en diferentes días de operación durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	100
<b>Figura 3.13.</b>	Datos de pH (A) y OD (B) registrados con Arduino y concentraciones de alimentación de CH <sub>4</sub> .	102
<b>Figura 3.14.</b>	Carbono soluble de muestras filtradas durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	104
<b>Figura 3.15.</b>	Composición bioquímica del co-cultivo durante la operación en lote con alimentación intermitente de CH <sub>4</sub> .	105

# LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.1.</b> Fuentes de emisión de GEI en México en el año 2015 (emisiones netas en Gg CO <sub>2</sub> e). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2018).	26
<b>Tabla 1.2.</b> Descripción, ventajas y desventajas de reactores comúnmente utilizados para el tratamiento de corrientes que contienen CH <sub>4</sub> .	29
<b>Tabla 1.3.</b> Revisión bibliográfica de estudios del co-cultivo de metanótrofos y microalgas.	41
<b>Tabla 1.4.</b> Resumen de los trabajos del uso de metanótrofos del grupo para el tratamiento de corrientes que contienen CH <sub>4</sub> .	46
<b>Tabla 2.1.</b> Proporciones de biomasa CMA-SO y CH <sub>4</sub> inicial en el espacio de cabeza.	56
<b>Tabla 2.2.</b> Resultados para el experimento CMA1 con proporciones de biomasa CMA-SO 1:1, 1:3, 3:1 y controles CMA con 4% y 8% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	62
<b>Tabla 2.3.</b> Resultados para el experimento CMA2 con relaciones de biomasa CMA-SO 3:1, 4:1, 5:1 y controles CMA con 4% y 8% de CH <sub>4</sub> en el espacio de cabeza.	65
<b>Tabla 2.4.</b> Proporción de cada grupo microbiano (%) dentro de 10,000 recuentos celulares obtenidos por citometría de flujo para las diferentes proporciones de biomasa CMA-SO probadas en este estudio al comienzo y al final de los ensayos cinéticos.	69
<b>Tabla 2.5.</b> Principales afiliaciones taxonómicas obtenidas del alineamiento de las OTUs de CMA con secuencias de referencia de la base de datos SILVA (para la región V4 del gen 16S rDNA).	75
<b>Tabla 2.6.</b> Resultados de los controles CMA y los co-cultivos CMA-SO para los ensayos de microcosmos con NaNO <sub>3</sub> , CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> y NH <sub>4</sub> Cl como fuentes de N.	77
<b>Tabla 3.1.</b> Balances de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> de consumo/producción individual (estimado) y general (CMA-SO) en el FBTA para el experimento en lote con iluminación continua.	90
<b>Tabla 3.2.</b> Variaciones y tasas de oxígeno disuelto en el FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico.	94
<b>Tabla 3.3.</b> Tasas de producción de protones para el experimento en lote con control de pH fotónico. Las tasas están en átomo-mol H <sup>+</sup> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> .	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CH <sub>4</sub>	Metano
CI	Carbono inorgánico
CMA	Consortio metanotrófico alcalófilo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2e</sub>	Equivalente de dióxido de carbono
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonato
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Urea
COT	Carbono orgánico total
CT	Carbono total
FBTA	Fotobiorreactor de tanque agitado
GEI	Gases de efecto invernadero
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
LED	Diodo emisor de luz
LIE	Límite inferior de explosividad
MMO	Enzima metano monooxigenasa
MSM	Medio de sales minerales
Mt	Megatoneladas
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio
OD	Oxígeno disuelto
OTU	Unidad taxonómica operativa
PCG	Potencial de calentamiento global
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
rpm	Revoluciones por minuto
SO	<i>Scenedesmus obtusiusculus</i>

## RESUMEN

El cambio climático, debido a la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI), es uno de los mayores problemas de la humanidad. La contribución más significativa al inventario de emisiones proviene del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el metano (CH<sub>4</sub>), este último con un mayor potencial de calentamiento global. Continuamente se exploran estrategias para reducir estas emisiones, incluido el uso de bacterias metanotróficas combinadas con microalgas para consumir ambos gases en un solo sistema, con la generación de bioproductos a partir de la biomasa resultante. Sin embargo, los estudios existentes se han centrado principalmente en la prueba de concepto, con información limitada sobre la operación de los reactores y evolución de los cultivos.

En este trabajo se evaluó el co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo (CMA) y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (SO) para reducir las emisiones de los principales gases de efecto invernadero. El consumo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se llevó a cabo a partir de una corriente diluida de CH<sub>4</sub> en aire en condiciones de alcalinidad para favorecer la retención de CO<sub>2</sub>. Diferentes proporciones de inóculo y fuentes de nitrógeno se probaron inicialmente bajo dos concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub> en ensayos de microcosmos en lote para determinar las condiciones que favorecen el crecimiento sintrópico del co-cultivo. Durante estos ensayos se determinaron las tasas de biodegradación específica de CH<sub>4</sub>, balances de carbono y la evolución de las poblaciones, para más tarde, escalar las mejores condiciones a un fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) de 3-L de volumen total con un volumen de operación de 1-L. Durante los experimentos en el FBTA el co-cultivo se ensayó en lote y lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>, este último por más de 30 días, con la implementación de un novedoso control de pH a través de la regulación de la luz (control de pH fotónico). Se dio seguimiento a la cinética de los gases y la biomasa, las actividades relativas de CMA y SO, así como la composición de los productos resultantes.

Los ensayos de microcosmos por lote mostraron que la tasa de biodegradación específica más alta fue de  $589 \pm 0.01 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  obtenida para una proporción de 3:1 CMA-SO ( $p \text{ p}^{-1}$ ) y 8% de CH<sub>4</sub> inicial en el espacio de cabeza. La tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> fue 1.5 veces menor que el valor obtenido únicamente por el consorcio CMA, y se asoció

con el aumento de pH debido al consumo de CO<sub>2</sub> y nitrato por la microalga. La secuenciación masiva reveló la presencia de especies metanotróficas/metilotróficas como *Methylocystis* sp., *Methylomicrobium* sp., *Methylophaga* sp. e *Hyphomicrobium* sp. Se obtuvo un consumo completo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> con las proporciones de biomasa CMA-SO 3:1, 4:1 y 5:1, mientras que, para el resto de las proporciones probadas, más del 70% del CH<sub>4</sub> inicial se transformó en biomasa y carbono inorgánico. Los ensayos de microcosmos en lote también mostraron que las tasas más altas de consumo de CH<sub>4</sub> se obtuvieron utilizando nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como fuente de nitrógeno.

Durante los experimentos en lote con iluminación continua en el FBTA, la tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> fue de 258 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, pero el pH aumentó hasta 9.8. Por ello, se implementó un control de pH fotónico para regular la actividad de las microalgas mediante la disponibilidad de la luz y, por tanto, regular los cambios de pH inducidos por el CO<sub>2</sub> producido vía CMA. Este control permitió que el sistema permaneciera estable a un pH de 9.1 ± 0.05, con una tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> de 196 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, actividad continua y crecimiento simultáneo del co-cultivo, como lo reveló la citometría de flujo. El control de pH fotónico mostró una respuesta rápida y eliminó los problemas de la técnica tradicional de adición de ácido o álcali que aumenta la salinidad, el volumen del medio y los costos del proceso. El co-cultivo demostró robustez y estabilidad durante la operación por más de 30 días. Mantuvo su capacidad de remover eficientemente ambos gases en un solo reactor, con remoción completa de CH<sub>4</sub> y acumulación constante de biomasa. Además, el perfil de biomasa del co-cultivo mostró un incremento de moléculas de reserva como carbohidratos y lípidos, con proteína como el producto más alto (40-52% peso seco), con lo cual esta biomasa podría considerarse una fuente potencial de proteína microbiana. Las condiciones de cultivo y las estrategias de operación presentadas en este trabajo dieron como resultado un sistema de co-cultivo metanotrófico-microalgal exitoso, robusto y estable para la mitigación de GEI, con casi cero emisiones de carbono y producción de biomasa con potencial para diferentes aplicaciones biotecnológicas.

## ABSTRACT

Climate change, due to the accumulation of greenhouse gases (GHGs), is among humanity's biggest problems. The most significant contribution to the emissions inventory is from carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and methane (CH<sub>4</sub>), the latter having a greater global warming potential. Developing strategies to reduce these emissions are continually being explored, including using methanotrophic bacteria combined with microalgae to consume both gases in a single unit together with the generation of bioproducts from the resulting biomass. However, studies have focused mainly on the proof of concept, with limited information on the operation and evolution of the cultures.

This work evaluated the co-culture of an alkaliphilic methanotrophic bacteria consortium (AMB) and the green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (SO) to reduce emissions of the main greenhouse gases. CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> were consumed from a diluted stream of CH<sub>4</sub> in air under alkaline conditions to favor CO<sub>2</sub> retention. Initial conditions such as different inoculum ratios and different nitrogen sources were first screened in batch microcosm assays under two initial CH<sub>4</sub> concentrations to determine the conditions favoring the syntrophic growth of the co-culture. These first assays served to determine the CH<sub>4</sub> specific biodegradation rates, carbon balances, and the evolution of the populations to further scale these conditions to a 3-L stirred tank photobioreactor (STPR) with 1-L of effective operation volume. Then, batch and batch with intermittent CH<sub>4</sub> feed, the latter for more than 30 days, were evaluated in the STPR with a novel photonic pH control following the gases and biomass kinetics, the relative AMB-PM activities, and the composition of the resulting products.

Batch microcosms assays showed the highest specific biodegradation rate was  $589 \pm 0.01 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  obtained for a proportion of 3:1 AMB-SO (w w<sup>-1</sup>) and 8% of initial CH<sub>4</sub> in the headspace. The CH<sub>4</sub> degradation rate was 1.5 times lower than the value obtained solely by the AMB consortium, and it was associated with pH increases due to the consumption of CO<sub>2</sub> and nitrate by the microalga. Increased activity of the AMB consortium along the experiments was due to progressive adaptation. Massive sequencing revealed the presence of methanotrophic/methylotrophic species such as *Methylocystis* sp., *Methylomicrobium* sp., *Methylophaga* sp., and *Hyphomicrobium* sp. Successful complete

CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> uptake was obtained with the 3:1, 4:1, and 5:1 AMB-GM biomass ratios, while for the rest of the ratios tested, more than 70% of the initial CH<sub>4</sub> was transformed into biomass and inorganic carbon. Batch microcosms assays also showed that the highest CH<sub>4</sub> uptake rates were obtained using nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) as nitrogen source.

During batch tests in the STPR with continuous illumination the CH<sub>4</sub> biodegradation rate was 258 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, but the pH increased up to 9.8. A photonic pH control was implemented by modulating the algal activity with light and hence regulating the pH changes induced by the CO<sub>2</sub> produced by the methanotrophic activity of the AMB. This control allowed the system to remain stable at pH 9.1 ± 0.05, with a CH<sub>4</sub> biodegradation rate of 196 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, continuous activity, and concurrent growth of the co-culture, as shown by flow cytometry. The photonic pH control showed a fast response and eliminated the problems of the traditional acid/alkali addition technique that increases salinity, medium volume, and process costs. The co-culture demonstrated stability and robustness during the batch operation with intermittent CH<sub>4</sub> feeding. It maintained its ability to efficiently remove both gases in a single reactor, with complete CH<sub>4</sub> removal and constant biomass accumulation. In addition, the co-culture biomass profile showed an increment of reserve molecules such as carbohydrates and lipids, with protein as the highest product (40-52% DCW) that could be considered a potential source for microbial protein. Culture conditions and operation strategies presented in this work resulted in a successful, robust, and stable methanotroph-microalgae system for GHGs mitigation, with almost zero carbon emissions and biomass production with potential for biotechnological applications.

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la falta de estrategias adecuadas para prevenir los efectos ambientales adversos de las emisiones de GEI, sobre todo de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ , ha impulsado a los gobiernos internacionales a tomar iniciativas para el desarrollo de tecnologías de control y a promover investigación exhaustiva para la creación de sistemas eficientes y robustos que permitan la disminución de estos gases. Entre ellas, las alternativas biotecnológicas son atractivas y adecuadas por sus bajos costos y fácil operación, con la posibilidad de obtener bioproductos a partir de ellas. A pesar de la efectividad de las tecnologías biológicas, todavía existen limitaciones para su implementación a escalas piloto e industrial, y la mayoría de ellas se enfoca en la eliminación de un solo gas. Tal es el caso de la amplia literatura para la oxidación biológica de  $\text{CH}_4$ , en donde se sigue produciendo  $\text{CO}_2$  como subproducto. Ante esto, la posibilidad de eliminar ambos gases en un solo sistema resulta llamativa. En este contexto, el uso de co-cultivos de bacterias metanótrofas combinadas con microalgas se presenta como una estrategia que permitiría el consumo de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  simultáneamente. Actualmente los estudios donde se combina a estos dos grupos microbianos son escasos y se necesita continuar con los esfuerzos para establecer las principales condiciones de cultivo y de operación.

Desde una perspectiva aplicada, la oxidación de  $\text{CH}_4$  y consumo de  $\text{CO}_2$  en estos sistemas puede verse desde dos extremos: como bioingeniería ambiental para mitigar las emisiones atmosféricas provenientes de las actividades antropogénicas o como aplicación biotecnológica para la síntesis de productos. Sea cual sea el fin principal del proceso, para el caso del  $\text{CH}_4$ , al tratarse de un gas poco soluble en medios acuosos, incluso con un suministro adecuado de éste, factores como la transferencia de masa de la fase gas a la líquida, la elección del reactor y las condiciones de operación afectarán la disponibilidad de  $\text{CH}_4$  y de  $\text{O}_2$ , y, por lo tanto, el rendimiento de producción de biomasa y la tasa de síntesis de los productos. La solubilidad del gas y la tasa de transferencia a una solución acuosa están influenciadas por una serie de parámetros operativos, como la temperatura, la composición del medio, el área de contacto superficial del gas y el mezclado, entre otros. El mayor desafío técnico para el consumo de un gas como este sigue siendo una tasa de transferencia eficiente a la fase acuosa. Por otra parte, desde el punto de vista fisiológico, la selección de cepas

compatibles no antagónicas y eficientes para el consumo de los gases y nutrientes, la proporción y evolución de éstos dentro del sistema, la producción e intercambio de metabolitos, por mencionar sólo algunos, son aspectos importantes para lograr sistemas exitosos y robustos.

En este trabajo se utilizó un co-cultivo formado por un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* para evaluar su desempeño en el consumo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, determinar los principales parámetros de operación mediante ensayos en microcosmos y su posterior escalamiento a un fotobiorreactor de tanque agitado a escala laboratorio, operado en lote y lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>. Los resultados aquí presentados aportan información valiosa a la literatura existente de co-cultivos metanotróficos-microalgales, siendo precedente para futuros estudios de optimización, producción de metabolitos de alto valor, así como su implementación en otro tipo de reactores, según sea el fin del proceso.

## **1.1. ANTECEDENTES**

### **1.1.1. Gases de efecto invernadero: CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>**

La acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera, resultante de las actividades humanas y la industrialización, es considerada como la principal causante del cambio climático y se reconoce como uno de los mayores problemas que enfrenta la humanidad (Morales et al., 2017). Dentro de los GEI se encuentran el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), metano (CH<sub>4</sub>), clorofluorocarbonos (CFC) y ozono (O<sub>3</sub>), los cuales son emitidos de diversas fuentes (actividades agrícolas, industriales, domésticas, etc.) y en la actualidad, sus concentraciones atmosféricas han llegado a niveles que no tienen precedentes en al menos 800,000 años (IPCC, 2022).

El CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> son los dos gases más emitidos y con el mayor aporte al cambio climático, representando más del 90% del inventario total de los GEI y se espera que su participación aumente significativamente en este siglo XXI (López et al., 2013). En este sentido, el CO<sub>2</sub> es considerado el GEI más importante ya que constituye aproximadamente el 77% de las emisiones totales (tomando en cuenta tanto el volumen como su potencial de calentamiento global, PCG), y le sigue el CH<sub>4</sub>, que, aunque se emite en menor medida (14%), tiene un fuerte impacto en el cambio climático por su capacidad de atrapar la radiación, la cual es 21 a 75 veces mayor que la del CO<sub>2</sub>, dependiendo del tiempo de referencia considerado (Myhre et al., 2013).

Los valores de CO<sub>2</sub> atmosférico hace 800,000 años se encontraban entre 10 a 172–300 ppm (Lüthi et al., 2008) y desde el comienzo de la Revolución Industrial, las concentraciones de este gas han ido en aumento, desde 280 ppm a 421 ppm en la actualidad (CO<sub>2</sub> Earth, consultado el 26 de febrero de 2023). Si esta tendencia continúa, se espera un aumento adicional del 60% para el año 2100 (Kumar et al., 2018). Esta situación ha provocado un incremento de 0.87 °C en las temperaturas medias globales anuales (Hoegh-Guldberg et al., 2018). Ante este escenario, es probable que las concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> alcancen valores entre 550 y 1000 ppm para fines del siglo (Dusenge et al., 2019), lo que provocará aumentos adicionales de 1 a 3.7 °C en las temperaturas medias globales (Ciais et al., 2013). Además, a pesar de que el confinamiento forzado a principios de 2020 ocasionado

por la pandemia de COVID-19, podría haber ocasionado una disminución en las emisiones y concentración de CO<sub>2</sub>, los reportes han señalado que las concentraciones de este gas han seguido en aumento (Khabiri et al., 2021). Los principales efectos adversos del incremento en la temperatura media de la Tierra incluyen: aumento en la frecuencia y duración de las olas de calor; calentamiento del océano y la atmósfera; aumento del nivel del mar; y el derretimiento de las capas de hielo de Groenlandia y la Antártida (House et al., 2011; Meinshausen et al., 2009). Sin duda, estos fenómenos causarán efectos nocivos para la salud de los seres humanos y la vida como la conocemos. Si bien existen teorías que proponen que las respuestas adaptativas de los microorganismos fotosintéticos podrían ayudar a controlar el calentamiento, mediante el incremento de las tasas netas de actividad fotosintética en los cuerpos oceánicos, los mecanismos de adaptación, cuantificación y predicción todavía siguen siendo estudiados (Schaum et al., 2017). Un mayor entendimiento de estos mecanismos podría entonces ser aplicado en tecnologías para acelerar el combate al cambio climático.

Para el caso del CH<sub>4</sub>, los reportes indican que las concentraciones durante los períodos glaciales estuvieron entre ~350 y ~800 ppb (Loulergue et al., 2008). El aumento anual de 8 ppb entre el año 2007 y 2010 llevó a una concentración atmosférica de 1800 ppb. En 2019, se registró la concentración más alta de CH<sub>4</sub> en la atmósfera durante los últimos 800,000 años, es decir, 1866 ppb, y en 2022 ésta alcanzó un valor de 1920.34 ppb (octubre de 2022) (Dlugokencky et al., 2022). Se estima que las emisiones globales de este gas serán de 9.4 x10<sup>9</sup> toneladas (CO<sub>2</sub>e) en 2020 y aumentarán a 10.2 x10<sup>9</sup> para el 2030 (9% más que en 2020) (Khabiri et al., 2021). Ya que la vida media del CH<sub>4</sub> (12 años en la atmósfera) es menor que la del CO<sub>2</sub> (100 años), la reducción de sus emisiones permitiría tener resultados positivos en un menor tiempo (IPCC, 2014).

Con estas cifras alarmantes y reconociendo la importancia del impacto negativo que tienen las emisiones de CH<sub>4</sub>, en el año 2021, durante la 26<sup>a</sup> Conferencia de Naciones Unidas sobre Cambio Climático (COP26) llevada a cabo en Glasgow, Reino Unido, más de 100 países se adhirieron al compromiso Global de Metano (*Global Methane Pledge*), incluido México. El objetivo es reducir las emisiones globales de metano antropogénico en un 30% para el año 2030. Esta iniciativa fue impulsada por Estados Unidos y la Unión Europea y hasta ahora 150 países han firmado el acuerdo. Los promotores de este pacto aseguran que, si se cumple

la reducción mundial del 30% de las emisiones para 2030, se lograría limitar el calentamiento en al menos 0.2 grados a mediados de siglo. Esto puede contribuir a lograr la meta cada vez más complicada de mantener el aumento de la temperatura global por debajo de los 1.5 grados respecto a los niveles preindustriales.

### **Fuentes de emisión**

Las principales fuentes de emisión de CO<sub>2</sub> incluyen los procesos de producción de electricidad y calor, transporte, la industria y la fabricación de combustibles y otros sectores (comercial, residencial o agrícola) (López et al., 2013). Entre las fuentes industriales se incluyen: carbón (40%), petróleo (35%), gas (20%), cemento (4%) y quema de gas (0.7%) (Bekun et al., 2019; British Petroleum, 2018). Los gases de combustión de estas industrias podrían contener hasta un 15% de CO<sub>2</sub> con concentraciones típicas que oscilan entre 90 y 270 gCO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>.

En el caso del CH<sub>4</sub>, este gas representa un recurso enorme y una oportunidad de conversión en bioproductos, especialmente si puede obtenerse de depósitos de gas natural abandonados, cuya explotación ya no es económicamente rentable, o de otras de fuentes puntuales, como digestores de alta velocidad o rellenos sanitarios cubiertos (Strong et al., 2016). Sólo con el gas natural, el Banco Mundial estima que se desperdician 92 Mt por año debido a la quema de gas o por venteo (WorldBank, 2015). Existen fuentes de metano puntuales que presentan una enorme oportunidad para su captura a nivel global; las proyecciones para 2030 incluyen el biogás que se produce en rellenos sanitarios (43 Mt año<sup>-1</sup>), en el tratamiento de aguas residuales (25 Mt año<sup>-1</sup>) y en el manejo de estiércol (12 Mt año<sup>-1</sup>) (Abbasi et al., 2012). Las concentraciones de CH<sub>4</sub> en el biogás, como se menciona en la literatura, generalmente varían de 30 a 70% v v<sup>-1</sup>, mientras que la concentración de CO<sub>2</sub> varía entre 20 y 50% v v<sup>-1</sup> (Nikiema et al., 2007).

En México y el resto de Latinoamérica, existe una importante cantidad de pequeñas Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) que utilizan un proceso anaerobio, en donde el biogás generado no se quema ni se utiliza para producir energía (Noyola et al., 2012), en su lugar, es simplemente liberado a la atmósfera. Para el caso particular de la digestión anaerobia de las aguas residuales domésticas, el biogás producido contiene aproximadamente

70-80% de metano, 10-25% de nitrógeno, de 5-10% de dióxido de carbono y entre 45 y 537 ppm y hasta 1000 ppm de H<sub>2</sub>S (Noyola et al., 2012). El uso de biogás para la producción de energía sólo es posible cuando la proporción de CH<sub>4</sub> en éste es de más del 30% y cuando las corrientes son de aproximadamente 50 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> (Haubrichs y Widmann, 2006). Para flujos de biogás de 10-15 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> con una proporción de CH<sub>4</sub> superior al 20% es posible eliminarlo quemándolo. Sin embargo, si éste se encuentra por debajo de dichos valores, el proceso de combustión no es técnicamente factible (Rocha-Rios et al., 2009). Además, en estos sistemas anaerobios también se libera metano disuelto en el efluente (hasta 20-60% de la masa total producida), sumándolo a las emisiones fugitivas de GEI que tienen un aporte importante al cambio climático.

En México, las mayores emisiones de CO<sub>2</sub> provienen del sector energético, principalmente de la quema de combustibles, mientras que las actividades del uso de la tierra (ganadería) y los procesos de gestión de residuos (rellenos sanitarios y tratamiento de aguas residuales) son las principales fuentes de emisión de CH<sub>4</sub> (INECC, 2018). En la Tabla 1.1 se enlistan las emisiones de GEI por sector reportadas en el Inventario Nacional de GEI en el año 2015.

**Tabla 1.1.** Fuentes de emisión de GEI en México en el año 2015 (emisiones netas en Gg CO<sub>2</sub>e).

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2018).

<b>ACTIVIDAD Y FUENTES DE EMISIÓN</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>4</sub></b>
<b>ENERGÍA</b>	<b>445,398</b>	<b>31,645</b>
Actividades de quema del combustible	429,894	2,730
Industrias de la energía	164,308	91
Industrias manufactura y de la construcción	63,270	93
Transporte	167,856	330
Otros sectores	34,461	2,217
Emisiones fugitivas provenientes de la fabricación de combustibles	15,504	28,915
Combustibles sólidos		7,787
Petróleo y gas natural	15,504	21,128
<b>PROCESOS INDUSTRIALES Y USO DE PRODUCTOS</b>	<b>40,447</b>	<b>182</b>
Industria de los minerales	22,767	
Industria química	2,831	182
Industria de los metales	14,697	
Uso de productos no energéticos de combustibles y de solvente	94	
Otros	58	
<b>AGRICULTURA, SILVICULTURA Y OTROS USOS DE LA TIERRA</b>		<b>67,156</b>
Ganado		66,132
Fuentes agregadas y fuentes de emisión de la tierra		1,025
<b>RESIDUOS</b>	<b>730</b>	<b>43,093</b>
Eliminación de residuos sólidos		21,921
Tratamiento biológico de los residuos sólidos		117
Incineración y quema a cielo abierto de residuos	730	620
Tratamiento y eliminación de aguas residuales		20,436

Estas fuentes representan una oportunidad para la implementación de tecnologías de control que permitan la captura de las emisiones de GEI y la disminución de su impacto negativo al medio ambiente.

### 1.1.2. Tecnologías para el tratamiento de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>

Diversas tecnologías han sido aplicadas para el tratamiento de emisiones gaseosas, incluidas aquellas para la mitigación de GEI como el CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub>. La selección de la tecnología de tratamiento más adecuada se determina por la naturaleza y concentración de los gases contaminantes y por las tasas de flujo del gas a tratar (Cárdenas et al., 2003).

Para el caso del CH<sub>4</sub>, los métodos de tratamiento físicos/químicos, tales como la adsorción con carbón activado o la incineración, son ineficientes o costosos para las bajas concentraciones que suelen encontrarse en las emisiones del tratamiento de desechos y la ganadería, además de poseer una alta huella de CO<sub>2</sub> como resultado del uso intensivo de energía. De la misma manera, el secuestro de CO<sub>2</sub> a través de métodos físicos/químicos, como el lavado de gases con soluciones alcalinas o de aminas, o la inyección directa en depósitos naturales subterráneos (almacenamiento), conlleva a costos prohibitivos y genera contaminación ambiental secundaria (Khanongnuch et al., 2022; López et al., 2013).

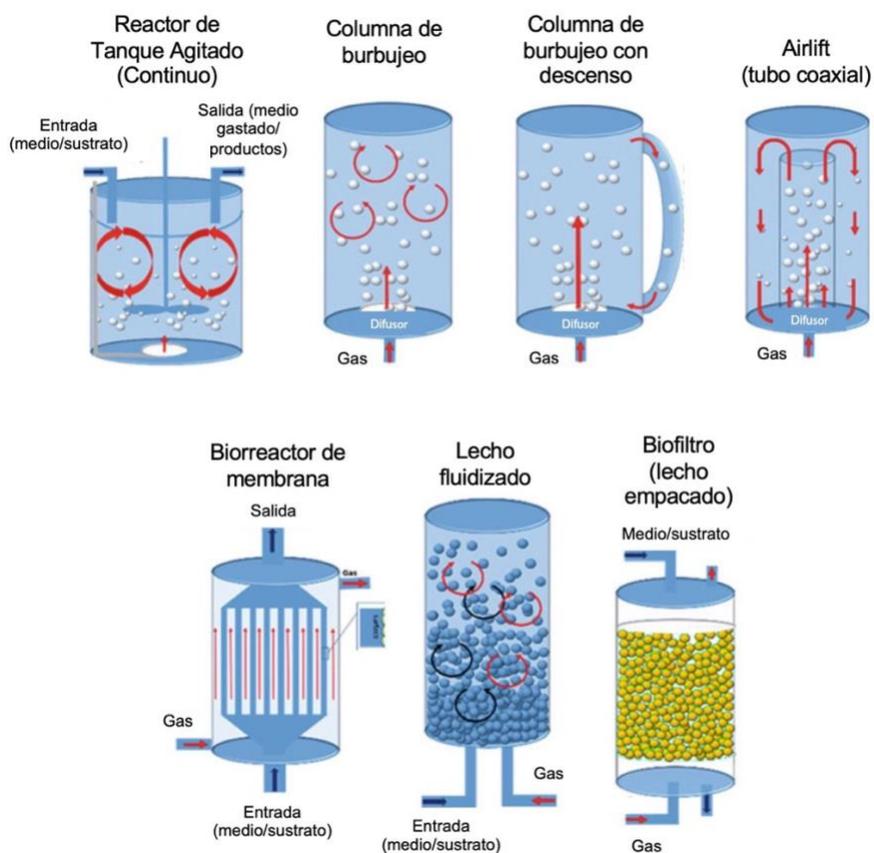
Actualmente las tecnologías biológicas pueden ser consideradas como una opción económica y amigable con el medio ambiente frente a los métodos físicos y químicos (Khanongnuch et al., 2022; López et al., 2013). La idea de utilizar biotecnologías deriva de la forma natural de atenuación y reciclaje de estas fuentes de carbono en la naturaleza, gracias a la acción de microorganismos capaces de utilizar estos gases como fuente de carbono y energía.

Los sistemas biológicos de tratamiento de gases son considerados como tecnologías limpias con base en los siguientes aspectos (Cárdenas et al., 2003):

- Requieren de menor uso intensivo en energía (menor impacto ambiental y costo de operación).
- No utilizan sustancias peligrosas para su operación.
- No requieren condiciones extremas de trabajo (pueden llevarse a cabo a temperaturas medio ambiente, desde los 10 °C a los 40 °C, y a presiones atmosféricas).
- El contaminante es transformado en lugar de sólo transferirse de fase.

Para el caso de la mitigación de emisiones que contienen CH<sub>4</sub>, las configuraciones más utilizadas se presentan en la Figura 1.1 y en la Tabla 1.2 se presenta la descripción, ventajas

y desventajas de algunos de ellos. En estos sistemas es importante considerar la limitación de transferencia de masa ya que el  $\text{CH}_4$  es un compuesto poco soluble ( $m$  de  $\text{CH}_4$   $27 \text{ mL}_{\text{gas}} \text{ mL}_{\text{liq}}^{-1}$  a  $1 \text{ atm}$  y  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), y al estar presente en bajas concentraciones en las corrientes de aire, se dificulta aún más su eliminación en sistemas biológicos. Por lo tanto, además del uso de los sistemas convencionales, se requiere el estudio de nuevas configuraciones de reactores. En este contexto, se ha reportado que la recirculación de la fase gas mejora la transferencia de masa al incrementar la turbulencia en el sistema, esto ha sido probado en biofiltros de lecho empacado (Estrada et al., 2014), sin embargo, también se puede llevar a cabo en sistemas donde la biomasa no necesariamente está en forma de biopelícula. En este sentido, se han reportado estudios donde estos sistemas son efectivos para el tratamiento  $\text{CH}_4$  y además se producen metabolitos de alto valor (Cantera et al., 2016).



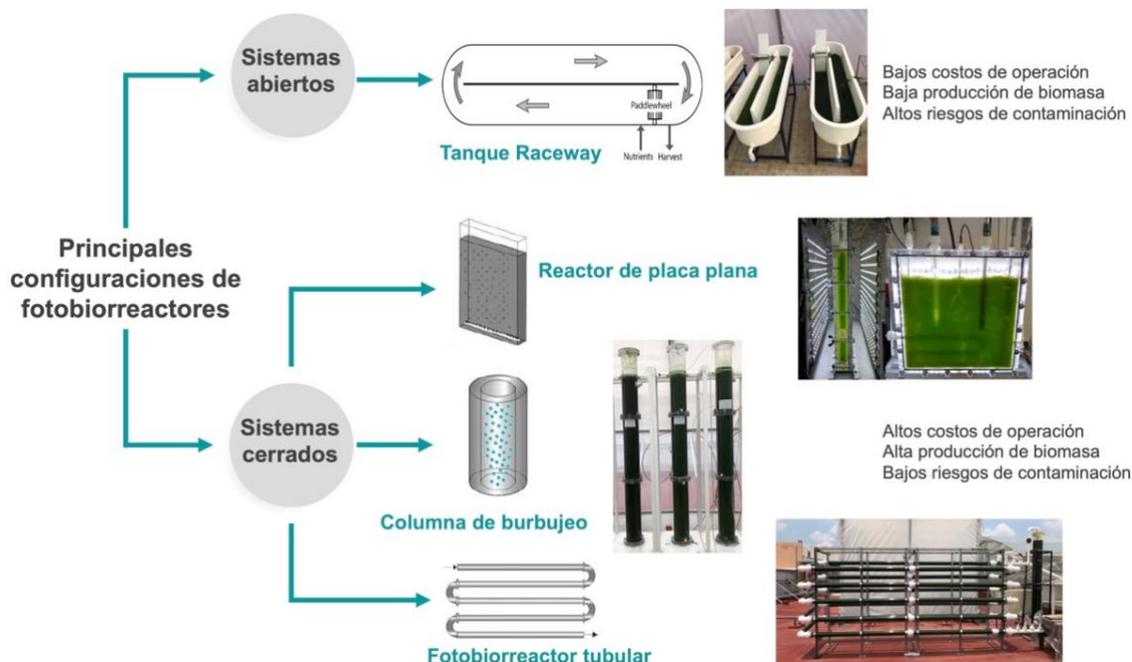
**Figura 1.1.** Configuración esquemática de los principales biorreactores reportados en la literatura para la mitigación de  $\text{CH}_4$ . Las flechas rojas representan el flujo de gas y las flechas negras las entradas y salidas/efluentes. Adaptado de Mühlemeier et al. (2018).

**Tabla 1.2.** Descripción, ventajas y desventajas de reactores comúnmente utilizados para el tratamiento de corrientes que contienen CH<sub>4</sub>. Adaptado de Mühlemeier et al. (2018).

<b>Reactor</b>	<b>Descripción breve</b>	<b>Ventajas/ Desventajas</b>
<b>Columnas de burbujeo ascendente y biorreactores de gas ascendente</b>	Reactores de columna donde el medio es agitado por un gas comprimido neumáticamente a través de un difusor en la base del reactor. La mezcla en las columnas de burbujeo es aleatoria y provocada por burbujas ascendentes. Los biorreactores de gas ascendente se basan en un cambio en la densidad para permitir el mezclado; por lo general se instala un tubo coaxialmente en el reactor o un brazo lateral.	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Buena relación líquido-gas</li> <li>+ Buena transferencia de masa</li> <li>+ Construcción sencilla</li> <li>- Pérdida de presión causada por la altura hidrostática</li> <li>- Alto esfuerzo cortante</li> <li>- Mezcla de gases potencialmente explosiva en el espacio de cabeza</li> </ul>
<b>Reactor de Tanque Agitado</b>	Reactor con agitador mecánico. El eje normalmente gira usando un motor sobre el reactor. Las propelas producen el mezclado. El gas normalmente es disperso desde la base del reactor.	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Es uno de los reactores más estudiados</li> <li>+ Fácil de usar a pequeña escala</li> <li>- Mezcla menos efectiva a gran escala</li> <li>- Esfuerzo cortante mecánico elevado</li> <li>- Alto uso de energía</li> <li>- Producción de espuma</li> <li>- Mezcla de gases potencialmente explosiva en el espacio de cabeza</li> </ul>
<b>Biorreactores basados en membranas</b>	Reactor de tanque agitado que incluye una membrana para la aireación sin burbujeo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Buen suministro de sustrato</li> <li>+ Bajo riesgo de generar una mezcla de gas explosiva</li> <li>- Mala escalabilidad</li> <li>- Ensuciamiento de la membrana</li> </ul>
	Reactor de tanque agitado combinado con una membrana de fibra hueca para el control del tiempo de retención hidráulico del medio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Fácil de usar a escala de laboratorio</li> <li>+ Retención celular a través de la membrana de fibra hueca</li> <li>- Falta de homogeneidad a gran escala</li> <li>- Esfuerzo cortante mecánico elevado</li> <li>- Alto uso de energía</li> <li>- Producción de espuma</li> <li>- Mezcla de gases potencialmente explosiva en el espacio de cabeza</li> </ul>
	Reactor con organismos inmovilizados o enzimas adsorbidas, unidas covalentemente o reticuladas a la superficie de la membrana.	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Condiciones de cultivo “suaves” para los organismos o enzimas</li> <li>+ Suministro constante de sustrato</li> <li>+ Fácil eliminación del producto</li> <li>- Costo intensivo</li> <li>- Sólo para productos de alto valor agregado</li> </ul>
<b>Biorreactor de lecho fluidizado</b>	Reactor que contiene gránulos celulares o células inmovilizadas sobre soportes que tienen una densidad mayor que el medio de cultivo. La dispersión/mezcla	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Sin lavado de células durante fermentación continua</li> <li>- Sólo para la síntesis de productos extracelulares</li> </ul>

	se mantiene mediante recirculación del medio o difusión de gas.	- Costos adicionales por la inmovilización
<b>Filtro de goteo/biorreactor de lecho escurrido</b>	Reactor para tratamiento de aguas residuales. El sistema contiene un reactor de lecho fijo. Para la aireación, los gases se suministran desde el fondo a través del lecho fijo. Para el tratamiento de aguas residuales y para proporcionar el lecho fijo, las aguas residuales fluyen hacia abajo por el lecho fijo.	+ Proceso simple y confiable + Bajo costo + Bajo uso de energía - Taponamiento

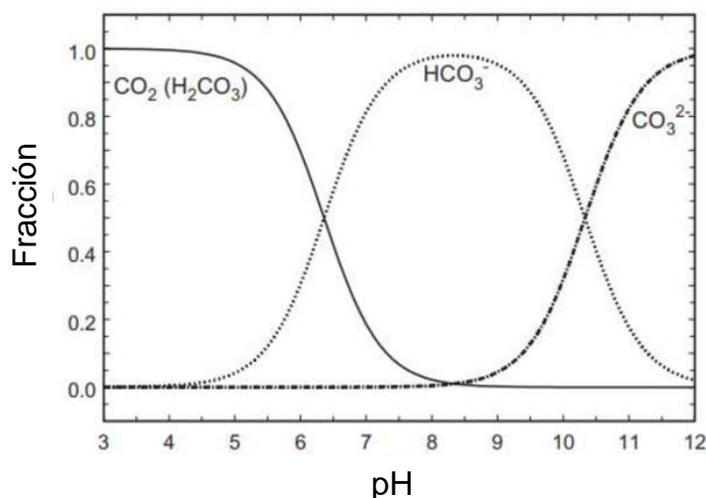
Por su parte, las configuraciones más utilizadas para la captura de CO<sub>2</sub> se muestran en la Figura 1.2. Aunque aquí se presentan como tecnologías que podrían aplicarse para el tratamiento o eliminación de emisiones que contienen CO<sub>2</sub>, el fin principal de la mayoría de estos reactores ha sido la producción de biomasa microalgal de valor agregado.



**Figura 1.2.** Configuración esquemática de los fotobiorreactores más comunes para la captura de CO<sub>2</sub> con microalgas (Adaptado de Ruiz-Ruiz et al., 2020).

Contrario al CH<sub>4</sub>, el CO<sub>2</sub> es un gas altamente soluble ( $m$  de CO<sub>2</sub> 1 mL<sub>gas</sub> mL<sub>liq</sub><sup>-1</sup> a 1 atm y 20 °C). En estos sistemas, el pH tiene un efecto importante sobre el equilibrio químico de las diferentes especies de carbono inorgánico (Figura 1.3). En condiciones ácidas se favorece la

presencia de carbono en forma de  $\text{CO}_2$  libre; a valores de pH neutro o ligeramente básicos la especie predominante es el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ); y a valores elevados de pH (10-14) la especie predominante son los carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Morales et al. 2015).



**Figura 1.3.** Distribución de diferentes especies de carbono inorgánico en función del pH. Adaptado de Dodds et al. (2002).

Dependiendo de la configuración de reactor seleccionada, también se puede elegir el modo de operación del sistema y con ello buscar optimizar la captura de los gases y la producción de biomasa. Los tres tipos de operación más comunes en el funcionamiento de biorreactores son la operación por lote, lote alimentado y la operación en continuo. Durante la operación por lote, los nutrientes se agregan al inicio y la biomasa o productos se cosechan hasta el final del proceso, resultando en un sistema simple de operar. La operación por lote alimentado es una técnica que se basa en la adición intermitente de nutrientes o parte de ellos al biorreactor; los sistemas de cultivo por lote alimentado son frecuentemente usados para obtener altas concentraciones celulares y mejorar la productividad, así como para minimizar los problemas de inhibición. Por último, durante la operación en continuo se alimentan nutrientes y retiran productos continuamente para llegar al estado estacionario.

La tendencia actual sobre la implementación de sistemas de control y mitigación de los GEI no debería limitarse a que los sistemas sean sólo eficientes y económicos, sino que permitan la valorización de las corrientes del proceso. De esta manera, el uso de tecnologías biológicas como alternativa para la captura de GEI a través del uso de bacterias que asimilan  $\text{CH}_4$  (metanótrofos) y organismos fotosintéticos que fijan el  $\text{CO}_2$  (microalgas), se presenta como

una opción que permitiría, además de la mitigación de estos gases, la producción de biomasa que podría utilizarse como fuente de proteína microbiana, o la obtención de otros productos, por ejemplo, bioplásticos, pigmentos, lípidos, ectoína, entre otros.

### 1.1.3. Microorganismos que intervienen en la oxidación de CH<sub>4</sub> y fijación de CO<sub>2</sub>

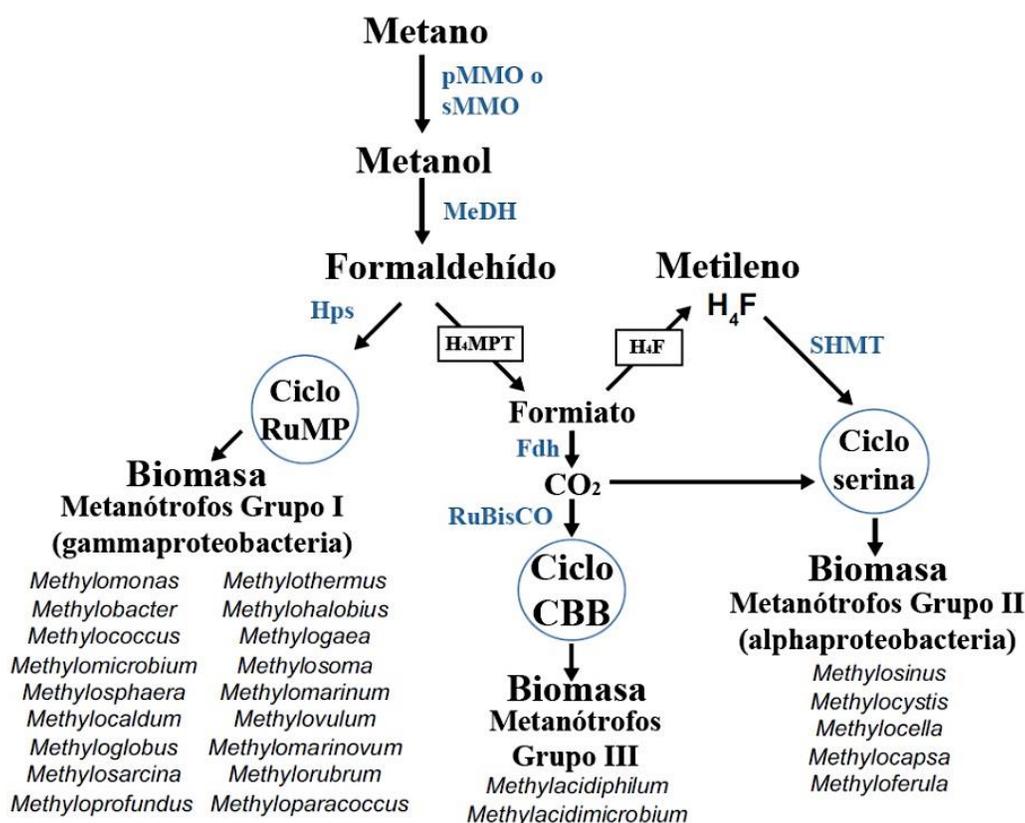
#### Metanótrofos

Los metanótrofos aerobios son un subconjunto único de bacterias metilotróficas que pueden utilizar CH<sub>4</sub> como única fuente de energía (Hanson & Hanson, 1996; Semrau et al., 2010). Una característica definitoria de estos organismos es que utilizan la enzima metano monooxigenasa (MMO) para catalizar la oxidación de metano en metanol. La MMO se presenta en dos formas, unida a la membrana o particulada (pMMO) y una forma soluble (sMMO). Las bacterias metanotróficas habitan una amplia gama de hábitats donde tanto el metano como el oxígeno están disponibles (Kalyuzhnaya & Xing, 2018).

Estas bacterias inicialmente se clasificaron en tres grupos: Tipo I, Tipo II y Tipo X (Hanson & Hanson, 1996), sin embargo, el descubrimiento de nuevas especies a través de la combinación de análisis bioquímicos y moleculares ha demostrado que estas generalizaciones no son universales.

En la actualidad, la capacidad metanotrófica que depende de la actividad de las MMO reconoce a los filos bacterianos Proteobacteria, Verrucomicrobia y la división candidata NC10 (Stein et al., 2012). Casi todas las bacterias metanotróficas descritas y que están disponibles en cultivos puros pertenecen al filo Proteobacteria. Estos microorganismos se encuentran dentro de las clases Gammaproteobacteria (metanótrofos de Tipo I) y Alphaproteobacteria (metanótrofos de Tipo II). Los metanótrofos verrucomicrobiales fueron descubiertos a partir del año 2007 (Op den Camp et al., 2009) y están representados por un número limitado de aislamientos.

A pesar de la diversidad de metanótrofos y la amplia gama de ambientes en los que se pueden encontrar, la ruta general por la cual estos microorganismos oxidan CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> es notablemente similar. La oxidación aeróbica de CH<sub>4</sub> tiene la reacción neta:  $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\Delta G^\circ = -773$  KJ por mol de CH<sub>4</sub>) teniendo como intermediarios al metanol (CH<sub>3</sub>OH), formaldehído (CH<sub>2</sub>O) y formiato (CHOOH) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Descripción general del metabolismo metanotrófico y los metanótrofos involucrados. Los ciclos clave están en círculos azules. Las abreviaturas de las rutas metabólicas están en rectángulos. H<sub>4</sub>F: ruta de tetrahidrofolato; H<sub>4</sub>MPT: ruta de tetrahidrometanopterin. Las enzimas clave en color azul: pMMO: metano monooxigenasa particulada; sMMO: metano monooxigenasa soluble; MeDH: metanol deshidrogenasa; Hps: hexosa 6-fosfato sintasa, Fdh:formiato deshidrogenasa; RuBisCO: ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, SHMT: serina hidroximetiltransferasa (Kalyuzhnaya et al., 2015).

Los metanótrofos juegan un papel importante en el ciclo global del carbono, nitrógeno y oxígeno, así como en la degradación de compuestos orgánicos peligrosos, por ejemplo, los hidrocarburos halogenados como el tricloroetileno, triclorobenceno y cloruro de vinilo (Jiang et al., 2010). Los metanótrofos más conocidos crecen mejor a pH y temperaturas moderadas (pH entre 5 y 8, temperaturas entre los 20 y 35 °C), pero también se han aislado metanótrofos psicrófilos (crecimiento <15 °C), termófilos (crecimiento >40 °C), alcalófilos (crecimiento a pH >9.0) y acidófilos (crecimiento a pH <5) (Semrau et al., 2010).

Aunque los metanótrofos han sido estudiados durante décadas, todavía existen vacíos importantes en el conocimiento fundamental de este importante grupo microbiano. Actualmente existe la necesidad de desarrollar estudios que evalúen el efecto de los factores

ambientales en las características y rendimiento de las comunidades metanotróficas. La concentración de CH<sub>4</sub>, la concentración de O<sub>2</sub> y la concentración de Cu<sup>2+</sup> han sido identificados como algunos de los principales parámetros que influyen en la oxidación microbiana de CH<sub>4</sub>, debido a su papel clave en la naturaleza y nivel de expresión de las MMO (Cantera et al., 2016).

En la última década se ha presentado un resurgimiento en el interés por estudiar a este grupo bacteriano debido a la posibilidad de su aplicación en la mitigación de emisiones de CH<sub>4</sub> a la atmósfera, también por la abundancia y bajo costo del gas natural y consecuentemente, su potencial para crear productos de valor agregado (Kalyuzhnaya et al., 2015). Los metanótrofos son una fuente viable de diversos bioproductos, especialmente proteína microbiana (suplemento alimenticio) y también son capaces de acumular osmolitos (ectoína, sacarosa), fosfolípidos (precursores de biocombustibles) y biopolímeros (polihidroxibutirato, glucógeno, etc.). Otros componentes celulares, como capas superficiales, proteínas quelantes metálicas (metanobactina), enzimas (metano monooxigenasas) o proteínas heterólogas, son productos prometedores para explotarse en el futuro (Strong et al., 2016).

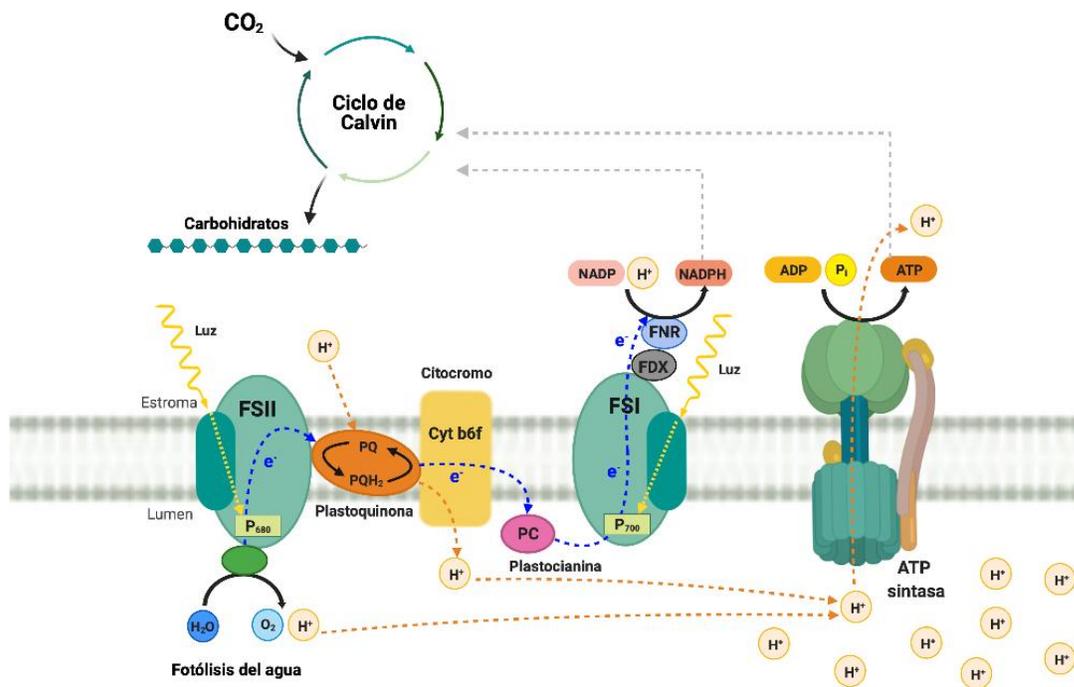
## **Microalgas**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos responsables del 50% de la fijación del CO<sub>2</sub> atmosférico (Skianes et al., 2008). Hace 3.5 billones de años transformaron la atmósfera de la Tierra generando oxígeno a través de la fotosíntesis oxigénica. La fotosíntesis proporciona, directa o indirectamente, el suministro de energía y la entrada de carbono a todas las formas de vida en la Tierra para su metabolismo y crecimiento. Las microalgas se encuentran tanto en ambientes marinos como en agua dulce; su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas terrestres, pero son más eficientes en la conversión de la energía solar en biomasa, debido a su estructura celular simple y sumergida en un medio acuoso con acceso al agua, CO<sub>2</sub> y otros nutrientes (Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

Estos organismos constituyen un grupo polifilético altamente diverso de organismos procariotas y eucariotas. Su clasificación se basa en diversas propiedades como la pigmentación, la naturaleza química del producto de almacenamiento fotosintético, la organización de las membranas fotosintéticas y otras características morfológicas. Las

divisiones en las cuales se clasifica a las microalgas son: Cyanobacteria, Chlorophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Prymnesiophyta y Heterokontophyta (Andersen, 2013).

Las microalgas realizan fotosíntesis oxigénica y fijan  $\text{CO}_2$  a través del ciclo de Calvin obteniendo la energía necesaria en la síntesis de carbohidratos (Figura 1.5). Sin embargo, existen microalgas que además pueden utilizar sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía. La fotosíntesis oxigénica se puede dividir en dos subprocesos: las reacciones de luz, que comprenden todos los pasos necesarios para proporcionar energía (ATP) y equivalentes reductores (NADPH), y las reacciones oscuras, donde los organismos fotosintéticos consumen ATP y NADPH para transformar el carbono inorgánico en carbohidratos a través del ciclo de Calvin-Benson (Wobbe & Remacle, 2014).



**Figura 1.5.** Reacciones luminosas y de asimilación de carbono en la fotosíntesis (creado con biorender.com).

Las microalgas usan  $\text{CO}_2$  para sintetizar, acumular o secretar una amplia gama de metabolitos primarios y secundarios, con aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria, farmacéutica, ambiental y cosmética (Morales et al., 2015). También, ellas son una fuente

rica de numerosas moléculas bioactivas para la industria de cosméticos y de interés nutricional como forraje o en alimentación y salud humana. De igual manera, son de interés para la obtención de biomoléculas como pigmentos y ácidos grasos poliinsaturados, la producción de biocombustibles y la captura biológica de CO<sub>2</sub> (Rendón Castrillón et al., 2015).

#### **1.1.4. Co-cultivos: sinergia entre bacterias y microalgas**

En la naturaleza, las poblaciones microbianas mixtas establecen múltiples interacciones: positivas, neutras o negativas, logrando equilibrios dinámicos, con algunas ventajas en comparación con los monocultivos, como una mayor variedad de genes y capacidades metabólicas. Esta diversidad permite el surgimiento de propiedades colectivas como la robustez y la distribución de funciones (Hays et al., 2015). Los cultivos mixtos o co-cultivos son aquellos en los que el inóculo consiste en dos o más organismos y se usan ampliamente en muchos procesos, incluyendo la producción de antibióticos, enzimas, varios tipos de alimentos fermentados, compostaje, fermentación láctica, producción de proteína microbiana, lodo de aguas residuales domésticas e industriales, etc. (Asmamaw & Fassil, 2014). En este tipo de cultivos, las limitaciones nutricionales se pueden superar con interacciones sinérgicas entre socios compatibles. La relación sinérgica se produce como resultado de la acción secuencial y cooperativa entre los componentes de las enzimas, donde el producto de una reacción enzimática se convierte en el sustrato del otro (Asmamaw & Fassil, 2014).

La compatibilidad entre las cepas es el factor determinante para el éxito de un cultivo mixto o co-cultivo. Por lo tanto, la optimización de cultivos mixtos con organismos compatibles que tengan un comportamiento no antagónico debe estudiarse antes de que se empleen para un fin determinado. La compatibilidad de las cepas se basa en varios factores. Por ejemplo, cuando un pH específico es favorable para un organismo, en co-cultivo puede no ser adecuado para los otros. Lo mismo podría ser cierto para la temperatura, las concentraciones de los nutrientes, salinidad, entre otras variables ambientales. De ahí la importancia de estudiar la compatibilidad de las cepas antes de que los co-cultivos se utilicen para la generación de biomasa u otros productos. Una de las principales aplicaciones de co-cultivos o cultivos mixtos es para resolver problemas ambientales de forma integral valorizando los productos generados a partir de corrientes residuales contaminantes.

Los co-cultivos microbianos se han explorado en diversas aplicaciones con efectos positivos, como biomasa mejorada, potencial biocatalítico, alta estabilidad, etc. (Singh et al., 2019). El co-cultivo de metanótrofos con otros microorganismos (no fotosintéticos) para lograr un objetivo común o para optimizar un proceso ha sido previamente explorado (Iguchi et al.,

2011; Singh et al., 2019; Stock et al., 2013). Recientemente, se han desarrollado estrategias para mejorar la producción de metanol a partir de biogás utilizando co-cultivos de diferentes cepas metanotróficas, (Patel et al., 2020, 2018). También se ha combinado un metanótrofo y un metilótrofo para obtener un sistema eficiente y estable para la oxidación de metano (Jeong & Kim, 2019). Adicionalmente se han usado metanótrofos y bacterias oxidantes de amoníaco para la reducción de CH<sub>4</sub> y amoníaco en vertederos de desechos sólidos municipales (Pan et al., 2019). En la asociación metanótrofo- no-metanótrofo, los organismos no-metanótrofos proporcionan factores nutricionales clave y amortiguan la toxicidad de los subproductos metabólicos como los ácidos orgánicos que se pueden producir en condiciones de limitación de oxígeno (Kalyuzhnaya et al., 2013; Singh et al., 2019).

En cuanto a los co-cultivos de bacterias y microorganismos fotosintéticos, la mayoría de los estudios son principalmente para el tratamiento de aguas residuales, el enriquecimiento de biogás y la reducción de emisiones de GEI en efluentes líquidos de plantas de tratamiento de aguas residuales anaeróbicas (Rashid et al., 2018; Shahid et al., 2020; Toledo-Cervantes et al., 2017; Zhang et al., 2020). En la naturaleza, las relaciones sinérgicas entre estos dos grupos son comunes: mientras que las bacterias proporcionan la fuente de carbono oxidado para las microalgas, el oxígeno (O<sub>2</sub>) es producido por las especies fotosintéticamente activas (Ho et al., 2014; Zhang et al., 2020). En este sentido, el co-cultivo de bacterias metanotróficas con microalgas puede considerarse un enfoque prometedor para la conversión simultánea de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en biomasa, con potencial para la obtención de distintos bioproductos, mediante el acoplamiento de la oxidación de metano y la fotosíntesis oxigénica.

En condiciones controladas, se han utilizado metanótrofos y microalgas en co-cultivo para la recuperación de nutrientes de aguas residuales y biogás, producción de biomasa, producción de metabolitos de interés, etc. La Tabla 1.3 muestra una revisión de los trabajos de co-cultivo de bacterias metanótroficas y microalgas, indicando el objetivo principal de cada estudio y los principales parámetros de operación. En la tabla se muestran menos de 10 trabajos publicados desde el año 2011, lo cual señala que los reportes de co-cultivo de comunidades de bacterias oxidantes de metano y microalgas todavía son escasos; donde la mayoría se ha centrado principalmente en la prueba de concepto.

Van Der Ha et al. (2011) estudiaron un co-cultivo no axénico de bacterias metanotróficas y microalgas para la oxidación de CH<sub>4</sub> (corriente formulada de biogás) limitando el suministro externo de O<sub>2</sub>, mientras variaban la fuente de nitrógeno (N). Más tarde, Van Der Ha et al. (2012) evaluaron el consumo de una corriente formulada de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> por la microalga *Scenedesmus* sp. y la bacteria metanotrófica *Methylocystis parvus* en reactores secuenciales, y posteriormente probaron una tercera configuración donde ambos microorganismos se cultivaron en un solo reactor. Hill et al. (2017) evaluaron el co-cultivo de *Synechococcus* 7002 y *M. alcaliphilum* 20z utilizando biogás de un digestor anaerobio de residuos lácteos, obteniendo un crecimiento robusto. Además, la biomasa producida mediante el co-cultivo de estos grupos microbianos podría tener muchas aplicaciones, ya que se han reportado metanótrofos y microalgas para la producción de una amplia gama de metabolitos de interés comercial (Martínez-Macías et al., 2018; Strong et al., 2016).

El enfoque de los co-cultivos entre metanotrófos y microalgas para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> todavía requiere esfuerzos importantes de investigación para establecer y optimizar las principales condiciones de cultivo. Los resultados que se han obtenido a la fecha son prometedores, sin embargo, el estudio todavía es limitado y aún existen retos en el diseño adecuado de los reactores y condiciones operativas para aprovechar la sinergia de ambos grupos microbianos.

**Tabla 1.3.** Revisión bibliográfica de estudios del co-cultivo de metanótrofos y microalgas.

Microorganismos		Objetivo del estudio	Condiciones de operación							Referencia
Microalga	Bacteria		Configuración de reactor	Operación	Medio	T	pH	Luz	Composición del gas	
Consorcio	Consorcio	Uso de un co-cultivo para la oxidación de GEI sin la adición externa de O <sub>2</sub> y evaluar la fuente de nitrógeno	Botellas de 1.15 L	Ciclos de 72-90 horas	Medio mineral	22±2 °C	6.9	80 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	20% CH <sub>4</sub> en aire	Van der Ha et al., 2011
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Methylocystis parvus</i>	Convertir biogás sintético en biomasa de valor a través de cultivos limitados en la fuente de nitrógeno	Monocultivos de 0.2 L para <i>Scenedesmus</i> y metanótrofa/ 0.41 L para prueba de lípidos/Reactor tanque agitado de 3 L (1.15 L de operación)	Para lípidos 3 ciclos de 120 h	Medio mineral	20-22 °C	6.8	75-90 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	0, 10, 20, 40 y 60 de CO <sub>2</sub> /y 60% CH <sub>4</sub> y 40% de CO <sub>2</sub> para producción de lípidos//60% CH <sub>4</sub> en aire para metanótrofas/Biogás sintético de 60-40 para reactor	Van der Ha et al., 2012
<i>Synechococcus</i> sp.	<i>Methylomicrobium alcaliphilum</i>	Una nueva forma de co-cultivo para la conversión de metano y CO <sub>2</sub> en biomasa (cianobacteria y metanótrofa)	Tubos Balch (30 mL con 8 mL de cultivo) Tanque agitado de 5.5 L de V de operación	Continuo (96 h)	APLUS (mineral)	30°C	8	250 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	80% CH <sub>4</sub> y 3% CO <sub>2</sub> en N <sub>2</sub>	Hill et al., 2017

<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Uso de un consorcio microalga-bacteria para la remoción de nutrientes del agua residual y la recuperación de proteína unicelular	Botellas de 0.6 L y un volumen adicional de <i>headspace</i> de 1 L	Batch (20 h)	Agua residual industrial	37°C	7	2700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Monocultivo de alga y co-cultivo 60 CH <sub>4</sub> -40% CO <sub>2</sub> /monocultivo metanótrofa 60-30 y 10 (CH <sub>4</sub> , O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> )	Rasouli et al., 2018
<i>Arthrospira platensis</i>	<i>Methylomicrobium buryatense</i>	Desarrollar un modelo cinético para seguir con precisión el crecimiento de cada cepa individual en diferentes mezclas de co-cultivo bajo diversas condiciones de crecimiento	Botellas serológicas de 250 mL con 100 mL de MM	Batch (96 h)	Medio mineral	-	-	Ciclos luz:oscuridad De 6:8 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	70% CH <sub>4</sub> 30% CO <sub>2</sub>	Badr et al., 2019
<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	Uso de una plataforma de co-cultivo para el tratamiento de efluentes de digestión anaerobia y conversión de biogás, que convierte tanto el CH <sub>4</sub> como el CO <sub>2</sub> contenidos en el biogás en biomasa microbiana	Botellas serológicas de 250 mL	Batch (72 h)	Digestato diluido y efluente de clarificador secundario (CLE). Estéril Medio AMS	37°C	-	200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Biogás sintético (70% CH <sub>4</sub> , 30% CO <sub>2</sub> )	Roberts et al., 2020

Consortio de microalgas y cianobacterias	Metanótrofos enriquecidos de lodos activos	<p>Demostrar la eliminación de bajas concentraciones de metano utilizando una comunidad metanotrófica arreglada en fotogranulos oxigénicos.</p>	Fotobiorreactor de vidrio sellado (1.8 L)	Continuo (105 días)	Medio mineral NMS	23±2 °C	7.0±0.2	45 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	CH <sub>4</sub> , biogénico purificado. 35.1 ± 4.5 mg <sub>CH<sub>4</sub></sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> .	Safitri et al., 2021
<i>Scenedesmus obliquus</i>	<i>Methylocystis bryophila</i>	<p>Verificar el crecimiento mixotrófico de microalgas en co-cultivo. Explorar el efecto de los metanótrofos en el crecimiento de microalgas, la fotosíntesis y la acumulación de lípidos. Explorar el desempeño del co-cultivo bajo diferentes intensidades de luz.</p>	Botellas serológicas (600 mL)	Batch (200 h)	Medio mineral	25±2 °C	6.2	30-130 μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Mezcla de gas sintético 20% CH <sub>4</sub> + 80% N <sub>2</sub>	Li et al., 2022

## 1.2. ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

### *Metanótrofos*

Dentro de nuestro grupo de investigación se ha explorado el uso de metanótrofos para la mitigación de corrientes que contienen CH<sub>4</sub>. Por ejemplo, Rocha-Rios et al. (2009), (2010), (2011) estudiaron la biodegradación de metano por un consorcio metanotrófico enriquecido a partir de lodos activos de una PTAR. En esos estudios se probaron diferentes configuraciones de reactores, modos de operación y también estudiaron el efecto de la adición de aceite de silicona para mejorar la transferencia de los gases. Posteriormente, Zúñiga et al. (2011) y Zúñiga et al. (2013), estudiaron la biodegradación de CH<sub>4</sub> y producción de PHB por una cepa axénica, *Methylobacterium organophilum*, en diferentes configuraciones de reactor. Más tarde, García-Pérez et al. (2018) estudiaron el abatimiento de metano acoplado a la producción de PHB por la cepa *Methylocystis hirsuta* en un reactor de columna de burbujeo con recirculación. Finalmente, Saldivar-García (2021) utilizó un método de selección artificial en dos etapas, combinado con un método de inferencia mediante análisis metabólico, para identificar posibles microorganismos que forman interacciones metabólicas beneficiosas en un consorcio metanotrófico (CIR\_19). En la Tabla 1.4 se enlistan las principales condiciones y parámetros para cada estudio y las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> obtenidas.

En estos estudios se ha demostrado que, mediante el uso de reactores como los reactores de tanque agitado, es posible el consumo exitoso y eficiente de CH<sub>4</sub>, con la producción simultánea de bioproductos como el PHB. Sin embargo, las cepas y consorcios utilizados en estos sistemas han sido cultivados en su mayoría a pH neutro, donde el CO<sub>2</sub> generado por los metanótrofos sigue siendo liberado del sistema en la fase gaseosa. En este sentido, con la experiencia previa en el cultivo de metanotrófos a partir de muestras ambientales, el enriquecimiento de cultivos en condiciones de alcalinidad podría favorecer la retención del CO<sub>2</sub> en forma de carbonatos evitando ser liberado, lo cual no se ha explorado previamente dentro del grupo de investigación.

### ***Microalgas: Scenedesmus obtusiusculus***

Nuestro grupo de investigación de Bioprocesos con Microalgas también tiene amplia experiencia caracterizando microorganismos fotosintéticos. Por ejemplo, se aisló, caracterizó e identificó a la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* para la acumulación de lípidos en condiciones de limitación de nitrógeno (Toledo-Cervantes et al., 2013; Toledo-Cervantes et al., 2018; Sánchez-García et al., 2020). Además, se probó su crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno, reportando que crece mejor cuando se cultiva con nitrato, seguido de urea. Las condiciones de irradiancia y temperatura con mayor actividad fotosintética en cultivos en crecimiento y limitados por nitrógeno de *S. obtusiusculus* fueron reportados por Cabello et al. (2015), estableciendo como condiciones óptimas de crecimiento una temperatura de 35 °C, irradiancia de 320  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , valores óptimos de actividad fotosintética a pH entre 7.5 y 8, alcanzando una concentración de biomasa de máxima de 3.7  $\text{g L}^{-1}$  y tasa máxima específica de crecimiento de 1.27  $\text{d}^{-1}$ . También se ha investigado su uso para la captura de  $\text{CO}_2$  proveniente de gases de combustión (Estrada-Graf et al., 2020). De igual manera, hay reportes para su crecimiento en condiciones controladas y a la intemperie (Sánchez 2013; Sánchez-García et al., 2020). Por último, Gorry et al. (2021) demostraron que, a través de ciclos de suministro y ausencia de nitrógeno bajo operación en semicontinuo, se puede mantener la productividad de lípidos de esta cepa, sin requerir un sistema de dos etapas: crecimiento y limitación de nitrógeno.

Estos precedentes han confirmado que *S. obtusiusculus* es robusta y versátil, manteniendo su actividad fotosintética en un amplio rango de condiciones. Es capaz de consumir altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  y acumular una importante cantidad de lípidos cuando se le limita en nitrógeno. Sin embargo, todavía no se ha estudiado su compatibilidad y actividad cuando se cultiva con otros microorganismos. Si bien, las investigaciones previas reportaron que la condición óptima de pH de esta microalga es a pH neutro, no disminuye completamente su actividad a pH alcalino (9-10). Por esta razón, se seleccionó para evaluar su crecimiento en conjunto con bacterias metanotróficas alcalófilas, estudiar su compatibilidad y establecer las principales condiciones de cultivo para el consumo global de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .

**Tabla 1.4.** Resumen de los trabajos del uso de metanótrofos del grupo para el tratamiento de corrientes que contienen CH<sub>4</sub>.

Estudio	Microorganismo	Reactor	Modo de operación	Carga o concentración inicial de CH <sub>4</sub>	Biomasa inicial	Tasa de biodegradación de CH <sub>4</sub> o CE	Y X/CH <sub>4</sub>	Y O <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	Y CO <sub>2</sub> / CH <sub>4</sub>
<b>Rocha-Rios et al., 2009</b>	Consortio metanotrófico enriquecido de lodos activados	STR de 3.5 L, 2 L de operación con 10% v v <sup>-1</sup> de aceite de silicona	Continuo	200 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> (concentración promedio de CH <sub>4</sub> de 15.9 g m <sup>-3</sup> )	0.005 x10 <sup>-6</sup> g m <sup>-3</sup>	CE 106 ± 7 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	1.04 ± 0.02 gCO <sub>2</sub> gCH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>
	Consortio metanotrófico enriquecido de lodos activados	Reactor de lecho percolador con 10% v v <sup>-1</sup> de aceite de silicona	Continuo	140 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> (concentración promedio de CH <sub>4</sub> de 11.1 g m <sup>-3</sup> )	0.005 x10 <sup>-6</sup> g m <sup>-3</sup>	CE 51 ± 7 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	1.35 ± 0.01 gCO <sub>2</sub> gCH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>
<b>Rocha-Rios et al., 2010</b>	Consortio metanotrófico enriquecido de lodos activados	Botellas de vidrio estériles de 1.25 L	Lote	50 g m <sup>-3</sup> (7.2% v v <sup>-1</sup> )	0.0048 g L <sup>-1</sup>	0.0676 gCH <sub>4</sub> gbiomasa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.49 ± 0.02 gbiomasa gCH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	3.35 ± 0.01 gO <sub>2</sub> gCH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	-
	Consortio metanotrófico enriquecido de lodos activados	Reactor <i>airlift</i> con bucle interno	Continuo	171 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	3 g L <sup>-1</sup> Estado estacionario	19–22 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-
<b>Zúñiga et al., 2011</b>	<i>M. organophilum</i> CZ-2	Botellas serológicas de 125 mL	Lote	1% de CH <sub>4</sub>	80 g m <sup>-3</sup>	0.06 ± 1.7 g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-
	<i>M. thrichosporium</i> OB3b	Botellas serológicas de 125 mL	Lote	1% de CH <sub>4</sub>	80 g m <sup>-3</sup>	0.078 ± 3.9 g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-

	Consortio metanotrófico enriquecido de lodos activados	STR Bioflo III	Continuo	80 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	1270 g m <sup>-3</sup>	0.017 g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-
	<i>M. organophilum</i> CZ-2	STR Ez-control	Continuo	80 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	1270 g m <sup>-3</sup>	0.1 g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>			
<b>Zúñiga et al., 2013</b>	<i>M. organophilum</i> CZ-2	Botellas serológicas de 125 mL	Lote	87.2	80 g m <sup>-3</sup>	26.16 g m <sup>-3</sup>	0.19	-	0.80
	<i>M. organophilum</i> CZ-2	STR Ez-control	Continuo	42 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	80 g m <sup>-3</sup>	0.1 g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-
<b>García-Pérez et al., 2018</b>	<i>Methylocystis hirsuta</i>	Columna de burbujeo de PVC	Continuo	4% v v <sup>-1</sup> 0.194 ± 4 g L <sup>-1</sup>	Inicial 0.152 g L <sup>-1</sup> Estado estacionario 4.4 ± 0.6 gTSS L <sup>-1</sup>	EC 35.2 ± 0.4 g m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-
<b>Saldívar-García, 2021</b>	Consortio CIR_19	Botellas serológicas de 125 mL	Lote	10% v v <sup>-1</sup>	-	0.0923 gCH <sub>4</sub> gbiomasa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	-	-	-

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de estrategias para reducir las emisiones de GEI, incluidas las biotecnologías, ha ganado mucha atención en los últimos años, no solo por la reducción de emisiones, sino también por las ventajas que ofrecen estos enfoques, como la generación de bioproductos. Un aspecto primordial de las biotecnologías es la utilización de sustratos que representen bajos costos de operación y que, bajo los criterios de sustentabilidad, los procesos no perjudiquen o su impacto al medio ambiente sea mínimo. El enfoque holístico para la recuperación de recursos a partir de desechos es fundamental para una economía circular. De esta manera, la valorización de los gases de efecto invernadero, como el metano y el dióxido de carbono, se presenta como una alternativa atractiva y una herramienta eficiente desde el punto de vista económico y ambiental, por tratarse de sustratos de bajo costo y fácil obtención para la producción de una amplia gama de metabolitos valiosos. Actualmente, el CH<sub>4</sub> o biogás que se genera principalmente en procesos de digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales, se utiliza para la producción de electricidad o se convierte en biometano. Sin embargo, en muchos de estos procesos se generan emisiones fugitivas de CH<sub>4</sub> (y de CO<sub>2</sub>), donde las concentraciones de CH<sub>4</sub> son muy bajas y no puede utilizarse para la recuperación de energía, ni quemarse, pero representan una importante contribución al calentamiento global. En procesos como éstos, se requiere de la implementación de tecnologías alternativas para disminuir los efectos negativos asociados a estas emisiones fugitivas.

El uso combinado de bacterias metanotróficas con microalgas representa una alternativa prometedora que permite la conversión simultánea de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en biomasa valiosa, es decir, biomasa de la cual se pueden obtener bioproductos como proteína microbiana, biopolímeros, biocombustibles, pigmentos, osmolitos, etc. dentro de un solo sistema de cultivo, mediante el acoplamiento metabólico entre la fotosíntesis oxigénica y la oxidación de metano. En este contexto, son pocos los estudios existentes, que, en su mayoría, se han centrado en la compatibilidad de cepas en volúmenes pequeños (menores a 200 mL), con escasa información de la evolución de los cultivos y su implementación en reactores. Todavía se requieren estudios para determinar las principales condiciones de operación y de cultivo para obtener sistemas eficientes, robustos y estables, en donde las emisiones de carbono sean nulas o cercanas a cero.

Una opción para maximizar la captura de carbono en estos sistemas es el uso de condiciones alcalinas, donde un alto pH propiciaría la retención del carbono (CO<sub>2</sub>) en el medio en la forma de carbonatos. Para ello, la búsqueda y enriquecimiento de metanótrofos que puedan crecer y consumir CH<sub>4</sub> eficientemente en estas condiciones es fundamental. Por otra parte, la elección de microalgas que también puedan coexistir en estas condiciones y cuya actividad no se vea afectada por las mismas es de suma importancia. Ante esto, en este estudio se enriqueció y utilizó un consorcio metanotrófico alcalófilo que crece a un pH por encima de 9, en combinación con la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*. Estudios previos dentro del grupo han reportado que las mejores condiciones para *S. obtusiusculus* se encuentran cercanas al pH neutro, sin embargo, su actividad y crecimiento no se ve inhibida cuando el pH es más alto (9-10). Se eligió esta microalga por haber sido previamente caracterizada en cuanto a crecimiento y actividad fotosintética, y porque tiene la capacidad de acumular sustancias de reserva como lípidos y carbohidratos. Además, esta microalga crece como células libres, lo cual facilitaría su seguimiento individual dentro del co-cultivo y el mantenimiento de las células en suspensión, además de permitir una mejor distribución de la luz.

Una vez encontradas las principales condiciones que favorecen al co-cultivo, las alternativas para su evaluación en un biorreactor son diversas. Factores como la transferencia de masa, destino de la biomasa resultante y su recuperación, escalabilidad, limpieza, facilidad y modo de operación, etc. deben tomarse en cuenta para elegir la mejor configuración. La combinación de consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* no ha sido estudiado en conjunto previamente, y por ello se eligió una configuración de biorreactor bien estudiada, un reactor de tanque agitado, por ser un reactor que permitirá reproducibilidad y control adecuados para la recopilación de los datos de operación más importantes y la obtención/recuperación de biomasa de una manera sencilla.

## **1.4. HIPÓTESIS**

El co-cultivo de bacterias metanótrofas alcalófilas y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en condiciones alcalinas permitirá maximizar la captura de gases de efecto invernadero.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. OBJETIVO GENERAL**

Implementar y evaluar un sistema de co-cultivo de bacterias metanótrofas alcalófilas y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, incrementando la producción de biomasa.

### **1.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar y determinar las principales condiciones de cultivo en microcosmos para un co-cultivo metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*.
2. Desarrollar y evaluar un co-cultivo metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor de tanque agitado operado en lote y lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

## 1.6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Para alcanzar los objetivos de este trabajo se siguió la estrategia general que se presenta en la Figura 1.6. En el Capítulo 2 se presentan las metas para abordar el Objetivo específico 1 y que corresponden a los ensayos en microcosmos. De igual manera, en el Capítulo 3 se indican las metas para cumplir el Objetivo específico 2, donde se incluyen los ensayos en fotobiorreactor de tanque agitado.

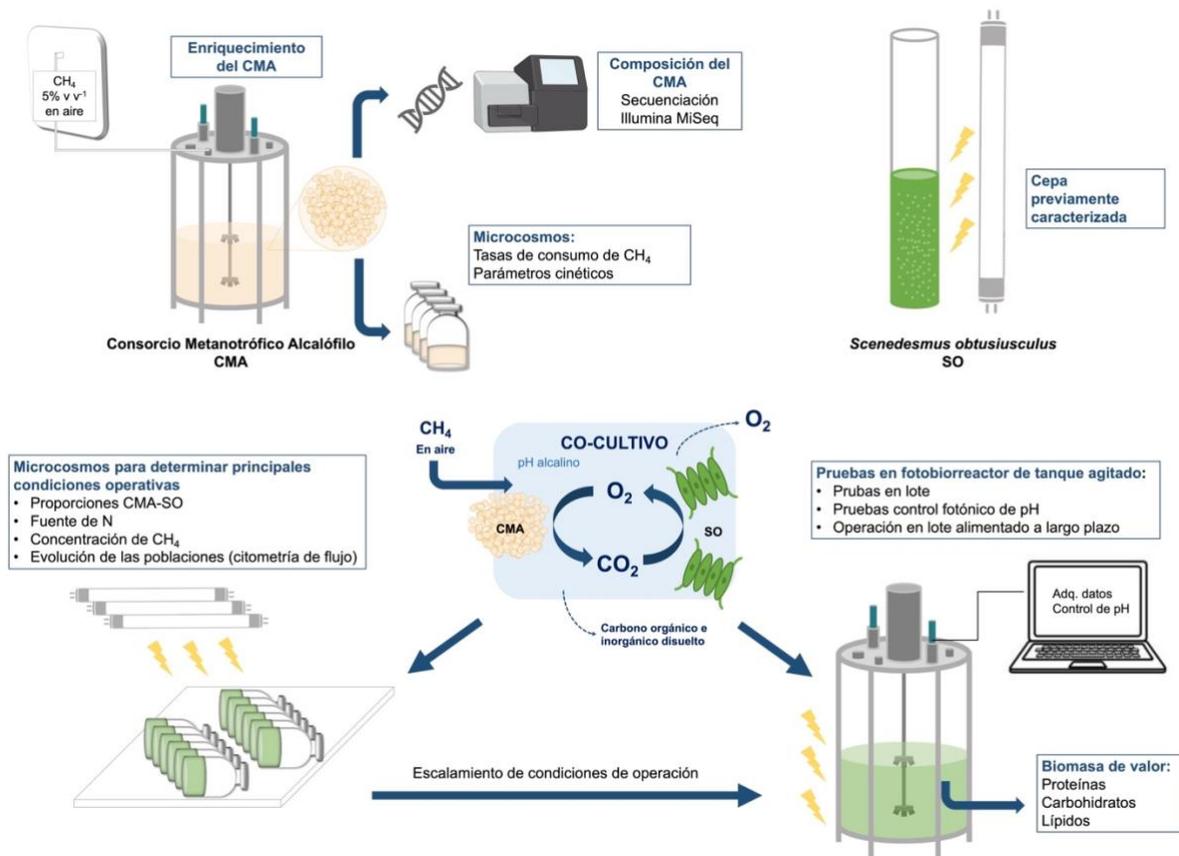


Figura 1.6. Estrategia experimental general de este estudio.

## **CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE DIFERENTES CONDICIONES DE CO-CULTIVO EN MICROCOSMOS**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Uno de los aspectos más importantes en un co-cultivo es la proporción de inóculo para cada cepa, ya que ésta afectará el resultado final y la estructura general en la evolución del cultivo mixto. Se deben considerar diferentes factores, por ejemplo, la tasa de crecimiento de cada cepa, ya que no es deseable un crecimiento excesivo o cualquier competencia negativa entre los microorganismos asociados, la fase de crecimiento y el momento en que se agregan los inóculos al cultivo binario. Este fenómeno ha sido expresado como efecto de prioridad y es considerado como uno de los factores decisivos en un sistema (Ray et al., 2022).

Por otra parte, los medios de cultivo para las cepas que conforman el co-cultivo deben proveer de los nutrientes esenciales, con el fin de no generar competencia por sustratos y que, además, no resulten tóxicos o inhibitorios. La fuente de nitrógeno es una de las consideraciones más importantes en este sentido. Los metanótrofos utilizan diferentes fuentes de nitrógeno, incluidas nitrato, urea o sales de amonio, mientras que solo unos pocos pueden fijar  $N_2$ . Los mecanismos celulares de sensibilidad o resistencia de las cepas al amonio o al nitrato no están bien caracterizados y deben ser probados empíricamente. Las variaciones de cepa a cepa son sustanciales y probablemente influyan en el rendimiento de los cultivos (Stein, 2018). Varias revisiones describen las rutas de metabolismo y asimilación de las fuentes primarias de nitrógeno para sustentar el crecimiento de las bacterias metanótrofas (Bowman 2006; Kelly et al., 2014; Webb et al., 2014). Al igual que con las bacterias metanotróficas, el crecimiento de las microalgas también depende de la fuente de nitrógeno (Mandal et al., 2018). Comúnmente se utiliza amonio, urea y nitrato como fuente de nitrógeno para el cultivo de microalgas, prefiriendo amonio y urea por su bajo costo (Toledo-Cervantes, 2013). La selección apropiada de la fuente de nitrógeno para cada microalga es importante, ya que tiene impacto en la productividad de biomasa. En consecuencia, es necesario seleccionar una fuente de nitrógeno apropiada para mantener una sintropía activa en el co-cultivo metanotrófico y autótrofo.

El enfoque de co-cultivo metanotrófico-microalgal para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> aún requiere de esfuerzos de investigación para establecer y optimizar las condiciones de cultivo. Aspectos como la proporción inicial de inóculo, la concentración de los gases, el pH, la fuente de nitrógeno y la selección del par metanótrofo-microalga, así como su evolución dentro del sistema, tendrán un impacto en desempeño general para la mitigación de carbono, tanto para CH<sub>4</sub> como para CO<sub>2</sub>. En este capítulo se evaluaron algunas condiciones iniciales de co-cultivo, con el fin de establecer las más adecuadas para el crecimiento en conjunto de un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*.

## 2.2. METAS

- Evaluar el efecto de la proporción inicial de biomasa y la concentración inicial de CH<sub>4</sub> en un co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* sobre las tasas de biodegradación específica de CH<sub>4</sub>, los balances de carbono y la evolución de las poblaciones.
- Caracterizar molecularmente la composición del consorcio metanotrófico alcalófilo.
- Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y la concentración inicial de CH<sub>4</sub> en un co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* sobre las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub>.

## 2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1. Microorganismos y medios de cultivo

El consorcio metanotrófico alcalófilo (CMA) se enriqueció a partir de muestras de suelo del ex Lago de Texcoco (Ciudad de México) en un reactor de tanque agitado de 3-L con chaqueta de calentamiento (Figura 2.1), con un volumen de operación de 1.5-1.7-L alimentado con 5% de CH<sub>4</sub> en aire (v v<sup>-1</sup>) y temperatura controlada a 28 ± 1 °C. El medio de cultivo utilizado fue medio de sales minerales (MSM) cuya composición fue (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub>, 2.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.09; KCl, 0.04; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.015. El medio MSM incluye los siguientes elementos traza (mg L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.5; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 35; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8.5; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5; CoCl<sub>2</sub>, 50. El pH se controló entre 9.0 y 9.5 con una solución de NaOH 0.5 M.



**Figura 2.1.** Reactor de tanque agitado para el enriquecimiento del CMA.

La microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (SO), previamente aislada de los humedales de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Toledo-Cervantes et al., 2013) se cultivó y mantuvo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio BG-11 modificado (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.075; EDTA de magnesio disódico, 0.001; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.036; ácido cítrico, 0.006; citrato de amonio férrico, 0.006; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02 y los siguientes elementos traza (mg

L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.222; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.39; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.079; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.494; pH 7.5. Para propagar la biomasa microalgal, *S. obtusiusculus* se cultivó en una columna de burbujeo de 5-L con un volumen de cultivo de 1.5-2 L (Figura 2.2) y una irradiancia promedio de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. La biomasa se cosechó en etapa de crecimiento exponencial antes de cada experimento (~0.8 g L<sup>-1</sup>) para usarse como inóculo en los microcosmos y en el reactor de tanque agitado.



**Figura 2.2.** Columna de burbujeo utilizada para la propagación de *S. obtusiusculus*.

### **2.3.2. Ensayos en microcosmos: Proporción inicial de biomasa y concentración de CH<sub>4</sub>**

Estos ensayos se realizaron con el fin de observar el efecto de la proporción inicial de biomasa y la concentración de CH<sub>4</sub> sobre las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> en co-cultivos CMA-SO. Los experimentos se realizaron en botellas serológicas transparentes de 125 mL con 25 mL de co-cultivo CMA-SO en medio MSM:BG-11 estéril con NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. El pH inicial se ajustó a 9.15 y el volumen de espacio de cabeza fueron 100 mL.

En una primera serie de experimentos, denominados CMA1, se probaron tres proporciones iniciales de biomasa CMA-SO diferentes (p p<sup>-1</sup>): 1:1, 1:3 y 3:1 (con MSM:BG-11 a la misma proporción que cada experimento), llevando el contenido de biomasa total inicial a 1 g L<sup>-1</sup> y

se utilizaron dos concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza, 4% y 8% (v v<sup>-1</sup>) (Tabla 2.1).

Las botellas serológicas se sellaron con septos de butilo y aros de aluminio en condiciones de esterilidad. Las concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza se ajustaron utilizando una jeringa de 20 mL para inyectar un volumen dado de CH<sub>4</sub> puro (99% v v<sup>-1</sup>, Praxair) en el espacio de cabeza, justo después de retirar el mismo volumen de aire para evitar la sobrepresión en las botellas de vidrio. Lo anterior se hizo para obtener las concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub> de 4% y 8%. Posteriormente, las botellas serológicas se incubaron en un agitador orbital horizontal a 400 rpm, 28 ± 1 °C y una irradiancia promedio de 115 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 2.3). Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y de CO<sub>2</sub> se midieron en el espacio de cabeza mediante cromatografía de gases (CG-DCT) cada hora. Las mediciones se realizaron hasta que se agotara el CH<sub>4</sub> o hasta las 24 horas en los ensayos donde no se consumió todo el CH<sub>4</sub>. Además, se cuantificó el O<sub>2</sub> inicial y final, el pH y la biomasa final.

Un segundo experimento, denominado CMA2, se realizó con proporciones iniciales de CMA-SO (p p<sup>-1</sup>) 3:1, 4:1 y 5:1 (con MSM:BG-11 a la misma proporción que cada experimento), con concentraciones iniciales de CH<sub>4</sub> de 4% y 8% (v v<sup>-1</sup>) en el espacio de cabeza (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Proporciones de biomasa CMA-SO y CH<sub>4</sub> inicial en el espacio de cabeza.

Experimento	CH <sub>4</sub> inicial en el espacio de cabeza (%)	Proporción de biomasa CMA-SO (p p <sup>-1</sup> )
CMA1	4	1:1
	4	1:3
	4	3:1
	8	1:1
	8	1:3
	8	3:1
CMA2	4	3:1
	4	4:1
	4	5:1
	8	3:1
	8	4:1
	8	5:1

Para ambos experimentos se colocaron controles de CMA, sin SO<sub>2</sub>, y fueron cultivados en MSM con concentraciones de CH<sub>4</sub> de 4% y 8% (v v<sup>-1</sup>) en el espacio de cabeza.



**Figura 2.3.** Botellas serológicas utilizadas para los ensayos en microcosmos.

### **2.3.3. Caracterización molecular del CMA: CMA1 y CMA2**

El período entre la prueba CMA1 y CMA2 fue de dos meses. Para realizar el análisis molecular del CMA, se tomaron 50 mL de cultivo del reactor de tanque agitado y se le realizaron lavados con el fin de retirar el exceso de NaOH. Para ello, la muestra se centrifugó y el sedimento se lavó 5 veces con solución buffer salina (PBS 1X) antes de la extracción de ADN. Se utilizó el kit de aislamiento de ADN MoBio PowerSoil (Mo Bio Laboratories Inc., CA, EE. UU.) para extraer el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió por espectrofotometría con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, MA, EE. UU.) y el ADN extraído se almacenó a -20 °C.

Las muestras de ADN se enviaron a un proveedor externo (RTL Genomics, Lubbock, EE. UU.) para el análisis de secuenciación Illumina MiSeq. La región hipervariable V4 del gen de 16S rDNA se amplificó de acuerdo con el protocolo estándar de Illumina. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) (Caporaso et al., 2011) y 806bR (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Apprill et al., 2015). Las secuencias se procesaron usando la plataforma QIIME2. Se utilizó DADA2 para realizar el control de calidad, filtrado y remoción de quimeras. Las secuencias resultantes se agruparon *de novo* para formar OTUs (*Operational Taxonomic Units*, por sus siglas en inglés) al 99% de identidad, mediante VSEARCH. La asignación taxonómica se realizó usando el servicio de alineamiento y clasificación de la base de datos SILVA con los siguientes parámetros:

70% de identidad mínima con la secuencia de referencia, 5 vecinos por secuencia de referencia y rechazo de secuencias con identidad menor al 55%.

#### **2.3.4. Distribución de poblaciones por citometría de flujo**

La relación en número de células para las pruebas de proporciones de biomasa de cada grupo microbiano (CMA o SO) durante los experimentos CMA1 y CMA2 se observó mediante citometría de flujo utilizando un equipo BD FACSCalibur (FACS, BD Bioscience, CA, EE. UU.). Se aplicó un pretratamiento a las muestras añadiendo 1 mL de Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM y agitación durante 30 min para romper los agregados. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se fijaron con 500 µL de paraformaldehído al 1%, se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 min a 4 °C y se resuspendieron en 500 µL de amortiguador FACS. La proporción de CMA-SO dentro del co-cultivo se identificó a partir del conteo de 10,000 células registradas mediante tamaño y complejidad. Los datos se analizaron con el software FlowJo (FlowJo™; versión 10.6.1; FlowJo LLC).

#### **2.3.5. Ensayos en microcosmos: Fuentes de nitrógeno**

Para evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y la concentración de CH<sub>4</sub> sobre las tasas de consumo en el co-cultivo, se realizaron ensayos en botellas serológicas de 125 mL con septos de butilo y aros de aluminio. El procedimiento de inoculación fue el mismo que para CMA1 y CMA2. Se probaron tres fuentes de nitrógeno diferentes: nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>), urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) y cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) en MSM con una concentración inicial de 0.33 g<sub>N</sub> L<sup>-1</sup>. Se utilizaron dos concentraciones de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza, 4 y 8% (v v<sup>-1</sup> en aire). La concentración de biomasa inicial fue de 1 ± 0.02 g L<sup>-1</sup> con una proporción de CMA:SO y nutrientes MSM:BG-11 de 3:1. El pH inicial fue de 9.15. Los controles se realizaron con las mismas fuentes de nitrógeno usando solo CMA y MSM. Los experimentos se realizaron en duplicado y en condiciones controladas de temperatura (28 ± 1 °C) e irradiancia (115 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) en un agitador horizontal a 400 rpm. El CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub> se monitorearon cada hora por cromatografía de gases (CG-DCT). La biomasa, el pH y la concentración de O<sub>2</sub> se cuantificaron después de 24 h.

### **2.3.6. Procedimientos analíticos**

#### ***Mediciones de la fase gas***

Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se midieron en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (DCT) (6890N Agilent) con una columna Porapak Q. Se utilizó una jeringa hermética para realizar las inyecciones de 500 µL y se empleó helio (He) como gas acarreador a un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas del inyector, detector y horno se fijaron en 110 °C, 200 °C y 50 °C, respectivamente. La concentración de O<sub>2</sub> final se midió en un cromatógrafo de gases (GOW-MAC Serie 550, EE. UU.) con DCT y una columna CTR1 (Alltech, EE. UU.). El volumen de inyección fue de 200 µL con una jeringa hermética. El flujo de gas acarreador (He) fue de 100 mL min<sup>-1</sup>, y las temperaturas del inyector, detector y horno fueron de 50 °C, 115 °C y 50 °C, respectivamente. El voltaje del detector se ajustó 120mV.

#### ***Biomasa y determinación de pH***

El peso seco celular se determinó mediante la filtración al vacío de muestras líquidas de cultivo a través de una membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.2 µm (Sartorius) previamente pesada, seguido de secado a 60 °C durante 24 h. Después de este período, las membranas secas se colocaron en un desecador y se pesaron a intervalos de 1 h hasta peso constante. El peso seco celular se determinó mediante la diferencia de peso en el filtro con y sin muestra.

El pH se midió manualmente con un electrodo SG200C (Sensorex, EE. UU.).

#### ***Carbono soluble y composición elemental de la biomasa***

Las muestras líquidas de los co-cultivos se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0.2 µm antes de la determinación de carbono total (CT) y carbono inorgánico (CI) mediante un analizador TOC-VCSH (Shimadzu, TOC-L Series, Japón) equipado con un sistema de detección de infrarrojo (NDIR) a través de método de combustión catalítica oxidativa. La acidificación se realizó con HCl 0.1 M y la temperatura de combustión fue de 680 °C.

La composición de la biomasa elemental (contenido de C, H, N y S) del consorcio metanótrofo alcalofílico y *Scenedesmus obtusiusculus* se determinó utilizando un analizador elemental CHNS (Serie II 2400 CHNS/O PerkinElmer, EE. UU.) y el contenido de oxígeno se determinó por diferencia (Barbosa et al., 2021).

### ***Tasas de biodegradación y eficiencia de remoción de metano***

Las tasas máximas de biodegradación específica de CH<sub>4</sub> (expresadas como mgCH<sub>4</sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) se calcularon ajustando los datos de consumo de CH<sub>4</sub> al modelo integrado de Gompertz y considerando el peso seco celular (Acuña et al., 1999).

La eficiencia de remoción de CH<sub>4</sub> (ER, %) en los co-cultivos se calculó mediante la Ecuación 1, donde C<sub>i</sub> es la concentración inicial de CH<sub>4</sub> y C<sub>f</sub> la concentración final de CH<sub>4</sub>.

$$ER = 100 \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \quad (1)$$

### ***Análisis estadístico***

El análisis estadístico de los datos se hizo con el software SPSS 25.0 (IBM). Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar. La homogeneidad de la varianza de los parámetros se evaluó mediante una prueba de Levene. Se usó ANOVA y análisis post-hoc de Dunnett para comparar las tasas de biodegradación de las diferentes proporciones de biomasa con los controles CMA; de igual manera, se utilizó ANOVA para comparar las tasas de biodegradación cuando se usaron diferentes fuentes de N y las concentraciones de CH<sub>4</sub>. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p \leq 0.05$ .

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Efecto de la proporción inicial de biomasa y concentración de CH<sub>4</sub>

La Tabla 2.2 muestra las tasas específicas máximas de biodegradación de CH<sub>4</sub>, la eficiencia de remoción, el O<sub>2</sub> inicial y final, el pH y el CO<sub>2</sub> en la fase gas al final de las cinéticas de la prueba CMA1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de biodegradación debido a la concentración de CH<sub>4</sub> inicial ( $p \geq 0.05$ ). Por el contrario, se encontraron diferencias estadísticamente significativas según la proporción de biomasa utilizada, lo que demuestra que las cantidades variables de CMA-SO sí tienen un efecto sobre la tasa de degradación de CH<sub>4</sub>. Como puede observarse, el valor más alto fue  $393 \pm 0.013 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , obtenido para una proporción de biomasa CMA-SO 3:1 y 8% de CH<sub>4</sub>. Por el contrario, el valor más bajo fue  $264 \pm 0.053 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  alcanzado para la proporción CMA-MA 1:1 y 4% de CH<sub>4</sub>.

La tasa de biodegradación del consorcio CMA sin SO ( $581 \pm 0.042 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  equivalente a  $12.28 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) fue más alta que la tasa reportada por otros autores para el enriquecimiento de bacterias metanotróficas haloalcalófilas ( $1.08\text{--}1.12 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , (Cantera et al., 2019), y la tasa más alta del co-cultivo CMA-SO (proporción 3:1,  $393 \pm 0.013 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , correspondiente a  $10.63 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) fue diez veces más alta, lo que demuestra que incluso en combinación con las microalgas, el CMA consumió CH<sub>4</sub> eficientemente, logrando altas tasas, si se compara con otras bacterias metanotróficas cultivadas a pH alcalino (9.0) (Cantera et al., 2019). Los rendimientos fueron  $0.23 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  y  $0.40 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  para la concentración inicial de metano de 4% y  $0.34 \text{ g}_{\text{biomasa}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  y  $0.40 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  para 8%.

Tanto el O<sub>2</sub> inicial como el producido por la microalga durante la prueba fueron suficientes para la oxidación de CH<sub>4</sub> durante los ensayos. Se observaron incrementos desde un valor inicial de 17–18% hasta 24 y 28% para las tres proporciones de biomasa CMA-SO probadas. En los controles CMA, el O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza se consumió y llegó a concentraciones finales de 12.5% y 7.6% para 4% y 8% de CH<sub>4</sub>, respectivamente. Solo se detectó CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza de los controles CMA y no en los co-cultivos, debido al consumo por las

microalgas y al pH alcalino que favoreció la retención del CO<sub>2</sub> como carbonatos (Acién et al., 2016).

**Tabla 2.2.** Resultados para el experimento CMA1 con proporciones de biomasa CMA-SO 1:1, 1:3, 3:1 y controles CMA con 4% y 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.

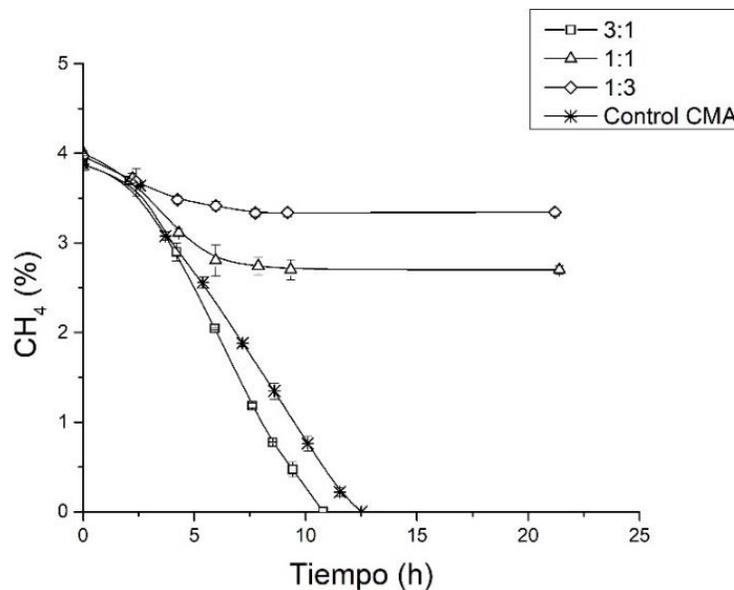
CH <sub>4</sub> (%)	Proporción de biomasa CMA-SO (p p <sup>-1</sup> )	Tasa específica de biodegradación de CH <sub>4</sub> (mg <sub>CH4</sub> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	ER CH <sub>4</sub> (%)	pH inicial	pH final	O <sub>2</sub> inicial (%)	O <sub>2</sub> final (%)	CO <sub>2</sub> final (%)
4	1:1	264 ± 0.053*	32.6	9.15	11.5	17.5	28.7	0.0
4	1:3	297 ± 0.000*	15.7	9.15	11.6	17.7	28.0	0.0
4	3:1	335 ± 0.007*	100	9.15	10.1	17.3	24.4	0.0
4	Control CMA	381 ± 0.012	100	9.15	7.5	17.2	12.5	3.4
8	1:1	271 ± 0.054*	19.0	9.15	11.6	17.2	28.1	0.0
8	1:3	307 ± 0.106*	13.0	9.15	11.6	17.9	27.8	0.0
8	3:1	393 ± 0.013*	65.3	9.15	10.9	17.0	24.4	0.0
8	Control CMA	581 ± 0.042	100	9.15	6.8	17.5	7.6	7.5

Las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> se presentan como el promedio ± desviación estándar para cada duplicado.

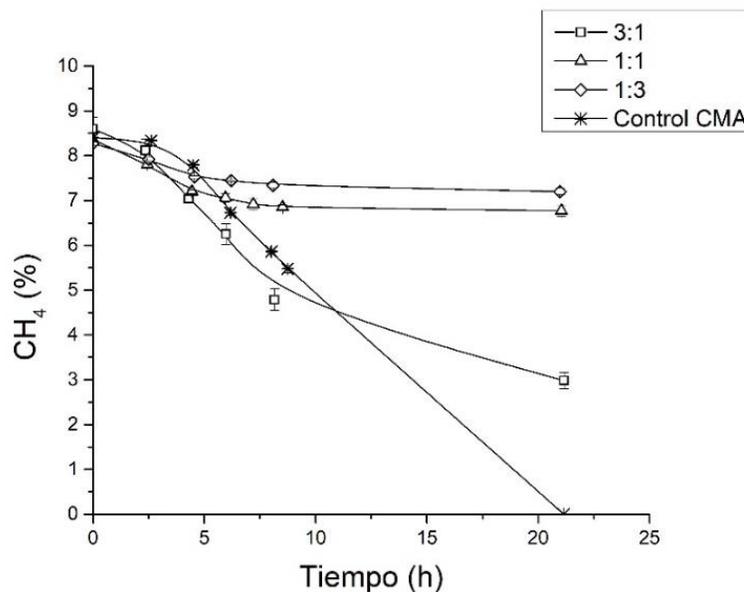
\*Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a p ≤ 0.05 (prueba de comparación múltiple de Dunnett, n=6).

La ER más baja se obtuvo en la proporción 1:3. Las ER de CH<sub>4</sub> fueron 15% y 13%, para 4% y 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza, respectivamente. En cambio, se obtuvieron ER de CH<sub>4</sub> de 32% y 19% para la proporción 1:1 para 4% y 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza. De la misma forma, se observó que la biodegradación de CH<sub>4</sub> cesó en los sistemas cerrados en las proporciones 1:3 y 1:1 (Figuras 2.4 y 2.5). Esto último puede atribuirse a la alcalinización relacionada con el consumo de CO<sub>2</sub> y de nitratos por parte de la nitrato reductasa asimiladora (Albina et al., 2019). Durante los ensayos, no se controló el pH, por lo que éste varió de acuerdo con las actividades metabólicas relativas de CMA y SO. En estas dos proporciones, 1:3 y 1:1, se observó un aumento importante del pH (>11), lo que puede explicar por qué las ER fueron demasiado bajas. Este aumento de pH afecta la actividad del CMA dentro de los co-cultivos, ya que el consorcio se ha adaptado para crecer en un rango de pH de 9.0 a 9.5. El aumento del pH, debido al consumo de CO<sub>2</sub> por las microalgas, depende tanto de la biomasa presente como de la tasa de crecimiento (Morales et al., 2015). Estudios previos han demostrado aumentos significativos del pH con la acumulación de biomasa en cultivos de algas (Chi et al., 2011). En general, se observó que las proporciones con una mayor cantidad

de microalga tienden a desequilibrar el sistema, ya que hubo un aumento en el pH hasta un punto no favorable para los metanótrofos.



**Figura 2.4.** Consumo de CH<sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 1:1 y 3:1 con 4% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.



**Figura 2.5.** Consumo de CH<sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 1:1 y 3:1 con 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.

Por otro lado, en los controles CMA (sin SO), el pH bajó debido al efecto acidificante del CO<sub>2</sub> producido y solubilizado. Esta disminución de pH también puede afectar las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> considerando la naturaleza alcalófila del CMA. La acidificación, provocada por la acumulación de CO<sub>2</sub> disuelto como consecuencia de la actividad metanotrófica, podría así ser neutralizada por el crecimiento de microalgas, que a su vez depende del número de microalgas iniciales, el medio (nutrientes y pH) y la intensidad de la luz. Además del equilibrio de carbono inorgánico disuelto, la absorción de especies iónicas como nitrato, fosfatos, amoníaco, etc. por parte de la microalga, induce importantes cambios de pH en el medio (Morales et al., 2015). Los resultados presentados anteriormente ponen de manifiesto la importancia de controlar el pH para mantener una alta actividad de ambos grupos microbianos dentro del co-cultivo.

Los resultados en CMA1 mostraron que la tasa de degradación más alta se obtuvo para la proporción CMA-SO 3:1. Por lo tanto, se realizó un segundo experimento, CMA2, donde se evaluó el efecto de inocular con mayores proporciones de bacterias metanotróficas. En estos ensayos, las tasas de biodegradación fueron consistentemente más altas ( $p \leq 0.05$ ) con 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza en comparación con el 4%, lo que probablemente se debió al aumento de la demanda de CH<sub>4</sub> debido a la mayor concentración inicial de CMA (Tabla 2.3).

Una mayor concentración de gas en la fase gaseosa, especialmente con compuestos poco solubles como el CH<sub>4</sub> (constante adimensional de Henry es 30 a 25 °C, AlSayed et al., 2018) favorece su degradación al aumentar su biodisponibilidad a través de mayores tasas de transferencia de masa volumétrica (Kraakman et al., 2011). En los controles CMA, los rendimientos fueron 0.33 g<sub>biomasa</sub> g<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup> y 0.43 g<sub>CO<sub>2</sub></sub> g<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup> para una concentración inicial de CH<sub>4</sub> de 4% y 0.51 g<sub>biomasa</sub> g<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup> y 0.47 g<sub>CO<sub>2</sub></sub> g<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup> para 8%.

La ER de CH<sub>4</sub> para las tres proporciones de biomasa y los controles CMA fueron del 100% para ambas concentraciones de CH<sub>4</sub> (Figuras 2.6 y 2.7). Como se puede ver en la Tabla 2.3, las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> no mejoraron para las proporciones 4:1 y 5:1, y el valor más alto en la tasa específica de biodegradación de CH<sub>4</sub>,  $589 \pm 0.011$  mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, se obtuvo para la proporción 3:1 y 8% de CH<sub>4</sub>. Esta alta tasa de degradación de CH<sub>4</sub>, sumada a una mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub>, permitió mantener un pH más bajo, favoreciendo la

actividad metanotrófica. En contraste, las tasas más bajas en los ensayos con 4% de CH<sub>4</sub> se asociaron con aumentos de pH >10.3.

**Tabla 2.3.** Resultados para el experimento CMA2 con relaciones de biomasa CMA-SO 3:1, 4:1, 5:1 y controles CMA con 4% y 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.

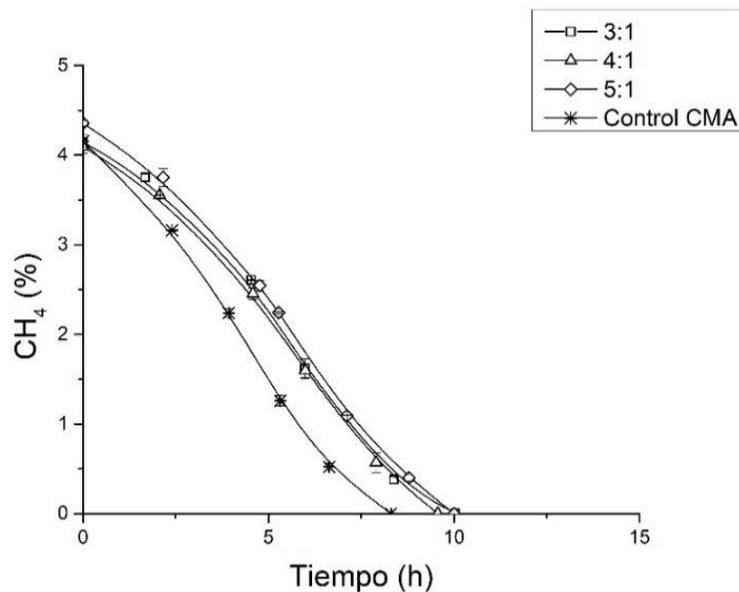
CH <sub>4</sub> (%)	Proporción de biomasa CMA-SO (p p <sup>-1</sup> )	Tasa específica de biodegradación de CH <sub>4</sub> (mg <sub>CH<sub>4</sub></sub> g <sub>biomasa</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	pH inicial	pH final	O <sub>2</sub> inicial (%)	O <sub>2</sub> final (%)	CO <sub>2</sub> final (%)
4	3:1	374 ± 0.001*	9.15	10.8	17.3	16.7	0.0
4	4:1	337 ± 0.007*	9.15	10.4	17.3	16.8	0.0
4	5:1	329 ± 0.015*	9.15	10.3	17.1	16.1	0.0
4	Control CMA	495 ± 0.008	9.15	6.8	17.2	10.0	3.4
8	3:1	589 ± 0.011*	9.15	8.8	17.0	12.7	0.0
8	4:1	540 ± 0.015*	9.15	9.1	17.1	12.1	0.0
8	5:1	490 ± 0.023*	9.15	9.1	17.0	11.4	0.0
8	Control CMA	855 ± 0.068	9.15	6.7	17.1	2.8	6.4

Las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> se presentan como el promedio ± desviación estándar para cada duplicado.

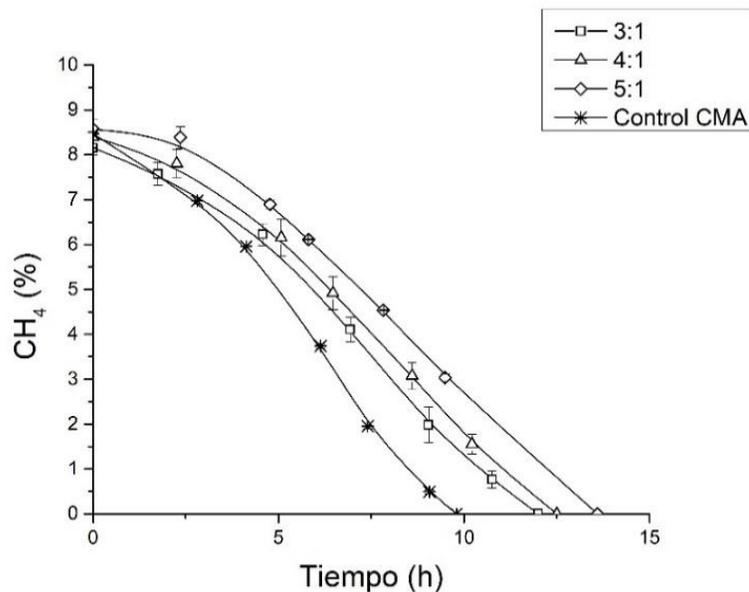
\*Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p \leq 0.05$  (prueba de comparación múltiple de Dunnett, n=6).

Al igual que en los ensayos de CMA1, también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de biodegradación con las diferentes proporciones de biomasa probadas ( $p \leq 0.05$ ) y la proporción CMA-SO 3:1 siguió siendo la mejor proporción inicial.

La diferencia en las tasas de biodegradación entre CMA1 y CMA2 puede atribuirse a cambios debidos a la especialización del consorcio y al enriquecimiento de ciertas especies metanotróficas como *Methylomicrobium* sp. Si bien, el efecto neto de la presencia de la microalga en las pruebas de proporción de biomasa sobre las tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> parece negativo en comparación con los controles CMA, hubo un balance positivo con respecto al consumo/retención de CO<sub>2</sub>. La estrategia de cultivar el CMA con SO contribuyó a la reducción de ambos GEI, ya que no hubo CO<sub>2</sub> presente en la fase gaseosa en los co-cultivos al final de CMA1 y CMA2.



**Figura 2.6.** Consumo de CH<sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 4:1 y 5:1 con 4% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.



**Figura 2.7.** Consumo de CH<sub>4</sub> en las cinéticas de microcosmos para las proporciones CMA-SO 3:1, 4:1 y 5:1 con 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.

Rasouli et al. (2018) también encontraron tasas de consumo de CH<sub>4</sub> más lentas en co-cultivos metanotróficos-microalgales utilizando *M. capsulatus* y *C. sorokiniana*, en comparación con

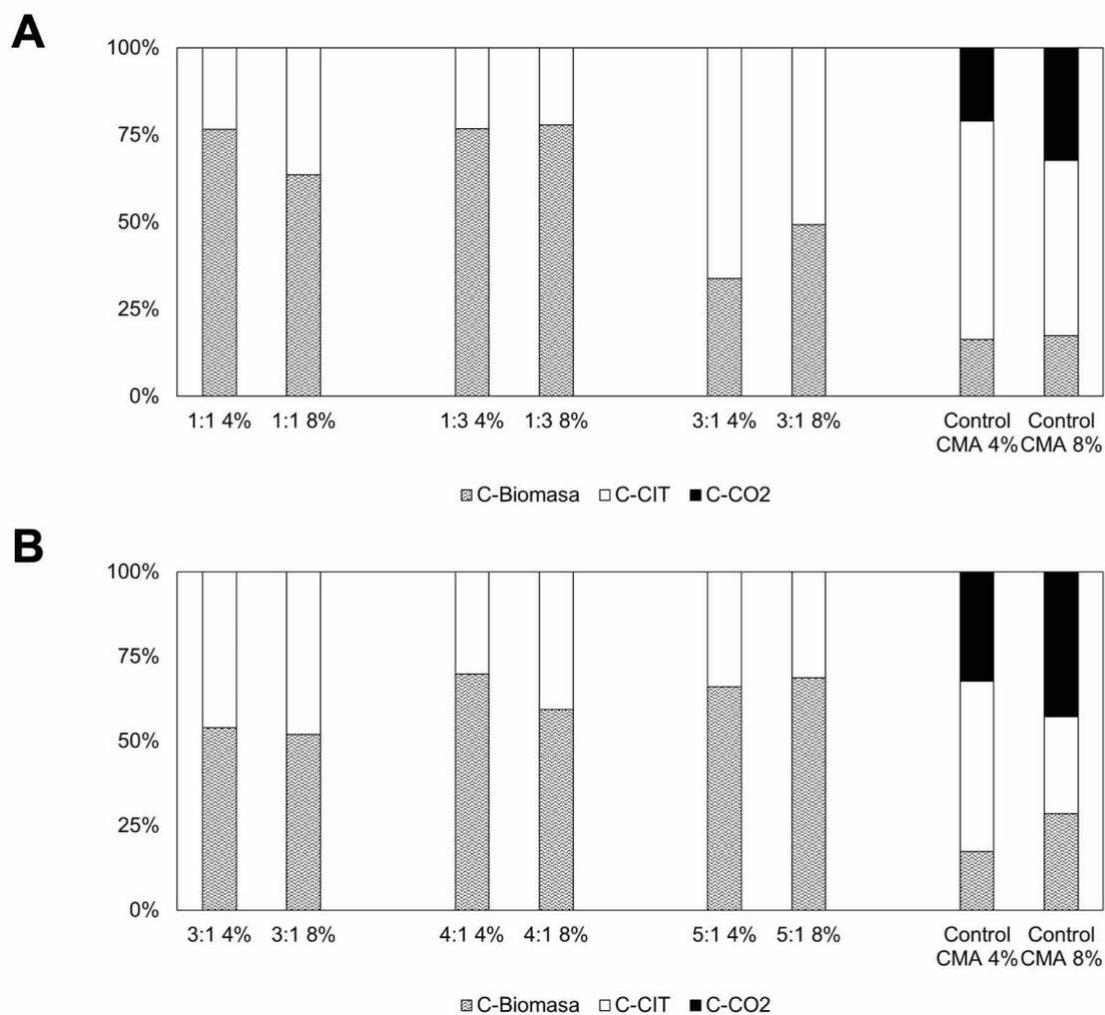
las del metanótrofo *M. capsulatus* solo. Los autores propusieron que *M. capsulatus* compite con el alga por micronutrientes como el cobre, lo que pudo haber obstaculizado su crecimiento. En ese mismo estudio, se reportó acumulación de O<sub>2</sub> al final del experimento (27%), lo que indica que el consumo de O<sub>2</sub> para la oxidación de CH<sub>4</sub> no se equilibró con la producción de O<sub>2</sub> por la fotosíntesis en el sistema, es decir, *M. capsulatus* consumió O<sub>2</sub> a una tasa menor que la tasa de producción de O<sub>2</sub> por *C. sorokiniana*. De manera similar, las tasas de degradación de CH<sub>4</sub> para los co-cultivos en este estudio fueron más bajas que el desempeño del CMA solo. Un equilibrio en la proporción de estos dos grupos microbianos debe asegurar la actividad de ambos para proporcionar las condiciones que permitan el consumo tanto de CH<sub>4</sub> como de CO<sub>2</sub>. Para la combinación del consorcio metanotrófico alcalófilo y *Scenedesmus obtusiusculus*, una proporción de biomasa CMA-SO 3:1 fue adecuada para la mitigación global de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

#### **2.4.2. Destino del carbono en los co-cultivos**

La Figura 2.8 muestra la distribución del carbono para los co-cultivos y controles CMA. El contenido de carbono en la biomasa se determinó mediante análisis elemental. La composición del CMA fue 49.1% C, 7.4% H, 11.0% N y 0.7% S, mientras que la composición elemental de *Scenedesmus obtusiusculus* fue 49.5% C, 7.3% H, 6.9% N y 0.78% S.

El experimento CMA1 (Figura 2.8A) mostró que solo la proporción CMA-SO 3:1 con 4% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza no tuvo CH<sub>4</sub> ni CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa al final de la cinética, ya que este último se mantuvo disuelto en el cultivo debido al equilibrio de pH. En general, el carbono presente en la biomasa (C-biomasa) estuvo entre el 35-80%, mientras que el carbono presente como carbono inorgánico (C-CIT) estuvo en el rango de 20-65%. Este CO<sub>2</sub> disuelto todavía representa una fuente de carbono que se puede utilizar posteriormente para el crecimiento de las microalgas. Se puede esperar que en condiciones de cultivo apropiadas (por ejemplo, pH, nutrientes y luz), eventualmente se consuma todo el carbono. Las condiciones extremas de cultivo y el corto tiempo de las cinéticas no permitieron que todo el carbono del CH<sub>4</sub> se convirtiera en biomasa y en cambio permaneciera en el medio como carbonatos (C-CIT, Figura 2.8).

Por otro lado, en el CMA2 (Figura 2.8B) no se observó ni CH<sub>4</sub> ni CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa al final del experimento, demostrando que una proporción de CMA mayor a 3 partes por una parte de SO es una estrategia exitosa que favorece el consumo total de CH<sub>4</sub> y el consumo/retención de CO<sub>2</sub>. En este experimento, se observó que más del 50% del carbono del CH<sub>4</sub> consumido estuvo presente en la biomasa (C-biomasa) y entre el 30-50% estuvo presente como carbono inorgánico disuelto (C-CIT).



**Figura 2.8.** Distribución del carbono (% C) para los experimentos de proporciones de biomasa CMA-SO y los controles CMA. (A) Resultados para los experimentos CMA1. (B) Resultados para los experimentos CMA2. Carbono en la biomasa (C-biomasa), carbono inorgánico (C-CIT) y carbono del CO<sub>2</sub> (C-CO<sub>2</sub>).

### 2.4.3. Distribución de los grupos microbianos (citometría de flujo)

Se utilizó la técnica de citometría de flujo para observar las proporciones globales de cada grupo microbiano al principio y al final de las cinéticas CMA-SO en microcosmos. CMA y *S. obtusiusculus* se separaron por tamaño y complejidad en las diferentes proporciones de biomasa iniciales probadas, y se determinó la proporción de cada grupo microbiano en conteos de 10,000 células en los co-cultivos (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.** Proporción de cada grupo microbiano (%) dentro de 10,000 recuentos celulares obtenidos por citometría de flujo para las diferentes proporciones de biomasa CMA-SO probadas en este estudio al comienzo y al final de los ensayos cinéticos.

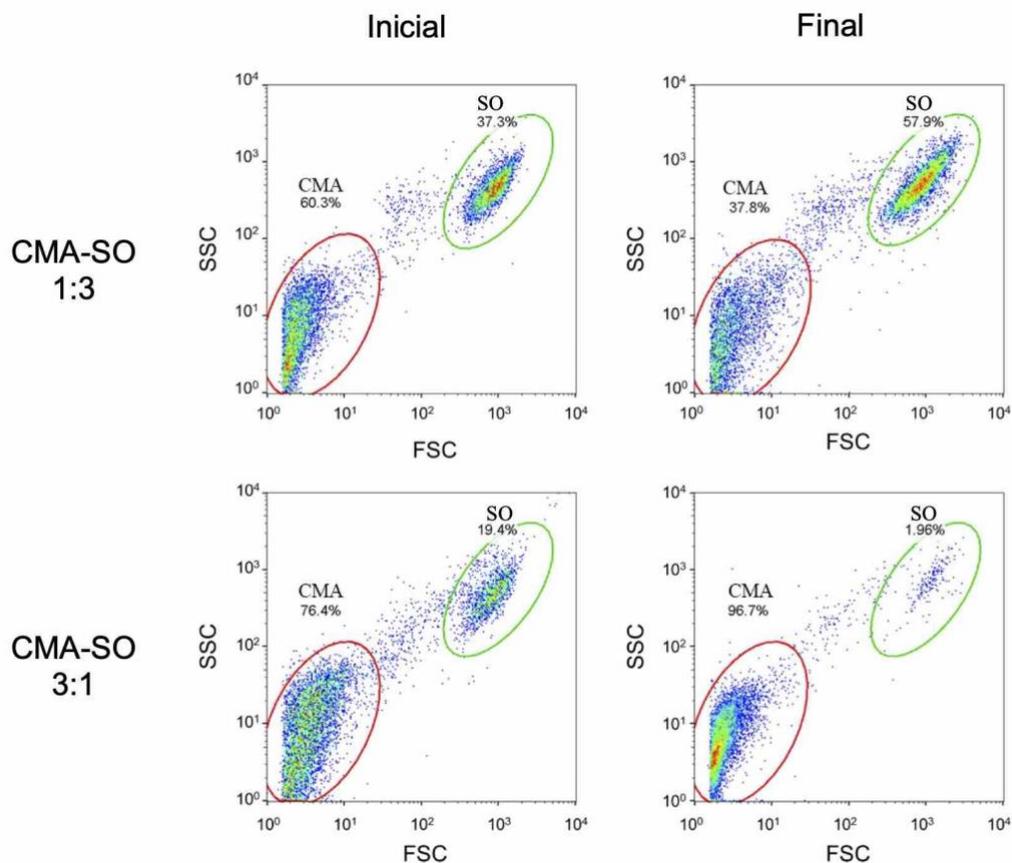
Proporción de biomasa CMA-SO (p p <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> inicial en el espacio de cabeza (%)	CMA		SO	
		Inicial	Final	Inicial	Final
1:1	4	66.3	69.0	33.7	31.0
1:3	4	62.2	60.8	37.8	39.2
3:1	4	81.4	72.9	18.6	27.1
4:1	4	85.1	91.0	14.9	9.0
5:1	4	92.5	97.6	7.5	2.4
1:1	8	55.3	69.4	44.7	30.6
1:3	8	60.3	37.3	37.8	57.9
3:1	8	76.4	96.7	19.4	1.96
4:1	8	85.2	91.7	14.8	8.3
5:1	8	86.6	92.1	13.4	7.9

Es importante señalar que, al inocular las proporciones iniciales de biomasa, éstas se hicieron con base al peso (p p<sup>-1</sup>) y no al número de células de cada grupo microbiano. En este sentido, el número de bacterias iniciales siempre será mayor ya que el tamaño promedio individual de *Scenedesmus obtusiusculus* es de 4.8 µm de ancho × 13.2 µm de largo (Toledo-Cervantes et al., 2013) y el tamaño promedio de las bacterias metanotróficas alcalófilas es 0.5–4.0 × 0.5–2.0 µm (Bowman, 2016). La Figura 2.9 muestra las relaciones CMA-SO inicial y final de los ensayos 1:3 y 3:1 (ambas con 8% de CH<sub>4</sub>). Se observó un aumento en la proporción de células de microalgas en 1:3 (del 37 al 57%) favorecida por el fuerte aumento del pH que inhibió la degradación del metano. Por el contrario, la inoculación con la relación CMA-SO

3:1 aumentó la proporción CMA (del 76 al 96%), lo que puede estar asociado con la alta tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> en este ensayo.

La técnica de citometría resultó una herramienta útil y sencilla para observar la evolución de los co-cultivos, en este caso, la microalga eucariota y el consorcio de bacterias metanotróficas (y heterotróficas). Dadas las diferencias en tamaño y morfología, se logró observar, de manera clara, el cambio en la proporción de cada uno y apoyaron los resultados de los datos cinéticos. Aunque esto es una aproximación del crecimiento en el número de células de cada grupo dentro del co-cultivo, es necesaria más investigación para poder dar un seguimiento más preciso en cultivos mixtos.

Esta técnica fue utilizada previamente por Hill et al. (2017) para determinar la abundancia específica a través del recuento celular de las fracciones de masa de *Synechococcus* 7002 y *M. alcaliphilum*. Los autores de ese estudio determinaron que el 66.6% de la biomasa pertenecía a *M. alcaliphilum* y el 33.2% a *Synechococcus* 7002, cuando inocularon una proporción de biomasa de 1:1. Los intentos más recientes de rastrear especies individuales dentro de co-cultivos metanotróficos-microalgales se presentan por Badr et al. (2019).



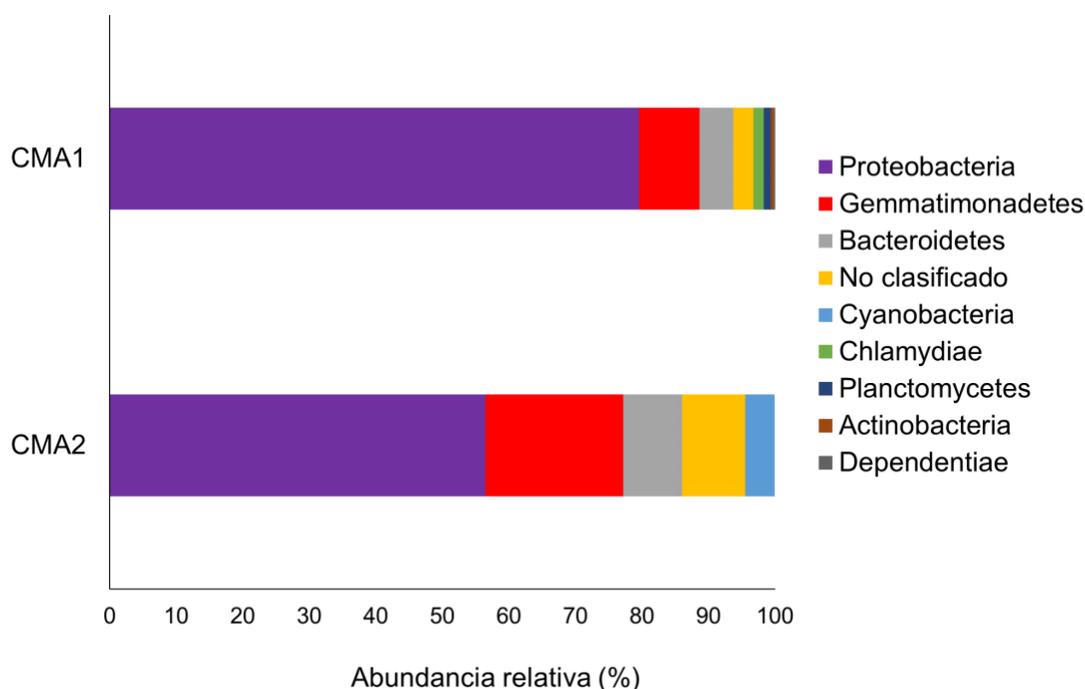
**Figura 2.9.** Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final de los ensayos 1:3 y 3:1 con 8% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza.; la dispersión lateral (SSC) se representa contra la dispersión frontal (FSC). Se muestra el porcentaje de bacterias metanótrofas alcalófilas (CMA) y *Scenedesmus obtusiusculus* (SO).

#### 2.4.4. Diversidad molecular del CMA

El análisis de pirosecuenciación del gen 16S rDNA mostró que la comunidad bacteriana del CMA (CMA1 y CMA2) estuvo compuesta por ocho filos diferentes: Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Chlamydiae, Planctomycetes, Actinobacteria y Dependientiae (Figura 2.10).

El filo Proteobacteria fue predominante en ambos experimentos con una abundancia relativa de 79.54% en CMA1 y 56.46% en CMA2. Como se mencionó anteriormente, los experimentos CMA1 y CMA2 se realizaron con dos meses de diferencia, tiempo que fue

suficiente para que el consorcio CMA evolucionara y se especializara, como mostraron los resultados cinéticos previos.



**Figura 2.10.** Abundancia de filos bacterianos durante los experimentos CMA1 y CMA2.

La Tabla 2.5 muestra las principales afiliaciones taxonómicas obtenidas de la alineación de las OTUs del CMA con secuencias de referencia de la base de datos SILVA (para la región V4 del gen 16S rDNA). Dentro de los organismos oxidantes de metano, la OTU asociada a *Methylocystis* sp. se encontró solo en CMA1 (27.37%), pero no se detectó ninguna en CMA2. El género *Methylocystis* se clasifica en el Grupo II de metanótrofos (Alphaproteobacteria) (Kalyuzhnaya et al., 2015). Las especies de este grupo pueden utilizar metano y sus derivados como fuentes de carbono a través de la ruta de la serina. Muchas de estas bacterias metanotróficas realizan importantes funciones ambientales, ya que son un eslabón en el ciclo global del carbono, actúan como fijadores de nitrógeno y tienen la capacidad de degradar una variedad de contaminantes orgánicos (Webb et al., 2014). La presencia de este género en ambientes alcalinos no es rara (Han et al., 2009).

Además, se detectó otra OTU metanotrófica, *Methylobacterium* sp. tanto en CMA1 (6.76%) como en CMA2 (10.37%). Este género es un oxidante de metano que pertenece al Grupo I

de metanótrofos (Gammaproteobacteria) (Kalyuzhnaya et al., 2015). Las especies *Methylobacterium* tienen un metabolismo respiratorio estrictamente aerobio, y pueden utilizar metano o metanol como fuente de carbono y energía, pero no otros compuestos C1 o Cn. Utilizan la ruta ribulosa monofosfato (RuMP) para la asimilación de carbono y las sales de nitrato y amonio como fuentes de nitrógeno. La mayoría de las especies son mesófilas, con un crecimiento óptimo de 25–30 °C, pero hay algunas cepas alcalinas o tolerantes a los álcalis, que crecen bien en el rango de pH de 9 a 10.5 y que requieren iones de sodio para crecer (Kalyuzhnaya et al., 2008). La presencia de esta OTU en el consorcio alcalófilo tiene sentido, ya que el inóculo para el enriquecimiento del cultivo de CMA se obtuvo de muestras recolectadas de una laguna de soda en México con un pH alto (>9) y condiciones de alta concentración de sal (Valenzuela-Encinas et al., 2009).

Otras OTUs relacionadas con el metabolismo de oxidación de CH<sub>4</sub>, encontradas en ambas muestras de CMA, fueron los metilótrofos *Methylophaga* sp. (5.0% y 4.7% para CMA1 y CMA2, respectivamente) e *Hyphomicrobium* sp. (3.7% y 2.8% para CMA1 y CMA2, respectivamente). Estas bacterias metilotróficas son capaces de oxidar metanol, monometilaminas, dimetilsulfuros, etc. El género *Methylophaga* consiste en miembros halófilos estrictamente metilotróficos del filo Gammaproteobacteria, muchos de los cuales fueron aislados de ambientes marinos o de baja actividad de agua, como superficies de mármol o lagos hipersalinos (Boden, 2012). El género *Hyphomicrobium* (Alphaproteobacteria) es metabólicamente muy versátil, ya que puede crecer en metilamina, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona y otros compuestos C1 (Kelly y Wood, 2010). La presencia de estas OTUs se puede atribuir posiblemente a la producción de metanol como parte de ruta de oxidación de CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub>, llevada a cabo por las bacterias oxidantes de metano. Cantera et al. (2019) también encontraron estos dos organismos en enriquecimientos de metanótrofos haloalcalófilos para la producción de ectoína a pH 9, lo que demuestra que estas condiciones alcalinas favorecen el crecimiento de estos microorganismos y el consumo global de carbono del CH<sub>4</sub>.

Además, otras OTUs relacionadas con otros microorganismos alcalófilos, como *Alishewanella* sp. y *Halomonas* sp. se detectaron en el CMA. Reportes previos de cultivos de enriquecimientos metanotróficos en condiciones alcalinas (Cantera et al., 2019) o de lagos

salinos (Antony et al., 2010) han demostrado la presencia de estos dos géneros. Finalmente, secuencias de bacterias heterotróficas no metanotróficas y oligotróficas del filo Proteobacteria, como *Dokdonella* y el filo Gemmatimonadetes, estuvieron presentes y favorecidas por las condiciones de cultivo de CMA. Estas OTUs se han recuperado de biorreactores que tratan gases residuales (Lebrero et al., 2013) y cultivos de enriquecimiento de bacterias metanotróficas a bajas concentraciones de CH<sub>4</sub> (Cantera et al., 2016).

En general, la diversidad del cultivo de CMA se determinó por las condiciones impuestas durante el enriquecimiento y la fuente de inóculo, utilizando CH<sub>4</sub> como única fuente de carbono y un pH superior a 9. A pesar de los cambios en las poblaciones del CMA, el cultivo mantuvo su capacidad para oxidar CH<sub>4</sub>. El mantenimiento de la estabilidad funcional, en este caso, la biodegradación de CH<sub>4</sub>, indica redundancia funcional, que está asegurada por la presencia de un reservorio de especies capaces de realizar la misma función ecológica (Cabrol & Malhautier, 2011).

**Tabla 2.5.** Principales afiliaciones taxonómicas obtenidas del alineamiento de las OTUs de CMA con secuencias de referencia de la base de datos SILVA (para la región V4 del gen 16S rDNA). En negritas se muestran las OTUs relacionadas al metabolismo del CH<sub>4</sub>.

<b>Filo</b>		<b>Afiliación taxonómica</b>	<b>CMA1</b>	<b>CMA2</b>	
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<b><i>Methylocystis</i> sp.</b>	27.4	ND	
		<b><i>Hyphomicrobium</i> sp.</b>	3.7	2.8	
		Fodinicurvataceae bacterium	3.6	2.6	
		Uncultured <i>Parvibaculum</i> sp.	1.8	3.1	
		Rhizobiaceae bacterium	3.0	ND	
		<i>Chelativorans</i> sp.	2.5	ND	
		Rhodobacteraceae bacterium	4.9	ND	
		Uncultured Alphaproteobacteria	ND	2.2	
		Gammaproteobacteria	<b><i>Methylomicrobium</i> sp.</b>	6.8	10.4
			Xanthomonadaceae bacterium	4.0	9.8
	<i>Dokdonella</i> sp.		2.8	6.3	
	<b>Methylophilaceae bacterium</b>		5.0	ND	
	<b><i>Methylophaga</i> sp.</b>		5.0	4.7	
	Xanthomonadaceae bacterium		1.9	4.0	
	<i>Luteimonas</i> sp.		ND	3.2	
	Uncultured <i>Pseudofulvimonas</i> sp.		3.0	ND	
	Salinisphaerales bacterium		2.3	ND	
	Uncultured Diplorickettsiaceae		1.6	ND	
	Gemmatimonadetes	<i>Halomonas</i> sp.	1.5	0.9	
		<i>Alishewanella</i> sp.	ND	0.4	
Uncultured Longimicrobiaceae		5.1	8.9		
Bacteroidetes	Uncultured Gemmatimonadetes	4.1	7.1		
	Uncultured Gemmatimonadetes	ND	4.8		
	Balneolaceae bacterium	3.4	4.0		
Cyanobacteria	Uncultured Cyclobacteriaceae	0.9	2.2		
	<i>Cyclobacterium</i> sp.	ND	2.2		
	Uncultured Oxyphotobacteria	ND	4.5		
Chlamydiae	Parachlamydiaceae bacterium	1.6	ND		
Unassigned	Unassigned	4.1	15.9		

ND: No detectado

#### 2.4.5. Efecto de la fuente de nitrógeno

Los reportes en literatura indican que tanto las bacterias metanotróficas como las microalgas pueden utilizar nitrato, urea y amonio como fuentes de nitrógeno (Toledo-Cervantes, 2013). Usualmente, el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las microalgas, además, energéticamente es la más eficiente, ya que se requiere menos energía para su metabolismo. Sin embargo, ciertas microalgas prefieren nitrato sobre amonio, ya que el consumo del amonio induce un pH ácido. En este sentido, para intentar disminuir el aumento drástico de pH observado en los experimentos previos, se probaron otras dos fuentes de N, además del  $\text{NaNO}_3$ , con el fin de estudiar su efecto en el pH global, así como en las tasas de consumo de  $\text{CH}_4$ . La Tabla 2.6 muestra los resultados del uso de  $\text{NaNO}_3$  (como control),  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , bajo dos concentraciones iniciales de  $\text{CH}_4$ , en los controles CMA y los co-cultivos CMA-SO. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) para las tres fuentes de N probadas y para las concentraciones iniciales de  $\text{CH}_4$  en el espacio de cabeza utilizadas.

En los controles CMA, las tasas máximas de biodegradación específica de  $\text{CH}_4$  con 8% de  $\text{CH}_4$  inicial fueron alrededor del doble del valor obtenido con aquellas que tenían 4% de  $\text{CH}_4$  inicial para cada fuente de N probada, esto debido a que un gradiente de  $\text{CH}_4$  más alto favorece la solubilización de éste y, por lo tanto, las tasas de biodegradación. Debido a la actividad respiratoria, se encontraron concentraciones finales de  $\text{O}_2$  más bajas con un mayor consumo de  $\text{CH}_4$ . La tasa más alta de biodegradación de  $\text{CH}_4$  fue de  $606 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  con 8% de  $\text{CH}_4$  y  $\text{NO}_3^-$  como fuente de N. El rendimiento molar para la producción de  $\text{CO}_2$  fue de  $0.79 \pm 0.04 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \text{ mol}_{\text{CH}_4}^{-1}$  para  $\text{NO}_3^-$  con 4% y 8% de  $\text{CH}_4$ . En contraste con el  $\text{NO}_3^-$ , la urea y el  $\text{NH}_4^+$  tuvieron tasas de biodegradación de  $\text{CH}_4$  más bajas, lo cual es consistente con experimentos previos realizados en suelos (He et al., 2019; Zheng et al., 2013). Aunque el  $\text{NH}_4^+$  se puede asimilar más fácilmente que el  $\text{NO}_3^-$  por su incorporación en aminoácidos, también puede tener un efecto inhibitorio sobre algunos metanótrofos (Yang et al., 2011) porque las metano monooxigenasas (MMO) tienen una especificidad relativamente baja y pueden oxidar  $\text{NH}_4^+$  al intermediario tóxico hidroxilamina (Tays et al., 2018). Experimentos en cepas axénicas (Hoefman et al., 2014; Nyerges & Stein, 2009), así como en microcosmos de suelos (Yang et al., 2020; Zheng et al., 2013) han demostrado que concentraciones de

$\text{NH}_4^+$  tan bajas como 5 mM y 17 mM son suficientes para inhibir el consumo de  $\text{CH}_4$ , lo que puede explicar la disminución de la actividad metanotrófica. Las tasas más bajas de biodegradación de  $\text{CH}_4$  (alrededor del 50-60%) con urea en el CMA podrían explicarse por la actividad de la enzima ureasa que permite la conversión de urea en  $\text{NH}_4^+$  con el efecto inhibidor descrito anteriormente (He et al., 2019). Además de la inhibición, en condiciones alcalinas y sistemas abiertos, el  $\text{NH}_4^+$  tiene el inconveniente de que se puede desorber como  $\text{NH}_3$ .

El pH disminuyó en los controles CMA, debido al  $\text{CO}_2$  producido, a niveles en los que la actividad metanotrófica se redujo y eventualmente se inhibió. El consorcio alcalófilo, adaptado a un pH entre 9.0 y 9.5, fue inhibido a medida que el pH se acercaba a 7. Los valores más bajos registrados para el pH fueron cercanos a 7.0, cuando se utilizó  $\text{NO}_3^-$ . El pH también cambia debido a variaciones en el equilibrio iónico del medio inducidas por el crecimiento microbiano. Se sabe que la captación de  $\text{NO}_3^-$  favorece el aumento del pH secuestrando  $\text{H}^+$  y, por el contrario, el consumo de  $\text{NH}_4^+$  tiende a liberar  $\text{H}^+$  y, por lo tanto, acidifica el medio. A pesar de estas observaciones, la mayor reducción de pH en los controles CMA en comparación al co-cultivo CMA-SO (como se muestra en la Tabla 2.6) sugiere que la acumulación de  $\text{CO}_2$  fue el principal impulsor del cambio de pH.

**Tabla 2.6.** Resultados de los controles CMA y los co-cultivos CMA-SO para los ensayos de microcosmos con  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuentes de N (concentración inicial de N de  $0.33 \text{ g}_\text{N} \text{ L}^{-1}$ ).

$\text{CH}_4$ (%)	Fuente de N	Tasa específica de biodegradación de $\text{CH}_4$ ( $\text{mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ )		pH final		$\text{O}_2$ final (%)		ER de $\text{CH}_4$ (%)	
		CMA	CMA-SO	CMA	CMA-SO	CMA	CMA-SO	CMA	CMA-SO
4	$\text{NaNO}_3$	$301 \pm 1.6$	$181 \pm 3.7$	7.18	11.01	14.45	22.72	89.9	37.0
8		$606 \pm 7.4$	$318 \pm 9.8$	7.03	11.03	3.22	18.17	97.6	67.4
4	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	$183 \pm 0.8$	$60 \pm 0.5$	7.73	9.99	13.82	23.76	68.0	11.6
8		$293 \pm 1.2$	$72 \pm 5.0$	7.69	9.94	3.53	22.32	74.6	10.4
4	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$82 \pm 0.9$	$39 \pm 2.8$	8.16	8.85	17.17	19.82	5.6	6.4
8		$174 \pm 2.0$	$40 \pm 10.7$	7.36	8.84	7.27	19.02	49.0	4.3

La Tabla 2.6 también muestra que la actividad simultánea de CMA y SO condujo a una reducción inicial del 40-50% en la actividad metanotrófica. La actividad reducida es consistente con los ensayos anteriores para las pruebas de proporción de biomasa en

microcosmos. Roberts et al. (2020) también encontraron esta tendencia en las primeras 24 h de experimentos donde se combinaron metanótrofos y microalgas cultivados en digestato diluido y se usó biogás; aunque se observó un aumento tanto en la asimilación de CH<sub>4</sub> como en la fijación de CO<sub>2</sub> después de 48 h. Otros estudios han encontrado una relación mutualista entre las bacterias metanotróficas y el microorganismo fotosintético (Badr et al., 2022, 2019). La reducción de la actividad metanotrófica, que merece un mayor estudio, podría estar asociada con moléculas orgánicas en el medio de cultivo excretadas por la microalga, como sustancias poliméricas extracelulares o fotosintatos (González-González & De-Bashan, 2021), las cuales podrían influir en el metabolismo del CH<sub>4</sub> o en su transferencia. Es bien sabido que existen varias moléculas que pueden inhibir a las bacterias metanotróficas (Ho et al., 2014; Veraart et al., 2018). En este sentido, el enriquecimiento continuo del CMA bajo condiciones de cultivo seleccionadas puede permitir superar esta limitación, como se observó anteriormente en los experimentos CMA1 y CMA2.

Al igual que en los controles de CMA, el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mantuvo la mayor tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> en los co-cultivos (318 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> con 8% de CH<sub>4</sub>) en comparación con los otros tratamientos. Al igual que con los metanótrofos, estudios previos también han encontrado que la fuente de N puede afectar el crecimiento de las microalgas en cultivos axénicos, aunque los resultados dependen de la cepa (Mandal et al., 2018). Los ensayos con un pH final extremo tuvieron tasas más lentas y una reducción en el consumo global de CH<sub>4</sub>. El nitrato favoreció la actividad en los co-cultivos y fue el ensayo que presentó el mayor consumo de CH<sub>4</sub> y mejor tasa de biodegradación, elevando el pH final a alrededor de 11, que puede estar cerca del límite superior para las bacterias. Globalmente, la microalga aumentó el pH debido a la absorción de CO<sub>2</sub> y produjo O<sub>2</sub> en el proceso (19-24% de O<sub>2</sub> gaseoso). El pH más alto también puede reflejar el aumento de la absorción de H<sup>+</sup> por parte de la microalga. Al igual que en los controles, el nitrógeno en el medio, como sal de amonio, tuvo un efecto deletéreo que puede haberse agravado aún más ya que el pH más alto en los co-cultivos favoreció una concentración de amoníaco más alta (pK<sub>a</sub>=9.15), que es en sí mismo inhibitorio como se describió anteriormente. Park et al. (2010) observaron una reducción del 30% en la masa celular final de las células de *Scenedesmus* para concentraciones que oscilaban entre 200 y 500 ppm NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y una disminución drástica (>60%) cuando estaba por encima de 800 ppm NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Mientras que *Dunaliella* mostró una tendencia similar, otras

especies, como *Chlorella*, mostraron que, aunque no eran inhibidas por  $\text{NH}_4^+$ , tenían tasas de crecimiento hasta 1.75 veces mayores cuando se usaba  $\text{NO}_3^-$  (Gutiérrez et al., 2016). Curiosamente, los resultados con urea mostraron una mayor concentración final de  $\text{O}_2$ , lo que probablemente puede estar asociado con una mayor disponibilidad de  $\text{CO}_2$  debido a su contenido en la molécula de urea. En el espacio de cabeza solo se detectó  $\text{CO}_2$  en el experimento con  $\text{NH}_4^+$ , favorecido por el desplazamiento de equilibrio debido al pH más bajo. En los otros ensayos de co-cultivo, el  $\text{CO}_2$  producido fue asimilado o permaneció como carbonatos en el medio alcalino ( $\text{pH} > 8.8$ ), disponible para ser biodegradado por *SO*.

Los experimentos confirmaron que el  $\text{NO}_3^-$  fue la fuente de N más eficaz para el co-cultivo favoreciendo la sintropía. También prueban que el control del pH es necesario para mantener una actividad metanotrófica y autotrófica equilibrada; esto se puede lograr mediante la regulación de la luz para controlar la actividad fotosintética y, por lo tanto, la absorción de  $\text{CO}_2$  y carbonatos.

## 2.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Las condiciones estudiadas en microcosmos permitieron el secuestro exitoso y simultáneo de los GEI CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por el co-cultivo formado por un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus*. Los ensayos que presentaron un mejor desempeño no tuvieron CH<sub>4</sub> ni CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza al final de los experimentos, lo cual demuestra que se puede lograr el 100% de consumo/retención de carbono con esta estrategia.

De las diferentes proporciones iniciales de inóculo probadas, los resultados para la proporción CMA-SO inicial de 3:1 presentaron la tasa de biodegradación de CH<sub>4</sub> específica más alta ( $589 \pm 0.011 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , con 8% de CH<sub>4</sub> inicial).

No hubo deficiencia de O<sub>2</sub> en el sistema gracias a la producción *in situ* de O<sub>2</sub> por *Scenedesmus obtusiusculus*.

Al probar urea y amonio como fuentes de nitrógeno, los co-cultivos presentaron un pobre consumo de CH<sub>4</sub>, mientras que el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> resultó fue la fuente preferida de nitrógeno. Sin embargo, el pH aumentó a medida que transcurría el tiempo de cultivo, lo cual está relacionado al consumo de CO<sub>2</sub> y nitrato por las microalgas, lo que indica que este parámetro debe ser monitoreado y controlado en un rango adecuado (9-9.5) para asegurar la actividad simultánea de ambos grupos microbianos.

La técnica de citometría de flujo permitió observar de manera sencilla la evolución global de las poblaciones y relacionarlo con el desempeño en cada experimento.

La diversidad del cultivo de CMA estuvo determinada por las condiciones impuestas durante el enriquecimiento y la fuente de inóculo. Se encontraron OTUs relacionadas con el metabolismo de CH<sub>4</sub> (metanótrofos y metilótrofos) y secuencias relacionadas a otros microorganismos heterotróficos comúnmente encontrados en condiciones similares (con CH<sub>4</sub> como única fuente de carbono y pH >9). A pesar de los cambios en las poblaciones del CMA, el cultivo mantuvo su capacidad para oxidar eficientemente CH<sub>4</sub> gracias a la redundancia funcional, que está asegurada por la presencia de especies capaces de realizar la misma función ecológica. Además, las OTUs encontradas en el CMA se asocian a microorganismos que tienen el potencial para producir metabolitos de interés en esas condiciones de cultivo.

## **2.6. RECOMENDACIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda: 1) Utilizar una proporción inicial de inóculo CMA-SO de 3:1 y sales nitrato como fuente de nitrógeno para el escalamiento del co-cultivo. 2) Instalar un sistema de control de pH mediante la regulación de la luz para controlar la población fotosintética y asegurar la actividad de ambos grupos microbianos. 3) Determinar posibles aplicaciones de la biomasa en co-cultivo mediante el estudio de la composición del perfil bioquímico.

## CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL CO-CULTIVO EN UN FOTOBIORREACTOR DE TANQUE AGITADO

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Para maximizar la utilización de carbono del metano por parte de los sistemas mixtos metanotróficos-autótrofos es necesario equilibrar dos procesos. Por un lado, el crecimiento de las bacterias metanótrofas, que consumen  $\text{CH}_4$  y  $\text{O}_2$  mientras producen  $\text{CO}_2$ ; y, por otro lado, los microorganismos fotosintéticos que requieren luz para metabolizar el carbono inorgánico y proporcionar  $\text{O}_2$ . Inicialmente, el  $\text{CH}_4$  requiere altas tasas de transferencia para superar su baja solubilidad en medios acuosos. Una manera de favorecer esta transferencia hacia el medio líquido es mediante el uso de reactores adecuados para este fin. Por otra parte, la selección de microorganismos unicelulares, como la microalga *Scenedesmus*, también puede favorecer la transferencia de masa, dando como resultado tasas de consumo más altas. En contraste, el uso de algas filamentosas podría conducir a la formación de fotogranulos con una difusión de gases más lenta (Safitri et al., 2021).

Además, para fomentar el crecimiento del microorganismo fotosintético, el  $\text{CO}_2$  producido puede retenerse en el medio líquido como carbonatos en condiciones alcalinas para posteriormente ser consumido por la microalga (Steel et al., 2013). Las microalgas pueden utilizar tres vías diferentes de asimilación de carbono inorgánico: (1) por asimilación directa del  $\text{CO}_2$  a través de la membrana plasmática; (2) el uso de bicarbonato mediante la inducción de la enzima anhidrasa carbónica, que convierte el  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$ ; y (3) el transporte directo de bicarbonato a través de la membrana plasmática (Klinthong et al., 2015). Aunque no todas las microalgas pueden asimilar carbonatos, existen reportes de varias especies de *Scenedesmus* capaces de crecer con fuentes de carbono inorgánico como  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Anusree et al., 2017; Nayak et al., 2013). La selección de bacterias metanotróficas alcalófilas ofrece una perspectiva interesante ya que las condiciones de crecimiento favorecen la retención del  $\text{CO}_2$  y, además, se ha demostrado que estas bacterias pueden producir compuestos valiosos además de su biomasa, como ectoína, metanol y bioplásticos (Cantera et al., 2020).

Los estudios previos en microcosmos señalaron al pH como uno de los parámetros operativos críticos por su efecto y dependencia en la disolución de gases y el metabolismo microbiano. La tasa de producción de CO<sub>2</sub> por catabolismo de CH<sub>4</sub> afecta directamente el pH del sistema ya que su disolución provoca acidificación por la formación de ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Sin embargo, la acidificación puede ser revertida por la actividad de las microalgas, que asimilan los carbonatos producidos, aumentando así el pH. Esto permite un mecanismo de control del pH donde la disponibilidad de luz regula la actividad fotosintética y el balance de CO<sub>2</sub> en el sistema. La regulación del pH mediante el control de la iluminación, el control fotónico, ofrece una alternativa para mantener la actividad del cultivo mixto evitando cambios en la alcalinidad y el aumento de la salinidad, el volumen medio y los costos en los que se puede incurrir con el enfoque más tradicional de control de pH que involucra la adición de álcali y ácido.

En este capítulo, las condiciones seleccionadas a partir de los ensayos en microcosmos se escalaron a un fotobiorreactor de tanque agitado de 3-L al cual se le implementó un control de pH fotónico. El co-cultivo se evaluó en términos de la cinética de los gases y biomasa, las actividades relativas de CMA y SO, así como la composición de la biomasa resultante.

### **3.2. METAS**

- Evaluar el consumo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a partir de una corriente diluida de CH<sub>4</sub> en aire por el co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo combinado con la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor de tanque agitado con control de pH fotónico operado en lote.
- Evaluar el consumo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a partir de una corriente diluida de CH<sub>4</sub> en aire por el co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo combinado con la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en un fotobiorreactor de tanque agitado, control de pH fotónico y operación en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.
- Determinar la composición bioquímica de la biomasa resultante e identificar posibles aplicaciones de ésta.

### 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1. Pruebas en lote con iluminación continua y control de pH fotónico

El co-cultivo CMA-SO se evaluó en un fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) de 3-L con un volumen de operación de co-cultivo de 1-L. El FBTA se equipó con una serie de luces LED blancas (Figura 3.1) que proporcionó una irradiancia interna promedio de  $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El inóculo consistió en una proporción de biomasa inicial CMA:SO de 3:1 a una concentración de  $1 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$  y la fuente de N seleccionada de los experimentos en microcosmos ( $\text{NO}_3^-$ ).

Se realizaron dos pruebas en lote en el FBTA: 1) con iluminación continua y 2) con control de pH fotónico, ambas con una concentración inicial de  $\text{CH}_4$  en el espacio de cabeza de  $\sim 5\%$  ( $\text{v v}^{-1}$ ); esta concentración fue seleccionada por condiciones de seguridad considerando el límite inferior de explosividad (LIE) del  $\text{CH}_4$ . El pH se midió con un sensor electroquímico (AppliSens, EE. UU.) y el oxígeno disuelto (OD) con un sensor polarográfico de OD (AppliSens, EE. UU.). Los datos se adquirieron cada segundo con una tarjeta de adquisición LabJack. La temperatura se controló a  $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  usando un controlador PID con una chaqueta eléctrica instalada alrededor de la tira de LED. La agitación se fijó a 500 rpm; este valor fue seleccionado para favorecer la transferencia de los gases a la fase líquida, pues el CMA puede operar a agitaciones entre 500-1000 rpm, sin embargo, es sabido que una alta agitación podría afectar la integridad de las especies microalgales. Después de realizar pruebas con este nivel de agitación en el FBTA, se determinó que a 500 rpm las células de *S. obtusiusculus* se mantienen íntegras. Las concentraciones de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  en el espacio de cabeza se midieron cada 10 minutos mediante CG-DCT. Las pruebas tuvieron una duración de 8 horas. Se midieron las concentraciones de biomasa inicial y final de cada ensayo mediante peso seco. Para la prueba de control de pH fotónico, el pH se mantuvo entre 9.05 y 9.15 mediante el encendido y apagado automático de la iluminación LED. La producción de biomasa y la composición de la fase gaseosa se determinaron como se describe en la sección procedimientos analíticos.



**Figura 3.1.** Fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) con luces LED utilizado para evaluar el co-cultivo CMA-SO durante los ensayos en lote.

### 3.3.2. Lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>

Se utilizó el mismo FBTA descrito anteriormente para evaluar la estabilidad y robustez a largo plazo del co-cultivo, esta vez, conectado a un sistema Arduino para control y adquisición de datos, así como una nueva unidad de iluminación LED de luz blanca (Figura 3.2). El sistema se operó durante 36 días con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub> cada 10 horas, con concentraciones que oscilaron entre el 3 y el 8% (v v<sup>-1</sup> en aire), dependiendo de la etapa de operación. El inóculo consistió en una proporción de biomasa inicial CMA:SO de 3:1 a una concentración de  $0.61 \pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ . El reactor se operó a temperatura controlada de  $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 500 rpm y pH inicial de 9.5. La unidad de iluminación LED proporcionó una irradiancia interna promedio de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se construyó un sistema de adquisición de datos basado en Arduino nano® para adquirir las señales de pH y OD y para regular la actividad de las microalgas a través del control de encendido y apagado de la luz. La iluminación se apagó cuando el pH llegaba a 9.5 (evitando así un aumento excesivo de pH, como se demostró en experimentos anteriores) y se volvió a encender cuando el pH estaba por debajo de 9.4. Se extrajeron muestras de 50 mL de co-cultivo cada 3 días y el volumen se reemplazó cada vez con la misma cantidad de MSM 1X fresco.



**Figura 3.2.** Fotobiorreactor de tanque agitado (FBTA) con sistema Arduino y unidad LED utilizados para evaluar el co-cultivo CMA-SO durante la operación en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

La concentración de biomasa total se determinó mediante peso seco, y los conteos celulares de *Scenedesmus obtusiusculus* se realizaron con una cámara de recuento celular Improved Neubauer. Se determinaron la composición bioquímica de la biomasa del co-cultivo (lípidos, carbohidratos totales y proteínas), el nitrógeno total y el carbono soluble. Las concentraciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fueron seguidas por CG-DCT para determinar las tasas de específicas y volumétricas de biodegradación de CH<sub>4</sub> en diferentes días de operación.

### **3.3.3. Procedimientos analíticos**

Las mediciones en la fase gas, citometría de flujo y determinación de la biomasa por peso seco se realizaron como se describe en la sección 2.3.6. del Capítulo 2.

#### ***Conteo celular***

La concentración celular de *Scenedesmus obtusiusculus* se midió en muestras frescas por el método de conteo directo al microscopio óptico (Olympus CX43) en cámara Improved Neubauer, realizando las diluciones necesarias para lograr un conteo de entre 30 y 300 células por campo.

### ***Carbono soluble y nitrógeno total***

Las muestras líquidas de co-cultivo se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$  antes de la determinación de carbono total (CT), carbono inorgánico (CI), carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT) en un analizador TOC-L CSH equipado con un sistema de detección de infrarrojo (NDIR) a través de método de combustión catalítica oxidativa. El equipo también está acoplado a un módulo de quimioluminiscencia TNM-L (Shimadzu, Japón) para la determinación de NT. La acidificación se realizó con HCl 0.1 M y la temperatura de combustión fue de 680 °C. El carbono orgánico total (COT) se calculó como la diferencia entre el CT y el CI medidos.

### ***Perfil bioquímico de la biomasa***

Los análisis de proteínas y carbohidratos de la biomasa del co-cultivo se iniciaron agregando perlas de vidrio (0.5 g) a muestras de 1 mL de co-cultivo para la ruptura celular. Las muestras se colocaron en un homogeneizador de microtubos BeadBug® y se sometieron a tres ciclos de ruptura de 60 segundos cada uno.

El contenido de proteínas se determinó con el método de Lowry modificado (Lowry et al., 1951) y los carbohidratos totales con el método de ácido sulfúrico-fenol modificado (Dubois et al., 1956). El contenido de lípidos se cuantificó utilizando el método de sulfo-fosfo-vainillina (Mishra et al., 2014) a partir de alícuotas de 100-300  $\mu\text{L}$  de co-cultivo. El procedimiento detallado de las técnicas se presenta en Anexos 1-3. La composición bioquímica de la biomasa se expresó como porcentaje en peso seco.

### ***Cálculos***

Las tasas máximas de biodegradación específica de  $\text{CH}_4$  (expresadas como  $\text{mg}_{\text{CH}_4} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) se calcularon ajustando los datos de consumo de  $\text{CH}_4$  al modelo de Gompertz.

La concentración de protones se calculó utilizando la Ecuación 2 obtenida a partir de la ecuación de  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ :

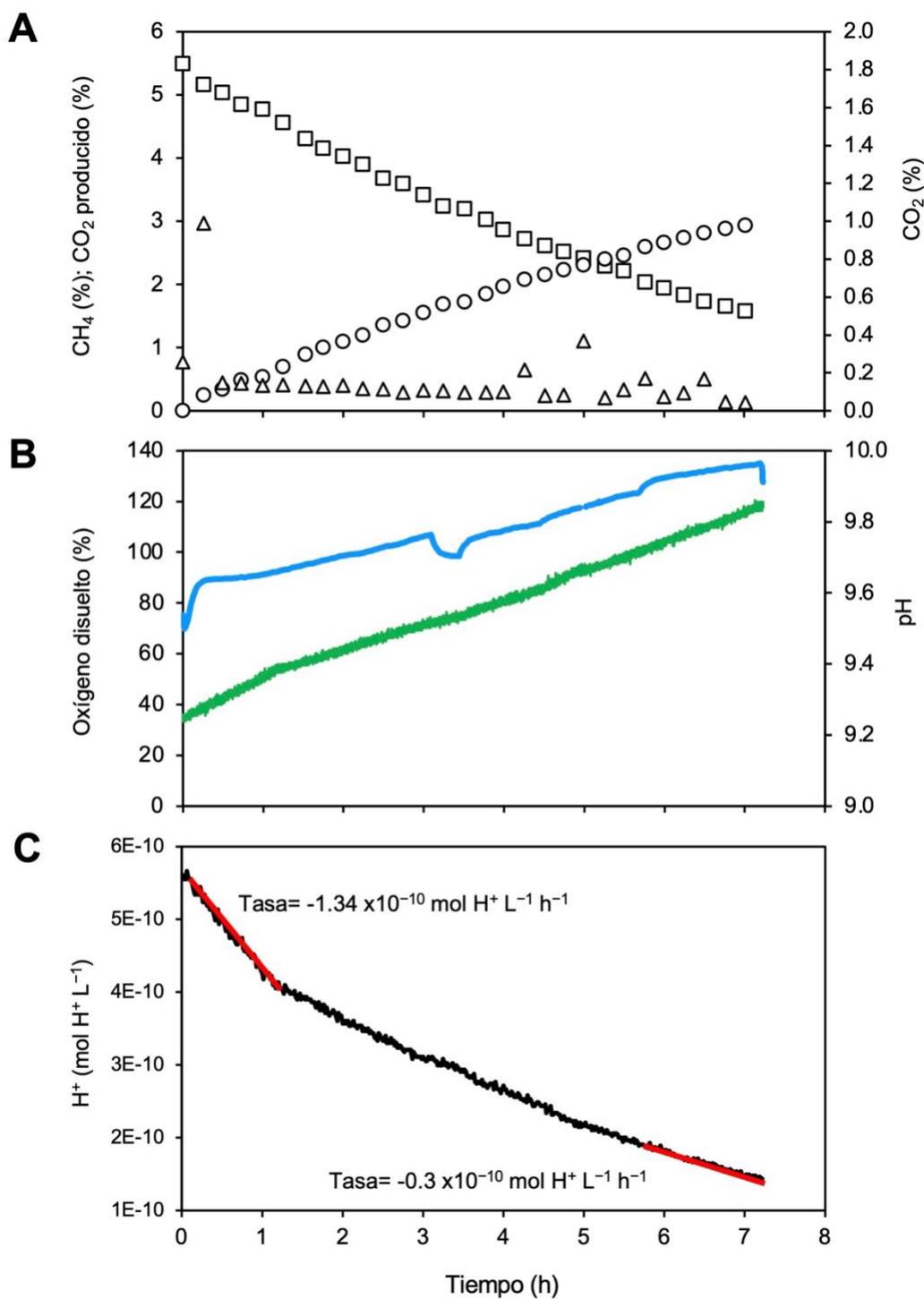
$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}} \quad (2)$$

## 3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.4.1. Lote con iluminación continua (sin control de pH)

El crecimiento del co-cultivo en el fotobiorreactor de tanque agitado permitió un crecimiento suspendido homogéneo sin granulación, a diferencia de otros reportes (Safitri et al., 2021), donde se forman gránulos macroscópicos debido a la naturaleza filamentosa del organismo fototrófico utilizado. El contenido de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza del FBTA se muestran en la Figura 3.3A; la figura también indica el CO<sub>2</sub> estimado a partir del rendimiento de oxidación de CH<sub>4</sub> (0.79 mol<sub>CO<sub>2</sub></sub> mol<sub>CH<sub>4</sub></sub><sup>-1</sup>) obtenido de los ensayos de microcosmos (CMA y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Se observó que, el promedio de CO<sub>2</sub> en el espacio de cabeza fue de 0.13 ± 0.07% y que éste tuvo una tendencia decreciente (a <0.1%) a pesar de que se el CO<sub>2</sub> se producía continuamente (tasa de producción estimada, 482 mg<sub>CO<sub>2</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). Lo anterior refleja el consumo por parte de la microalga y el desplazamiento del equilibrio hacia carbonatos debido a la tendencia creciente de pH. La tasa máxima de biodegradación específica de CH<sub>4</sub> obtenida en este experimento fue de 258 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

La Figura 3.3B muestra que el pH aumentó de 9.2 a 9.85 en aproximadamente 7 h, siguiendo la misma tendencia que los experimentos de microcosmos, confirmando la necesidad de controlar el pH dentro del rango óptimo de 9.0-9.5. La caída de OD al final del experimento se produjo una vez apagada la luz. Cabello et al. (2015) reportaron la actividad fotosintética óptima para *Scenedesmus obtusiusculus* a un pH de alrededor de 8 y una reducción del 65% a un pH de 9. A partir de los experimentos de microcosmos, se puede esperar un aumento de pH por encima de 10 en cultivos a largo plazo, sin control de pH, lo que sería desfavorable tanto para el consumo de CH<sub>4</sub> como de CO<sub>2</sub>. Aunque el pH muestra un aumento constante, la alcalinización se representa mejor por la concentración de protones (H<sup>+</sup>) (Figura 3.3C). Las tasas de producción de protones, calculadas a partir de la pendiente, muestran que la absorción de protones disminuye conforme el tiempo evoluciona, de -1.34 x10<sup>-10</sup> mol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a -0.3 x10<sup>-10</sup> mol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La disminución podría estar asociada con la alcalinización del medio y el consumo de CH<sub>4</sub>.



**Figura 3.3.** Datos del co-cultivo CMA-SO en el FBTA durante el experimento en lote con iluminación continua. **(A)** concentración de CH<sub>4</sub> (cuadrados) y CO<sub>2</sub> (triángulos) en el espacio de cabeza y producción estimada de CO<sub>2</sub> (círculos); **(B)** pH (línea azul) y evolución del oxígeno disuelto (línea verde); **(C)** Evolución de protones en el FBTA.

El oxígeno disuelto en el sistema aumentó de 60% a 140%, o alrededor de 8.4 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> a la presión atmosférica de la Ciudad de México, debido a la actividad de las microalgas, favoreciendo la oxidación de metano por las bacterias metanótrofas. Sin embargo, el oxígeno disuelto podría inhibir la actividad de las microalgas y debe ser monitoreado y controlado (Cabello et al., 2015; Sforza et al., 2020), especialmente en ensayos por lotes o semi-lotes. Para *S. obtusiusculus*, el OD por encima de 20 mgO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> inhibe la actividad fotosintética (Cabello et al., 2015).

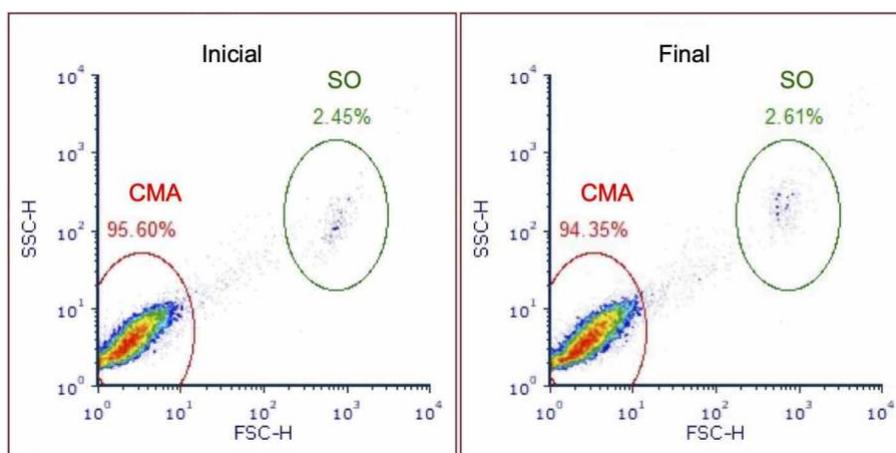
Además, se estimaron las actividades metanotróficas-fotoautotróficas relativas considerando el O<sub>2</sub> producido y el CO<sub>2</sub> consumido. La Tabla 3.1 muestra el equilibrio molar considerando los balances de masa de estos gases en las fases líquida y gaseosa y la tasa de crecimiento microbiano. La actividad metanotrófica se determinó considerando los rendimientos del consorcio CMA obtenidos de los ensayos de microcosmos (0.79 molCO<sub>2</sub> molCH<sub>4</sub><sup>-1</sup> y 1.84 molO<sub>2</sub> molCH<sub>4</sub><sup>-1</sup>) y las mediciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en fase gaseosa. La fotoautotrofia se estimó considerando el CO<sub>2</sub> en fase gaseosa, el equilibrio de carbonatos con el pH y el OD. Los resultados demostraron que SO parece predominar en la actividad global del co-cultivo, como se ve en los balances de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, lo que concuerda con estudios previos (Badr et al., 2019). Una de las principales razones es la diferente biodisponibilidad de los componentes gaseosos en el medio acuoso. Mientras que la baja solubilidad del CH<sub>4</sub> limita la actividad metanotrófica, el pH alcalino favorece la retención de CO<sub>2</sub> y, por tanto, el metabolismo de la microalga. El balance de CO<sub>2</sub> resultó negativo en el co-cultivo, ya que la absorción de carbono de SO incluyó no solo el CO<sub>2</sub> producido por la oxidación de CH<sub>4</sub>, sino también el contenido inicial de carbono inorgánico.

**Tabla 3.1.** Balances de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> de consumo/producción individual (estimado) y general (CMA-SO) en el FBTA para el experimento en lote con iluminación continua.

	mmol totales	
	Balance de CO <sub>2</sub>	Balance de O <sub>2</sub>
CMA	+94	-219
SO	-101	+272
CMA-SO	-7	+53

\* Los valores negativos representan consumo; los valores positivos significan producción/acumulación.

La evolución de cada grupo microbiano dentro del FTBA se observó mediante citometría de flujo. Como se mencionó anteriormente, se inoculó una relación CMA:SO de 3:1 en los experimentos. La Figura 3.4 muestra que la proporción CMA:SO se mantuvo prácticamente constante en las muestras inicial y final. Esto sugiere que esta proporción es adecuada, como indicaron los ensayos en microcosmos, y resultó apropiada cuando el sistema se escaló.



**Figura 3.4.** Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final dentro del FBTA durante el experimento en lote con iluminación continua; la dispersión lateral (SSC) se representa contra a la dispersión frontal (FSC). Se muestra el porcentaje de bacterias metanótrofas alcalófilas (CMA) y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (SO).

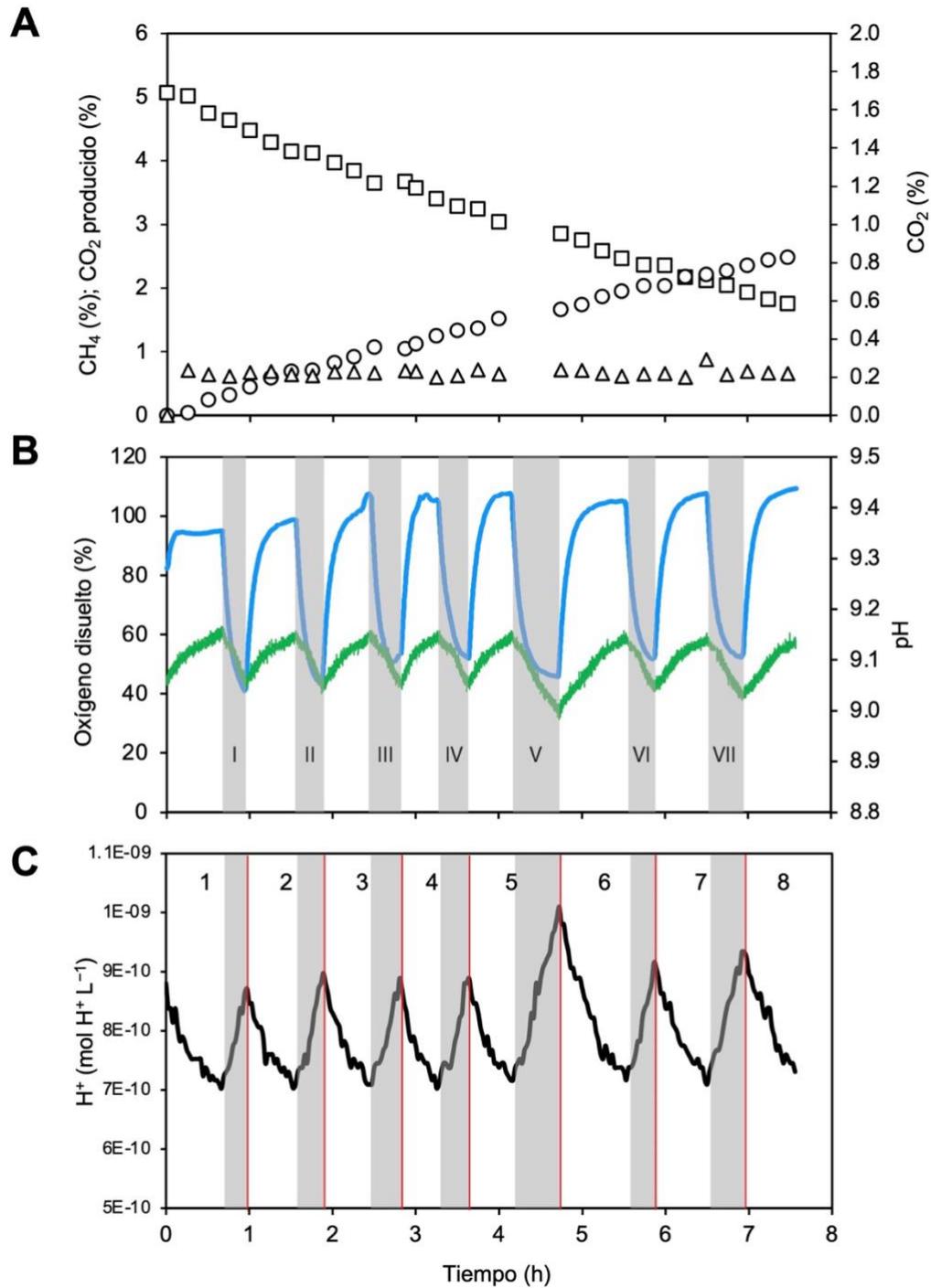
### 3.4.2. Lote con control de pH fotónico

Cambios en el pH pueden afectar drásticamente el metabolismo de los miembros del co-cultivo. Por esta razón se estudió el control de pH basado en cambios en la iluminación utilizando el mismo fotobiorreactor, al que de ahora en adelante nos referimos como control de pH fotónico. El control fotónico de pH se mantuvo entre 9.05 y 9.15 mediante el encendido y apagado automático de la iluminación LED, para regular el contenido de CO<sub>2</sub>. La respuesta rápida refleja resultados previos por Cabello et al. (2014), quienes reportaron la dinámica de fotobiorreactores ante cambios de irradiación. La concentración de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza disminuyó a 1.75 % v v<sup>-1</sup> (Figura 3.5A) con una tasa de 196 mg<sub>CH<sub>4</sub></sub> g<sub>biomasa</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> y no se vio afectada por la exposición a las fases de luz y oscuridad ya que el CMA no es dependiente de la luz. Existen reportes que indican que la exposición a la luz no afecta las

tasas de absorción de CH<sub>4</sub> en las bacterias metanotróficas (Miroshnikov et al., 2019). Las concentraciones de biomasa inicial y final fueron de 1.20 y 1.28 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

El CO<sub>2</sub> gaseoso se mantuvo en  $0.22 \pm 0.04\%$  y presentó ligeras variaciones durante los ciclos de iluminación. Con luz, la eliminación de CO<sub>2</sub> por SO fue más rápida que el CO<sub>2</sub> producido por CMA, lo que indica un contenido gaseoso de CO<sub>2</sub> más bajo. En la fase oscura ocurre lo contrario, donde el CO<sub>2</sub> aumenta casi al mismo nivel inicial del experimento. El control de pH que se muestra en la Figura 3.5B favoreció menores variaciones en el espacio de cabeza y, en consecuencia, en el medio líquido. El valor promedio del espacio de cabeza ( $0.22 \pm 0.04\%$  CO<sub>2</sub>) fue más alto que en el ensayo no controlado ( $0.13 \pm 0.07\%$  CO<sub>2</sub>), probablemente debido al pH más bajo en este experimento.

El efecto de los ciclos de iluminación sobre el pH y el oxígeno disuelto (Figura 3.5) muestra que, al inicio de la operación, cuando el CH<sub>4</sub> estaba más concentrado, el oxígeno disuelto inicial estaba al 80% de saturación, llegando al 95% por acción de la microalga. El encendido/apagado de las luces provocó una respuesta rápida (~5 segundos). A medida que el CMA eliminó el CH<sub>4</sub>, la concentración de oxígeno disuelto durante los períodos de luz alcanzó niveles que excedieron el valor de saturación del 100% en el medio después de la segunda hora de operación. Los niveles más bajos registrados durante los períodos oscuros se mantuvieron aproximadamente en 40%. Esto demuestra que no hubo deficiencia de oxígeno en el sistema debido a la presencia del cultivo SO, que elimina la mayor parte del CO<sub>2</sub> producido, permitiendo el secuestro de ambos gases dentro de un solo sistema. La Tabla 3.2 resume la tendencia global de consumo de oxígeno por parte del consorcio metanotrófico. El valor promedio de la duración de cada período de oscuridad fue de 0.35 h, mientras que la tasa global de consumo de oxígeno fue de  $822 \pm 110 \text{ gO}_{2\text{consumido}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 3.5.** Datos del co-cultivo CMA-SO en el FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico. **(A)** concentración de CH<sub>4</sub> (cuadrados) y CO<sub>2</sub> (triángulos) en el espacio de cabeza y producción estimada de CO<sub>2</sub> (círculos); **(B)** pH (línea verde) y evolución del oxígeno disuelto (línea azul). Las fases oscuras se indican como I-VII. **(C)** Evolución de protones. Las áreas sombreadas representan los períodos oscuros.

**Tabla 3.2.** Variaciones y tasas de oxígeno disuelto en el FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico.

Período	Duración (h)	OD min (%)	OD máx (%)	gO <sub>2</sub> consumido m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>
I	0.29	40.64	95.37	730.00
II	0.32	43.80	99.44	712.54
III	0.37	50.55	108.20	986.84
IV	0.36	51.77	107.65	713.52
V	0.57	45.57	107.89	932.62
VI	0.34	51.10	105.58	812.72
VII	0.44	52.07	107.89	866.23

En cuanto a la evolución del pH, se encontraron períodos más cortos para la etapa de acidificación (es decir, fase oscura con producción de CO<sub>2</sub>, pero sin consumo de éste). La concentración de protones (H<sup>+</sup>) se muestra en la Figura 3.5C. A partir de estos valores, se calcularon las tasas de producción de protones (Tabla 3.3) para cada período, arrojando tasas promedio de  $-3.07 \pm 0.85 \times 10^{-10}$  y  $+5.28 \pm 0.54 \times 10^{-10}$  mol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para las fases iluminadas y oscuras, respectivamente. El valor del primer período con luz fue consistente con el resultado obtenido en el experimento con iluminación continua (tasa=  $1.34 \times 10^{-10}$  mol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Estos valores muestran que, durante la fase iluminada, la actividad de las algas supera a la de las bacterias hasta la siguiente fase oscura.

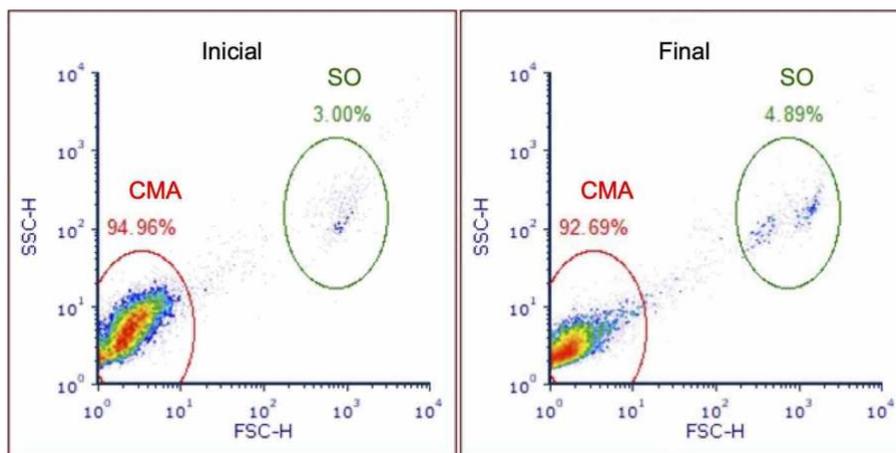
En teoría, las poblaciones de CMA-SO podrían mostrar un crecimiento equilibrado y, por lo tanto, mantener un pH estable. Sin embargo, en la práctica, las tasas volumétricas relativas divergen debido a las diferencias en las tasas de crecimiento, el número de células, la susceptibilidad a moléculas orgánicas, efectos de sombreado, etc. Aunque el equilibrio CO<sub>2</sub>/carbonatos determina principalmente el pH, otros factores también influyen, como el consumo de nitrato o producción de otras moléculas, como ácidos orgánicos (González-González y De-Bashan, 2021).

**Tabla 3.3.** Tasas de producción de protones para el experimento en lote con control de pH fotónico.

Las tasas están en mol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Período →	1	2	3	4	5	6	7	8
Iluminación	-2.02	-2.69	-3.25	-3.72	-3.16	-3.47	-2.99	-3.27
Oscuridad	5.64	5.58	4.67	4.90	5.25	5.75	5.19	

Similar al ensayo de citometría de flujo anterior, la Figura 3.6 muestra que la relación CMA-SO 3:1 permitió un crecimiento equilibrado entre ambos grupos microbianos y mantuvo la estabilidad en el sistema, ya que la actividad (consumo de CH<sub>4</sub>, producción y consumo de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) no fue afectada dentro del FBTA.

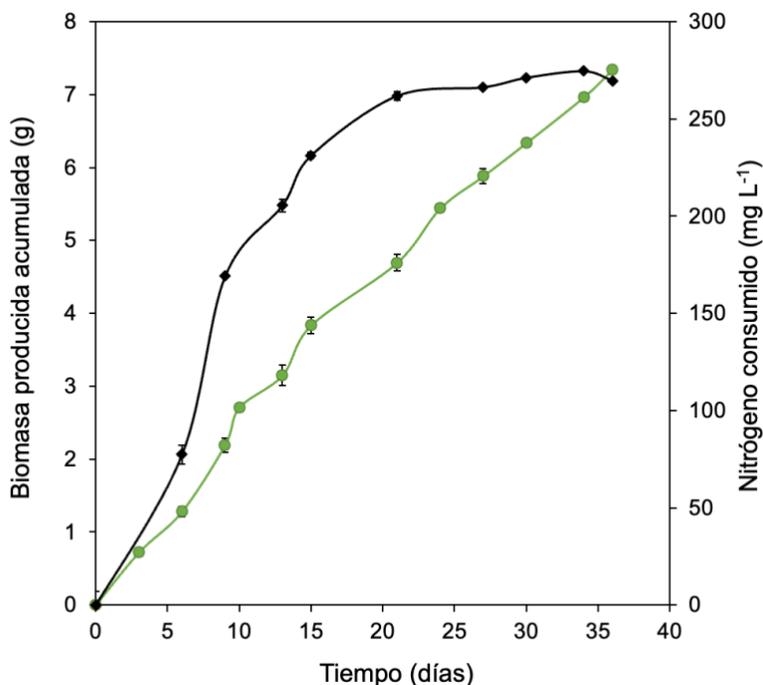


**Figura 3.6.** Enumeración de cada tipo de célula en 10,000 recuentos a través del tamaño y la complejidad de la biomasa CMA-SO inicial y final dentro del FBTA durante el experimento en lote con control de pH fotónico; la dispersión lateral (SSC) se representa contra a la dispersión frontal (FSC). Se muestra el porcentaje de bacterias metanótrofas alcalófilas (CMA) y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (SO).

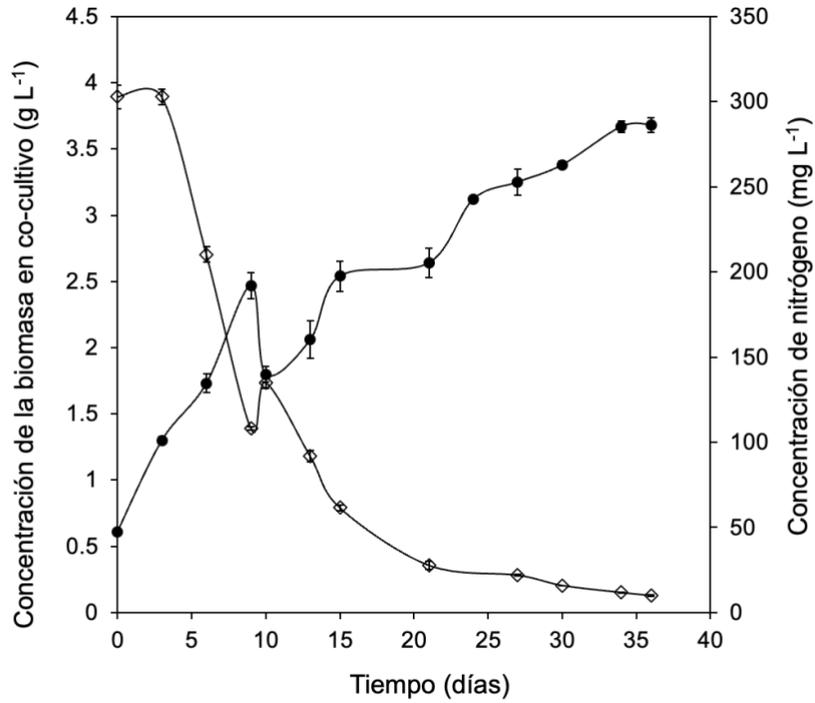
### 3.4.3. Lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>

La producción de biomasa y la evolución del nitrógeno en el co-cultivo a lo largo del tiempo se muestran en las Figuras 3.7 y 3.8.

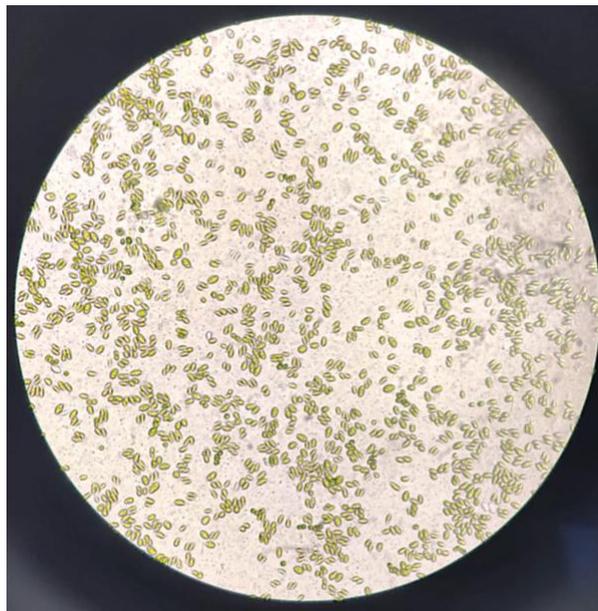
Como se puede observar existió una acumulación constante de biomasa, alcanzando una concentración final de  $3.68 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$  en el día 36. Asimismo *S. obtusiusculus* alcanzó altas densidades celulares (Figura 3.9). El conteo de células de *S. obtusiusculus* se presenta en la Figura 3.10, mostrando un crecimiento constante hasta el día 21, que coincide con el inicio de la limitación de N en el medio de cultivo, que restringe la duplicación celular, pero favorece la acumulación de materiales de reserva. La biomasa total producida acumulada fue de 7.34 g considerando la reposición periódica del medio. La concentración máxima de biomasa de CMA-SO fue inferior a los  $4.16 \text{ g L}^{-1}$  obtenidos por para el cultivo único de *Scenedesmus obtusiusculus* en condiciones controladas al interior, suficiencia de N y sin limitaciones de CO<sub>2</sub> o luz (Cabello et al., 2015), pero superior que otros co-cultivos suspendidos de metanótrofos-microalgas en botellas ( $3 \text{ g L}^{-1}$ , Roberts et al., 2020;  $1.48 \text{ g L}^{-1}$ , Rasouli et al., 2018;  $0.8 \text{ g L}^{-1}$ , Li et al., 2022).



**Figura 3.7.** Biomasa producida acumulada (línea verde) y nitrógeno consumido (línea negra) durante la operación del co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

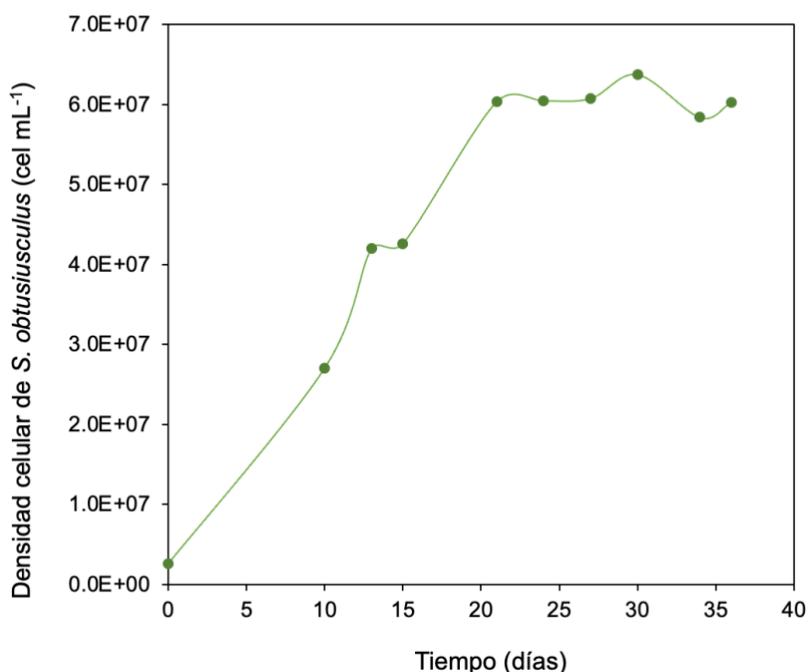


**Figura 3.8.** Crecimiento de biomasa (círculos) y concentración de nitrógeno (rombos) durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>. Nota: La discontinuidad en los días 8-10 fue un artefacto después de resuspender las células que crecían en la pared del reactor y por el efecto de dilución debido a la adición de medio nuevo.



**Figura 3.9.** Observación del co-cultivo con un aumento de 40X al microscopio óptico.

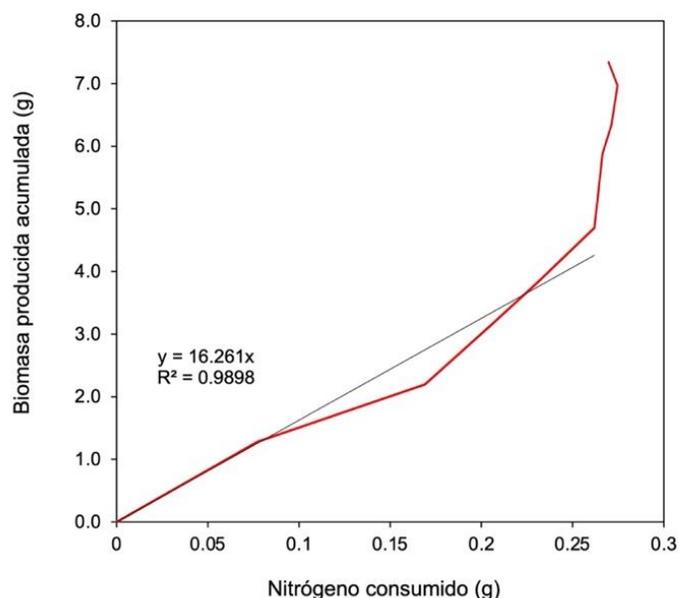
Sin embargo, en algunos de estos estudios se utilizaron aguas residuales como medio de cultivo, además del medio de sales minerales. En esta situación, el efluente puede carecer de nutrientes esenciales o contener moléculas que pueden inhibir el crecimiento tanto de las microalgas como de los metanótrofos. En este estudio, la suplementación de medio fresco después del muestreo proporcionó los nutrientes necesarios para un crecimiento sostenido. En comparación con la investigación publicada sobre co-cultivos suspendidos de microalgas y metanótrofos, este es el primer trabajo en operar durante más de un mes, logrando un buen crecimiento, demostrando estabilidad y una estrategia de alimentación/control de pH fotónico que podría implementarse y escalarse fácilmente.



**Figura 3.10.** Recuentos celulares de *Scenedesmus obtusiusculus* durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

En los días iniciales, en condiciones de suficiencia de nitrógeno, el rendimiento de biomasa producida por gramo de nitrógeno consumido fue de 16.26 g<sub>biomasa</sub> g<sub>Nconsumido</sub><sup>-1</sup>, o un contenido de nitrógeno esperado de 6.2% en la biomasa, que fue calculado a partir de la pendiente (Figura 3.11). La concentración limitante de N fue de 27.7 mg L<sup>-1</sup> cuando el sistema alcanzó 2.66 g<sub>biomasa</sub> L<sup>-1</sup> en el día 21. Después de este período, la disponibilidad de

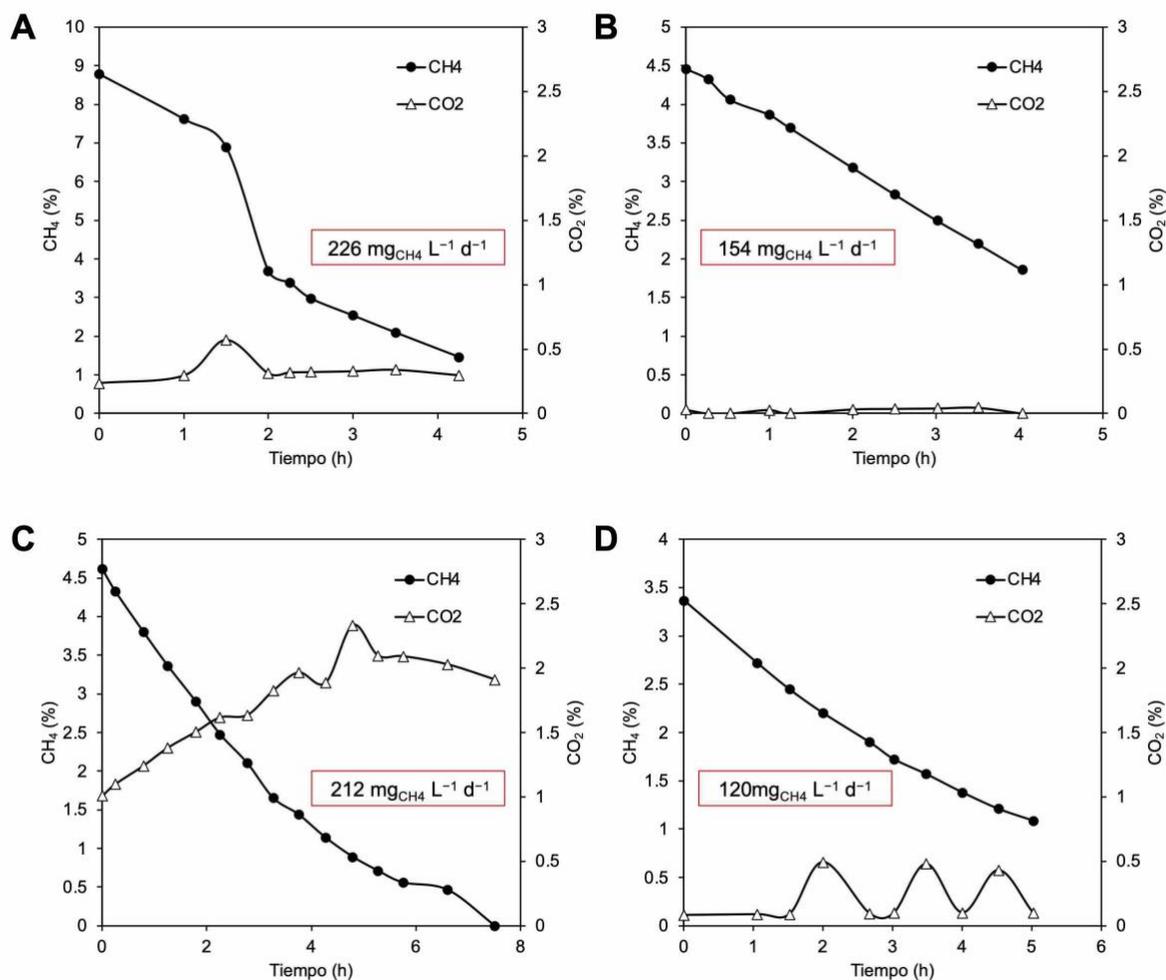
nitrógeno dependía del N del medio fresco agregado ( $14.4 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}$ ). Estas condiciones de agotamiento de nitrógeno favorecieron la acumulación de moléculas de reserva (Gorry et al., 2022), que se discutirá más adelante.



**Figura 3.11.** Biomasa producida acumulada graficada contra el nitrógeno consumido durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de  $\text{CH}_4$ . La pendiente se calculó para condiciones de suficiencia de N (hasta el día 21, a  $27.7 \text{ mg}_N \text{ L}^{-1}$ ).

El consumo de  $\text{CH}_4$  y la producción de  $\text{CO}_2$  del CMA solo (Figura 3.12A) y CMA-SO (Figura 3.12B, 3.12C y 3.12D) se utilizaron para calcular las tasas de biodegradación de  $\text{CH}_4$  en diferentes días de operación. En el día 1, la tasa de biodegradación de  $\text{CH}_4$  de CMA fue de  $262 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y de CMA-SO fue de  $251 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , similar a los experimentos previos de CMA-SO operados en lote con iluminación continua ( $258 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) y mayores que las tasas con control de pH fotónico ( $196 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Las tasas de biodegradación de  $\text{CH}_4$  específicas de CMA-SO fueron de 86 y  $37 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en los días 9 y 28, respectivamente. Aunque estas tasas fueron más bajas en comparación con las tasas al inicio del co-cultivo, las mediciones del espacio de cabeza antes de cada nuevo ciclo de alimentación con  $\text{CH}_4$  mostraron que el co-cultivo agotó todo el  $\text{CH}_4$  alimentado al sistema en menos de 10 horas, ya que no se detectó  $\text{CH}_4$  ni  $\text{CO}_2$  por CG-DCT. Las tasas volumétricas de biodegradación de  $\text{CH}_4$ , Figura 3.12, muestran que la tasa más alta

de co-cultivo fue en el noveno día ( $212 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), similar a la de CMA solo, con una tasa de biodegradación promedio de  $162 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  para todo el experimento. Las tasas alcanzadas por el co-cultivo en el FBTA fueron superiores (excepto el día 28) a las de microcosmos con 4% de  $\text{CH}_4$  y  $\text{NaNO}_3$  como fuente de N ( $136 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), demostrando el beneficio de utilizar fotobiorreactores completamente agitados para mejorar la transferencia de masa de los gases, especialmente del  $\text{CH}_4$  que es escasamente soluble.



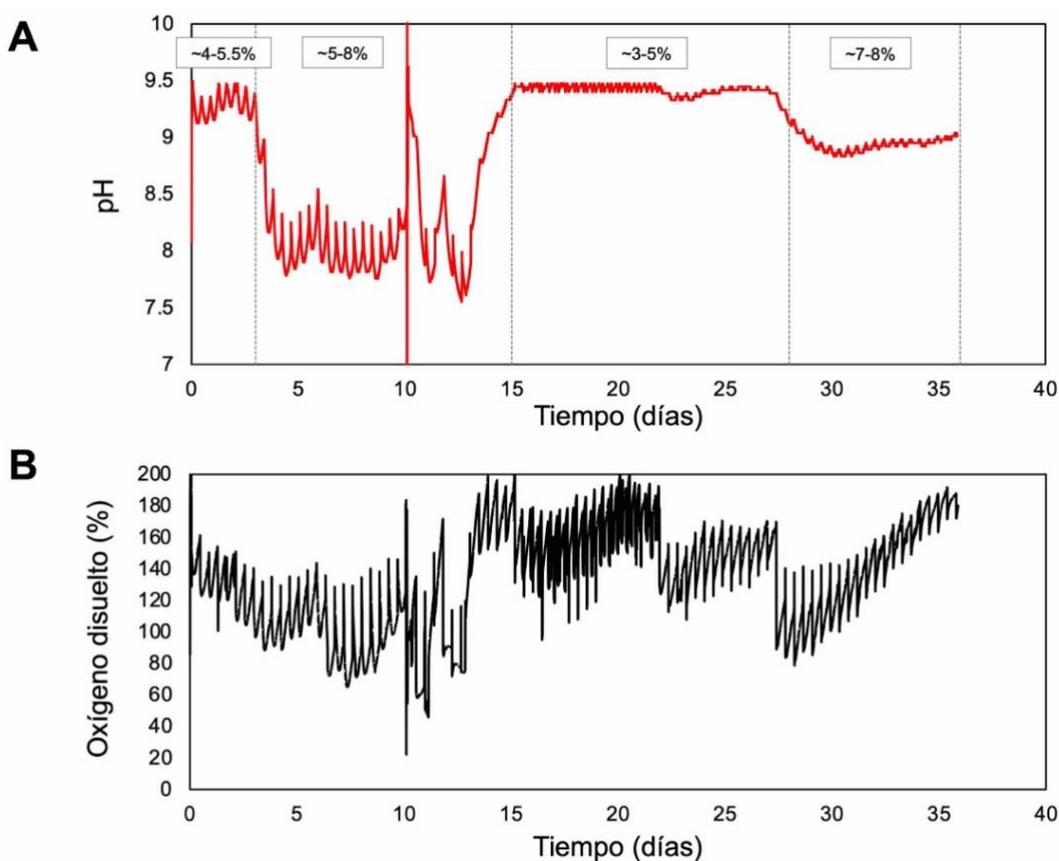
**Figura 3.12.** Composición de la fase gaseosa a lo largo del tiempo en diferentes días de operación durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de  $\text{CH}_4$ . (A) consorcio CMA solo; (B) Co-cultivo el día 1; (C) Co-cultivo el día 9; (D) Cultivo conjunto el día 28. Las tasas volumétricas de biodegradación de  $\text{CH}_4$  se indican en recuadros dentro de cada cinética.

Otros esfuerzos para desarrollar sistemas estables y robustos co-cultivos metanotróficos-microalgales siguen surgiendo. Por ejemplo, recientemente Safitri et al. (2021) construyeron un sistema de fotogranulos fototrófico-metanotróficos para la eliminación de CH<sub>4</sub> disuelto de efluentes anaeróbicos. Estos autores lograron eliminar con éxito el CH<sub>4</sub> disuelto en un reactor en continuo con eficiencias de remoción de hasta el 80%. Además, encontraron que con una mayor intensidad de mezclado podían aumentar la eficiencia de remoción hasta en un 90%, influyendo en la morfología de los fotogranulos reduciendo su tamaño y manteniendo los granulos en suspensión, como estrategia para controlar el crecimiento de las cianobacterias filamentosas. Sin embargo, el desprendimiento de biomasa como consecuencia del mezclado resultó en la obstrucción del reactor. Esto último implicó la necesidad de establecer una limpieza periódica del reactor para superar esta situación, pero con la pérdida de alrededor de un tercio o hasta la mitad de la biomasa y, por lo tanto, una disminución temporal en la eficiencia de remoción de CH<sub>4</sub>. Aunque nuestro trabajo presenta una estrategia de operación diferente (lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>), en comparación, el co-cultivo CMA-SO logró tasas volumétricas de biodegradación de CH<sub>4</sub> más altas, la más baja, de  $120 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , Figura 3.12D) fue 4.5 veces mayor ( $26.3 \pm 2.6 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomasa}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), logrando un crecimiento robusto, estabilidad y una estrategia de alimentación/control de pH fotónico que podría implementarse y escalarse fácilmente.

La Figura 3.13 muestra el pH y el OD registrados durante la operación en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>. Además, el co-cultivo se expuso a diferentes concentraciones de alimentación de CH<sub>4</sub> para probar su estabilidad, las etapas se indican en recuadros en la Figura 3.13A. Cuando la concentración de CH<sub>4</sub> estuvo por debajo del 5.5%, el pH se mantuvo entre 9.1 y 9.5 y el CO<sub>2</sub> fue insignificante en la fase gaseosa (Figura 3.12B), lo que implica que éste se consumió/retuvo en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando el sistema se alimentó con una concentración más alta de CH<sub>4</sub> (~8%), hubo una mayor producción de CO<sub>2</sub> vía metanótrofos, lo que provocó una acidificación del medio y, por lo tanto, una disminución del pH, que disminuyó a 7.8 y se mantuvo entre 7.8 y 8.5. Durante este período, y confirmado por los datos cinéticos del día 9, se detectó CO<sub>2</sub> en fase gaseosa, aumentando hasta alcanzar un máximo de 2.3% (Figura 3.12C). Posteriormente, comenzó a disminuir, lo que puede explicarse por el equilibrio CO<sub>2</sub>/carbonatos. A partir del día 14 se redujo la concentración de alimentación de CH<sub>4</sub> a 3-5% y con ello el sistema recuperó su

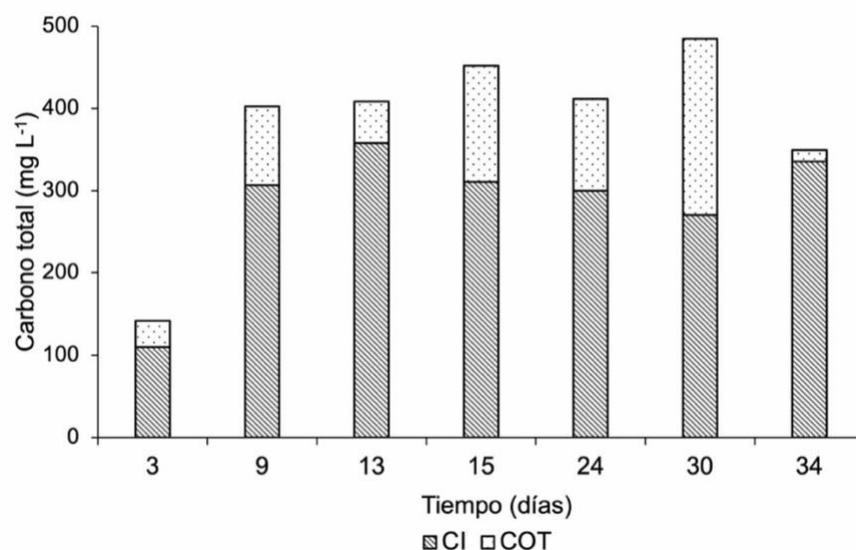
estabilidad, manteniendo el pH entre 9.4 y 9.5 mediante el control de encendido/apagado de la luz. Finalmente, desde el día 27, la concentración de alimentación de CH<sub>4</sub> se incrementó a 7-8%, mostrando una ligera caída en el pH, pero esta vez se mantuvo alrededor de 9. Además, en la Figura 3.13B se pueden observar los aumentos y descensos del oxígeno disuelto debido a la producción de O<sub>2</sub> por SO y el consumo de éste por el CMA. Nuevamente, los valores excedieron el 100% de saturación, lo cual indica que no hubo deficiencia de O<sub>2</sub> en el sistema.

A pesar de los cambios de pH provocados por la concentración de alimentación de CH<sub>4</sub>, el sistema no perdió la capacidad de oxidar CH<sub>4</sub>. Por razones de seguridad, un sistema a mayor escala debe funcionar preferiblemente por debajo del LIE de CH<sub>4</sub> para evitar riesgos de explosión. En este estudio, el período alimentado con concentraciones de 3-5% de CH<sub>4</sub> fue el más estable y permitió el control del pH fotónico.



**Figura 3.13.** Datos de pH (A) y OD (B) registrados con Arduino y concentraciones de alimentación de CH<sub>4</sub> (indicadas en la parte superior de A) durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

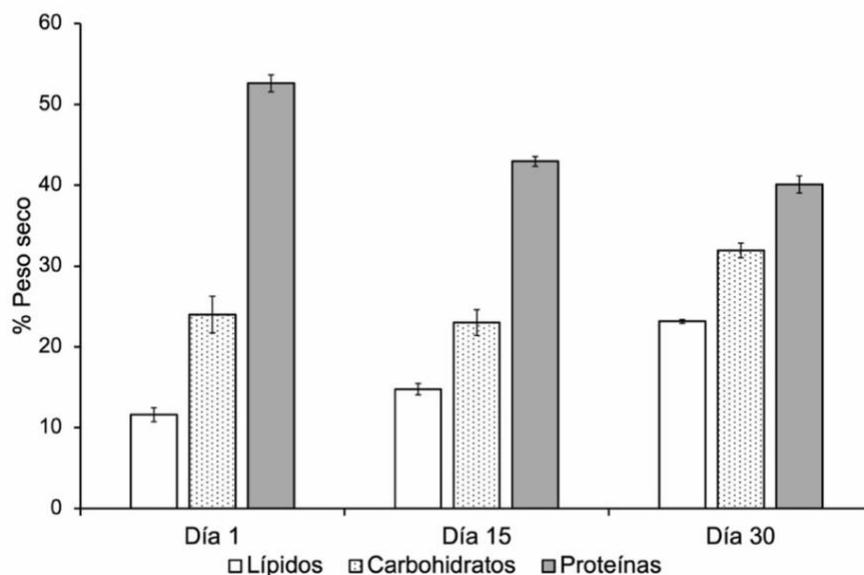
Las mediciones de carbono soluble (CT, CI y COT, ver Figura 3.14) en días seleccionados mostraron que el CT aumentó inicialmente hasta un valor de alrededor de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  después del día 9, del cual más del 75% corresponde a CI y el resto es COT. Como no se añadió materia orgánica al medio, ésta fue liberada exclusivamente por la bacteria o la microalga. Algunos estudios han demostrado que los metanótrofos pueden excretar una cantidad significativa de materia orgánica (es decir, acetato, formiato, citrato y succinato) durante la asimilación del formaldehído (Kalyuzhnaya et al., 2013b; Lee et al., 2021). Li et al. (2022) reportaron la liberación de carbono orgánico disuelto por parte de *Methylocystis bryophila*, que posteriormente fue consumido en co-cultivo por *Scenedesmus obliquus*. Estos autores encontraron que los genes relacionados con el metabolismo orgánico estaban regulados al alza, infiriendo que el acetato liberado por *M. bryophila* podría ser la principal fuente de carbono para el crecimiento mixotrófico de *S. obliquus*. Otros estudios también han reportado el crecimiento de *Scenedesmus* para la producción de lípidos o combustible con acetato como fuente de carbono (Sarat Chandra et al., 2016; Shen et al., 2015; Song et al., 2021). Los resultados en este estudio muestran una cantidad notable de carbono inorgánico retenido en el medio (máximo de  $358 \text{ mg L}^{-1}$ ) y carbono orgánico en menor proporción ( $95 \text{ mg L}^{-1}$  en promedio). El hecho de que el carbono soluble permanezca relativamente constante, a pesar del aumento de la biomasa, sugiere que se estableció un equilibrio entre las moléculas orgánicas producidas y consumidas por las altamente diversas bacterias heterótrofas del consorcio CMA y *Scenedesmus obtusiusculus*, a través del crecimiento autotrófico y heterotrófico.



**Figura 3.14.** Carbono soluble de muestras filtradas durante la operación de co-cultivo en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub>.

Se determinó la composición de la biomasa de co-cultivo para identificar posibles aplicaciones. Como se ve en la Figura 3.15, el crecimiento en el medio inicial rico en nutrientes favorece un mayor contenido de proteínas que se reduce a medida que el medio se vuelve limitado en nitrógeno. La disponibilidad limitada de nutrientes promovió la acumulación de moléculas de reserva, como carbohidratos y lípidos, alcanzando 31.9% peso seco y 23.2% peso seco, respectivamente, en el día 30. Se ha reportado previamente la producción de lípidos bajo limitación de nitrógeno de *Scenedesmus obtusiusculus*, alcanzando valores que oscilan entre 45 y 55% peso seco (Gorry et al., 2022; Toledo-Cervantes et al., 2013). Sin embargo, el contenido de lípidos del co-cultivo en este estudio fue mucho más bajo, lo que sugiere que la biomasa podría no ser adecuada para la producción de biocombustibles. En cambio, varios reportes indican que la biomasa de co-cultivo de metanótrofos y microalgas podría ser una fuente prometedora de proteína microbiana (Rasouli et al., 2018, Roberts et al., 2020). El 40-52% peso seco de proteína obtenido en este estudio hace a la biomasa de co-cultivo una candidata ideal para aplicaciones en alimentación animal y acuicultura (28-45%) (Roberts et al., 2020). En este sentido, una de las principales ventajas de la proteína microbiana es que su producción no es estacional, no requiere una gran extensión de tierra como las fuentes convencionales, además que contiene otros

nutrientes como grasas y carbohidratos que aportan valor nutricional. Sin embargo, antes de usar la biomasa para fines alimenticios, se deben realizar estudios nutricionales centrados en la digestibilidad y el perfil de aminoácidos de la biomasa del co-cultivo.



**Figura 3.15.** Composición bioquímica del co-cultivo durante la operación en lote con alimentación intermitente de  $\text{CH}_4$ .

Por último, una manera de aprovechar la biomasa producida de manera integral podría incluir estudios para la determinación y cuantificación de bioproductos como los polihidroxicanoatos o ectoína, con el fin de explorar todas las posibles aplicaciones, ya que existen varios informes en los que se han obtenido estos compuestos utilizando condiciones alcalófilas o haloalcalófilas, con rendimientos prometedores (Cantera et al., 2020; Khmelenina et al., 2015).

### **3.5. CONCLUSIONES PARCIALES**

En este capítulo se demostró que el consumo eficiente de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, con una producción de biomasa constante, puede mantenerse durante más de un mes por el co-cultivo CMA y *Scenedesmus obtusiusculus*.

El control del pH fotónico permitió la actividad continua del cultivo mixto, y no se observaron cambios significativos en la proporción de las poblaciones CMA o SO (recuento celular por citometría de flujo) durante los experimentos en lote en el FBTA (con o sin luz). Este método de control de pH se implementó fácilmente, mostró una respuesta rápida y no tiene los problemas asociados con la técnica tradicional de adiciones de ácido/base que incluye los costos y el almacenamiento de los productos químicos, el aumento de la salinidad, el efecto de dilución y las complicaciones que pueden surgir de una mezcla deficiente.

La operación en lote con alimentación intermitente permitió agotar el CH<sub>4</sub> agregado y maximizar la producción de biomasa. La operación por más de un mes mostró que la concentración de carbono orgánico e inorgánico soluble en el medio alcanzó un equilibrio entre la producción y el consumo autótrofo y heterótrofo.

La composición proximal del co-cultivo tendió a acumular materiales de reserva, como carbohidratos y lípidos, debido a la limitación de nitrógeno en el medio. Sin embargo, la composición macromolecular mostró que las proteínas fueron el producto en mayor proporción (40-52%) lo cual hace a la biomasa del co-cultivo una excelente candidata para su aplicación como proteína microbiana para uso en alimentación animal y en acuicultura.

### **3.6. RECOMENDACIONES**

Los resultados en este capítulo muestran que el proceso podría mejorarse: 1) Agregando sensores en línea específicos (carbonatos, nitratos). 2) Automatizando la adición de CH<sub>4</sub>. 3) Mediante la regulación avanzada de la intensidad de la luz para maximizar las actividades metanotróficas y fotoautotróficas. 4) Modulando la composición de la biomasa mediante la adición regulada del medio de cultivo (medio concentrado o limitado en nutrientes como el N, según el fin deseado).

# CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

## 4.1. CONCLUSIONES

Se implementó y evaluó con éxito un co-cultivo de bacterias metanótrofas alcalófilas y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* para la mitigación simultánea de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en un solo sistema. Se logró el consumo/retención completa del carbono proveniente de estos GEI que tienen un mayor aporte al cambio climático.

La selección de bacterias metanotróficas alcalófilas se presentó como un enfoque atractivo y exitoso, ya que las condiciones de cultivo (pH alcalino) favorecieron la retención del CO<sub>2</sub> producido en el medio líquido como carbonatos, evitando ser liberado del sistema, y funcionando como fuente de carbono para las microalgas.

Los experimentos en microcosmos ayudaron a establecer las principales condiciones operativas como la proporción de inóculo inicial, fuente de nitrógeno y concentración de CH<sub>4</sub> inicial (Ruiz-Ruiz et al., 2020), las cuales sirvieron para determinar las mejores tasas de consumo de los gases y observar la tendencia y evolución global de los co-cultivos. Las mejores condiciones para el par CMA-SO fueron una proporción de inóculo inicial de 3:1, NaNO<sub>3</sub> como fuente de N y las tasas más altas de consumo se obtuvieron con una concentración inicial de CH<sub>4</sub> de 8%, sin embargo, por razones de seguridad, un sistema a mayor escala debe operar a concentraciones por debajo del LIE de CH<sub>4</sub> (5%) para evitar riesgos de explosividad.

El control de pH fotónico se implementó fácilmente cuando se evaluó al co-cultivo en un fotobiorreactor de tanque agitado, mostrando una respuesta rápida y evitando el aumento de la salinidad, el volumen efectivo y los costos asociados al enfoque tradicional para el control del pH que involucra la adición de álcalis y ácidos (Ruiz-Ruiz et al., 2023).

La operación en lote con alimentación intermitente de CH<sub>4</sub> resultó una estrategia exitosa para maximizar la producción de biomasa y el consumo eficiente de CH<sub>4</sub> (Ruiz-Ruiz et al., 2023). Dentro de los trabajos existentes sobre co-cultivos de metanótrofos y microalgas, este es el

primero que reporta la estrategia de alimentación intermitente de CH<sub>4</sub> logrando un sistema robusto y estable por más de un mes.

La composición bioquímica del co-cultivo tendió a acumular materiales de reserva, como carbohidratos y lípidos, asociado a la limitación de nitrógeno en el medio, sin embargo, el contenido de proteínas fue el producto en mayor proporción. El 40-52% peso seco de proteína obtenido en este estudio hace a la biomasa de co-cultivo una candidata ideal para aplicaciones en alimentación animal y acuicultura.

Las estrategias de operación y las condiciones de cultivo presentadas en este trabajo dieron como resultado un sistema exitoso, robusto y estable para la mitigación de GEI, con cero descargas de carbono en la fase gas y generación de biomasa con potencial para distintas aplicaciones. Los resultados aquí presentados aportan información relevante para la literatura en este campo, que todavía es escasa.

## 4.2. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio mostraron que el proceso podría mejorarse probando nuevas configuraciones de reactores para mejorar la transferencia de los gases a la fase líquida, con la automatización de la adición de CH<sub>4</sub> y sistemas de control con sensores en línea (por ejemplo, carbonatos y nitratos) en respuesta al dinamismo del sistema.

Se recomienda continuar los esfuerzos para dar seguimiento las poblaciones individuales dentro del co-cultivo. Si bien, la técnica de citometría de flujo y el conteo celular resultaron estrategias útiles, es necesario establecer metodologías que complementen y permitan rastrear de manera puntual al crecimiento de cada grupo microbiano. Una manera de lograrlo podría ser con sensores en línea para monitorear la densidad óptica a distintas longitudes de onda (por ejemplo, a 450-475 nm para las microalgas y 600 nm para las bacterias) y con ello observar el crecimiento individual de cada población.

En este trabajo se utilizaron corrientes sintéticas de metano/aire. Para estudios posteriores se recomienda utilizar corrientes reales; para el gas, biogás o metano desorbido de efluentes anaerobios, y como medio de cultivo, efluentes líquidos provenientes del tratamiento de aguas residuales. De esta manera, esta tecnología podría aplicarse al enfoque de economía circular para la recuperación y valorización de residuos.

Se recomienda estudiar las condiciones y estrategias establecidas en este estudio a otros pares metanotróficos-microalgales similares, es decir, microorganismos que crezcan como células libres y permitan mantener las células en suspensión. Algunos ejemplos incluyen cepas metanotróficas axénicas del grupo de investigación como *Methylomonas methanica*, *Methylobacterium organophilum* y *Methylocystis hirsuta* en combinación con microalgas como *Synechococcus* o *Chlorella*.

## 5. REFERENCIAS

- Acuña, M.E., Pérez, F., Auria, R., Revah, S., 1999. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng* 63, 175–184. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990420\)63:2<175::AID-BIT6>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990420)63:2<175::AID-BIT6>3.0.CO;2-G)
- Abbasi, T., Tauseef, S.M., Abbasi, S.A., 2012. Anaerobic digestion for global warming control and energy generation - An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.046>
- Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Grima, E.M., 2016. Supply of CO<sub>2</sub> to closed and open photobioreactors, in: *Microalgal production for biomass and high-value products*. pp. 14–21.
- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J.C., Erable, B., 2019. Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A review. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>
- AlSayed, A., Fergala, A., Eldyasti, A., 2018. Sustainable biogas mitigation and value-added resources recovery using methanotrophs intergrated into wastewater treatment plants, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9464-3>
- Andersen, R. A., 2013. The microalgal cell. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*, 2nd edn. Wiley, Oxford, 1-20.
- Antony, C.P., Kumaresan, D., Ferrando, L., Boden, R., Moussard, H., Fernández Scavino, A., Shouche, Y.S., Murrell, J.C., 2010. Active methylotrophs in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem formed by meteor impact. *ISME J* 4, 1470–1480. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.70>
- Anusree, V.M., Sujitha, B.S., Anand, J., Arumugam, M., 2017. Dissolved inorganic carbonate sustain the growth, lipid and biomass yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition. *Indian Journal of Experimental Biology* 55, 702–710.
- Asmamaw, T., Fassil, A., 2014. Co-culture: A great promising method in single cell protein production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 9, 12–20. <https://doi.org/10.5897/BMBR2014.0223>
- Badr, K., He, Q.P., Wang, J., 2022. A novel semi-structured kinetic model of methanotroph-photoautotroph cocultures for biogas conversion. *Chemical Engineering Journal* 431. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133461>
- Badr, K., Hilliard, M., Roberts, N., Peter He, Q., Wang, J., 2019. Photoautotroph-methanotroph coculture - A flexible platform for efficient biological CO<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub> co-utilization, in: *IFAC-PapersOnLine*. Elsevier B.V., pp. 916–921. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.179>
- Barbosa, J.M., Rossi, R.A.S., Andrade, L.A., Barrozo, M.A.S., Vieira, L.G.M., 2021. A study of optimization of solar pyrolysis and catalyst recovery and reuse. *Energy Convers Manag* 237. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114094>
- Bekun, F.V., Alola, A.A., Sarkodie, S.A., 2019. Toward a sustainable environment: nexus between CO<sub>2</sub> emissions, resource rent, renewable and nonrenewable energy in 16-EU countries. *Sci. Total Environ.* 657, 1023–1029. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.104>
- Boden, R., 2012. Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1644–1646. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033639-0>

Bowman, J.P., 2006. The methanotrophs - the families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: Dworkin, M. (ed) The prokaryotes. Springer, New York, N.Y., pp 266–289.

Bowman, J.P., 2016. Methylococcaceae, in: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00225.pub2>

British Petroleum, 2018. BP Statistical Review of World Energy 1–56.

Cabello, J., Morales, M., Revah, S., 2014. Dynamic photosynthetic response of the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* to light intensity perturbations. Chemical Engineering Journal 252, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.073>

Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. Bioresour Technol 181, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>

Cabrol, L., Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. Appl Microbiol Biotechnol 90, 837–849. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3191-9>

Cantera, S., Lebrero, R., García-Encina, P. a., Muñoz, R., 2016. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. J Environ Manage 171, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.002>

Cantera, S., Phandanouvong-Lozano, V., Pascual, C., García-Encina, P.A., Lebrero, R., Hay, A., Muñoz, R., 2020. A systematic comparison of ectoine production from upgraded biogas using *Methylomicrobium alcaliphilum* and a mixed haloalkaliphilic consortium. Waste Manag 102, 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.043>

Cantera, S., Sánchez-Andrea, I., Sadornil, L.J., García-Encina, P.A., Stams, A.J.M., Muñoz, R., 2019. Novel haloalkaliphilic methanotrophic bacteria: An attempt for enhancing methane bio-refinery. J Environ Manage 231, 1091–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.017>

Cárdenas, B., Revah, S., Hernández, J., 2003. Tratamiento biológico de compuestos orgánicos volátiles de fuentes fijas, INE-Semarnat, México.

Chacón-Lee, T.L., González-Mariño, G.E., 2010. Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges. Compr Rev Food Sci Food Saf 9, 655–675. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x>

Chi, Z., O’Fallon, J. V, Chen, S., 2011. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. Trends Biotechnol 29, 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>

Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Quéré, C. Le, Myneni, R.B., Piao, S., P. Thornton, 2013. Carbon and other biogeochemical cycles, in: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, pp. 465–570.

Dodds, W., 2002. Freshwater ecology: concepts and environmental applications. Elsevier.

Dlugokencky, E., 2022. NOAA/ESRL URL. [https://gml.noaa.gov/ccgg/trends\\_ch4/](https://gml.noaa.gov/ccgg/trends_ch4/) Acceso 15/02/2023

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28, 350–356.

- Dusenge, M.E., Duarte, A.G., Way, D.A., 2019. Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO<sub>2</sub> and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytologist* 221, 32–49. <https://doi.org/10.1111/nph.15283>
- Estrada, J.M., Lebrero, R., Quijano, G., Perez, R., Figueroa-Gonzalez, I., Garcia-Encina, P.A., Munoz, R. (2014) Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations. *Chemical Engineering Journal* 253, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.053>
- Estrada-Graf, A., Hernández, S., Morales, M., 2020. Biomitigation of CO<sub>2</sub> from flue gas by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM a hybrid photobioreactor coupled to a biomass recovery stage by electro-coagulation-flotation. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 28561–2857. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08240-2>
- García-Pérez, T., López, J.C., Passos, F., Lebrero, R., Revah, S., Muñoz, R., 2018. Simultaneous methane abatement and PHB production by *Methylocystis hirsuta* in a novel gas-recycling bubble column bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 334, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.106>
- González-González, L.M., De-Bashan, L.E., 2021. Toward the enhancement of microalgal metabolite production through microalgae–bacteria consortia†. *Biology (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/biology10040282>
- Gorry, P.L., Ángeles, R., Revah, S., Morales-Ibarria, M., 2022. Effect of nitrogen feast–famine cycles and semi-continuous cultivation on the productivity of energy-rich compounds by *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 97, 1506–1516. <https://doi.org/10.1002/jctb.6987>
- Gutierrez, J., Kwan, T.A., Zimmerman, J.B., Peccia, J., 2016. Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. *Algal Res* 19, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.016>
- Han, B., Chen, Y., Abell, G., Jiang, H., Bodrossy, L., Zhao, J., Murrell, J.C., Xing, X.H., 2009. Diversity and activity of methanotrophs in alkaline soil from a Chinese coal mine. *FEMS Microbiol Ecol* 70, 196–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00707.x>
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiol Rev* 60, 439–471.
- Haubrichs, R., Widmann, R., 2006. Evaluation of aerated biofilter systems for microbial methane oxidation of poor landfill gas. *Waste Manag.* 26, 408–416.
- Hays, S.G., Patrick, W.G., Ziesack, M., Oxman, N., Silver, P.A., 2015. Better together: Engineering and application of microbial symbioses. *Curr Opin Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.008>
- He, D., Zhang, L., Dumont, M.G., He, J.S., Ren, L., Chu, H., 2019. The response of methanotrophs to additions of either ammonium, nitrate or urea in alpine swamp meadow soil as revealed by stable isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol* 95. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz077>
- Hill, E.A., Chrisler, W.B., Beliaev, A.S., Bernstein, H.C., 2017a. A flexible microbial co-culture platform for simultaneous utilization of methane and carbon dioxide from gas feedstocks. *Bioresour Technol* 228, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.111>
- Ho, A., De Roy, K., Thas, O., De Neve, J., Hoefman, S., Vandamme, P., Heylen, K., Boon, N., 2014a. The more, the merrier: Heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *ISME Journal* 8, 1945–1948. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.74>
- Hoefman, S., Van Der Ha, D., Boon, N., Vandamme, P., De Vos, P., Heylen, K., 2014. Niche differentiation in nitrogen metabolism among methanotrophs within an operational taxonomic unit. *BMC Microbiol* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-83>

Hoegh-Guldberg, O., Jacob, D., Taylor, M., Bindi, M., Brown, S., Camilloni, I., Diedhiou, A., Djalante, R., Ebi, K.L., Engelbrecht, F., Guiot, J., Hijjoka, Y., Mehrotra, S., Payne, A., Seneviratne, S.I., Thomas, A., Warren, R., Zhou, G., 2018. Impacts of 1.5°C global warming on natural and human systems, in: Global Warming of 1.5 °C an IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5 °C above Pre-Industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change. pp. 175–311.

House, J.I., Prentice, I.C., Jackson, S.T., Mace, G.M., Dawson, T.P., 2011. Beyond Predictions: Biodiversity Conservation in a Changing Climate. *Science* (1979) 332, 53–58. <https://doi.org/10.1126/science.1200303>

Iguchi, H., Yurimoto, H., Sakai, Y., 2011. Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Appl Environ Microbiol* 77, 8509–8515. <https://doi.org/10.1128/AEM.05834-11>

IPCC, 2014. Climate change 2014: Synthesis report, in: Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–112.

IPCC, 2022: Climate Change 2022: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [P.R. Shukla, J. Skea, R. Slade, A. Al Khouradajie, R. van Diemen, D. McCollum, M. Pathak, S. Some, P. Vyas, R. Fradera, M. Belkacemi, A. Hasija, G. Lisboa, S. Luz, J. Malley, (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA.

Jeong, S.Y., Kim, T.G., 2019. Development of a novel methanotrophic process with the helper micro-organism *Hyphomicrobium* sp. NM3. *J Appl Microbiol* 126, 534–544. <https://doi.org/10.1111/jam.14140>

Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T.J., Murrell, J.C., Xing, X.H., 2010. Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem Eng J*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.003>

Kalyuzhnaya, M.G., Khmelenina, V., Eshinimaev, B., Sorokin, D., Fuse, H., Lidstrom, M., Trotsenko, Y., 2008. Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylomicrobium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylomicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 591–596. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65317-0>

Kalyuzhnaya, M.G., Puri, A.W., Lidstrom, M.E., 2015. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metab Eng* 29, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>

Kalyuzhnaya, M.G., Xing, X.H., 2018. Methane biocatalysis: Paving the way to sustainability, *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5>

Kalyuzhnaya, M.G., Yang, S., Rozova, O.N., Smalley, N.E., Clubb, J., Lamb, A., Gowda, G.A.N., Raftery, D., Fu, Y., Bringel, F., Vuilleumier, S., Beck, D.A.C., Trotsenko, Y.A., Khmelenina, V.N., Lidstrom, M.E., 2013. Highly efficient methane biocatalysis revealed in a methanotrophic bacterium. *Nat Commun* 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms3785>

Kelly, D.P., McDonald, I.R., Wood, A.P., 2014. The Family Methylobacteriaceae. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 313–340.

Kelly, D.P., Wood, A.P., 2010. Isolation and characterization of methanotrophs and methylotrophs: diversity of methylotrophic organisms and of one-carbon substrates, in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. pp. 3827–3845.

- Khabiri, B., Ferdowsi, M., Buelna, G., Jones, J.P., Heitz, M., 2021. Bioelimination of low methane concentrations emitted from wastewater treatment plants: a review. *Crit Rev Biotechnol* 0, 1–18. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1940830>
- Khanongnuch, R., Abubackar, H.N., Keskin, T., Gungormusler, M., Duman, G., Aggarwal, A., Behera, S.K., Li, L., Bayar, B., Rene, E.R., 2022. Bioprocesses for resource recovery from waste gases: Current trends and industrial applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 156. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111926>
- Khmelenina, V.N., Rozova, O.N., But, S.Y., Mustakhimov, I.I., Reshetnikov, A.S., Beschastnyi, A.P., Trotsenko, Y.A., 2015. Biosynthesis of secondary metabolites in methanotrophs: Biochemical and genetic aspects (review). *Appl Biochem Microbiol* 51, 150–158. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020088>
- Klinthong, W., Yang, Y.H., Huang, C.H., Tan, C.S., 2015. A Review: Microalgae and their applications in CO<sub>2</sub> capture and renewable energy. *Aerosol Air Qual Res.* <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>
- Kraakman, N.J.R., Rocha-Rios, J., Van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 873–886. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3365-5>
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C., Thakur, I.S., 2018. Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresour Technol* 247, 1059–1068.
- Lebrero, R., Volckaert, D., Pérez, R., Muñoz, R., Van Langenhove, H., 2013. A membrane bioreactor for the simultaneous treatment of acetone, toluene, limonene and hexane at trace level concentrations. *Water Res* 47, 2199–2212. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.041>
- Lee, H., Baek, J.I., Lee, J.Y., Jeong, J., Kim, H., Lee, D.H., Kim, D.M., Lee, S.G., 2021. Syntrophic co-culture of a methanotroph and heterotroph for the efficient conversion of methane to mevalonate. *Metab Eng* 67, 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.07.008>
- Li, X., Lu, Y., Li, N., Wang, Y., Yu, R., Zhu, G., Zeng, R.J., 2022. Mixotrophic Cultivation of Microalgae Using Biogas as the Substrate. *Environ Sci Technol* 56, 3669–3677. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06831>
- López, J.C., Quijano, G., Souza, T.S.O., Estrada, J.M., Lebrero, R., Muñoz, R., 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: State of the art and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 2277–2303. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- Loulergue, L., Schilt, A., Spahni, R., Masson-Delmotte, V., Blunier, T., Lemieux, B., Barnola, J.M., Raynaud, D., Stocker, T.F., Chappellaz, J., 2008. Orbital and millennial-scale features of atmospheric CH<sub>4</sub> over the past 800,000 years. *Nature* 453, 383–386. <https://doi.org/10.1038/nature06950>
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–272.
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., Stocker, T.F., 2008. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature* 453, 379–382. <https://doi.org/10.1038/nature06949>
- Mandal, S., Shurin, J.B., Efroymsen, R.A., Mathews, T.J., 2018. Functional divergence in nitrogen uptake rates explains diversity–productivity relationship in microalgal communities. *Ecosphere* 9. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2228>
- Martínez-Macías, R., Meza-Escalante, E., Serrano-Palacios, D., Gortáres-Moroyoqui, P., Ruíz-Ruíz, P.E., Ulloa-Mercado, G., 2018. Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown

in different culture media to high-value products. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 93, 585–590. <https://doi.org/10.1002/jctb.5405>

Meinshausen, M., Meinshausen, N., Hare, W., Raper, S.C.B., Frieler, K., Knutti, R., Frame, D.J., Allen, M.R., 2009. Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2°C. *Nature* 458, 1158–1162. <https://doi.org/10.1038/nature08017>

Miroshnikov, K.K., Belova, S.E. & Dedysh, S.N. Genomic Determinants of Phototrophy in Methanotrophic Alphaproteobacteria. *Microbiology* 88, 548–555 (2019). <https://doi.org/10.1134/S0026261719050102>

Mishra, S.K., Suh, W.I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J.W., 2014. Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresour Technol* 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>

Morales, M., Cabello, J., Revah, S., 2015. Gas balances and growth in algal cultures, in: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.), *Algal Biorefineries*. Springer International Publishing Inc., Switzerland, pp. 263–314.

Morales, M., Sánchez, L., Revah, S., 2017. The impact of environmental factors on CO<sub>2</sub> fixation by microalgae. *FEMS Microbiol Lett* 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx262>

Mühlemeier, I.M., Speight, R., Strong, P.J. (2018). *Biogas, Bioreactors and Bacterial Methane Oxidation*. In: Kalyuzhnaya, M., Xing, XH. (eds) *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_14)

Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F.-M., Collins, W., Fuglestedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J.-F., Lee, D., Mendoza, B., Nakajima, T., Robock, A., Stephens, G., Takemura, T., Zhan, H., 2013. Anthropogenic and Natural Radiative Forcing, in: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Midgley, Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, pp. 659–740.

Nayak, M., Rath, S.S., Thirunavoukkarasu, M., Panda, P.K., Mishra, B.K., Mohanty, R.C., 2013. Maximizing biomass productivity and CO<sub>2</sub> biofixation of microalga, *Scenedesmus* sp. By using sodium hydroxide. *J Microbiol Biotechnol* 23, 1260–1268. <https://doi.org/10.4014/jmb.1302.02044>

Nikiema, J., Brzezinski, R., Heitz, M., 2007. Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 6, 261–284.

Noyola, A., Padilla-Rivera, A., Morgan-Sagastume, J.M., Güereca, L.P., Hernández-Padilla, F., 2012. Typology of municipal wastewater treatment technologies in Latin America. *Clean - Soil, Air, Water* 40, 926–932.

Nyerges, G., Stein, L.Y., 2009. Ammonia cometabolism and product inhibition vary considerably among species of methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 297, 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01674.x>

Op den Camp, H.J.M., Islam, T., Stott, M.B., Harhangi, H.R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M.S.M., Birkeland, N.K., Pol, A., Dunfield, P.F., 2009. Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environ Microbiol Rep* 1, 293–306. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x>

Pan, J., Wang, X., Cao, A., Zhao, G., Zhou, C., 2019. Screening methane-oxidizing bacteria from municipal solid waste landfills and simulating their effects on methane and ammonia reduction. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 37082–37091. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06545-5>

- Park, J., Jin, H.F., Lim, B.R., Park, K.Y., Lee, K., 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 101, 8649–8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Patel, S.K.S., Kalia, V.C., Joo, J.B., Kang, Y.C., Lee, J.K., 2020. Biotransformation of methane into methanol by methanotrophs immobilized on coconut coir. *Bioresour Technol* 297, 122433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122433>
- Patel, S.K.S., Kumar, V., Mardina, P., Li, J., Lestari, R., Kalia, V.C., Lee, J.K., 2018. Methanol production from simulated biogas mixtures by co-immobilized *Methylomonas methanica* and *Methylocella tundrae*. *Bioresour Technol* 263, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.096>
- Rashid, N., Park, W.K., Selvaratnam, T., 2018. Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and biofloculation. *Chemosphere* 194, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.108>
- Rasouli, Z., Valverde-Pérez, B., D'Este, M., de Francisci, D., Angelidaki, I., 2018. Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs. *Biochem Eng J* 134, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.010>
- Ray, A., Nayak, M., Ghosh, A., 2022. A review on co-culturing of microalgae: A greener strategy towards sustainable biofuels production. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149765>
- Rendón Castrillón, L.J., Ramírez Carmona, M.E., Vélez Salazar, Y., 2015. *Microalgas para la industria alimenticia*, Primera. ed, Editorial Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.
- Roberts, N., Hilliard, M., He, Q.P., Wang, J., 2020. A Microalgae-Methanotroph Coculture is a Promising Platform for Fuels and Chemical Production From Wastewater. *Front Energy Res* 8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.563352>
- Rocha-Rios, J., Bordel, S., Hernández, S., Revah, S., 2009. Methane degradation in two-phase partition bioreactors. *Chemical Engineering Journal* 152, 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.028>
- Rocha-Rios, J., Muñoz, R., Revah, S., 2010. Effect of silicone oil fraction and stirring rate on methane degradation in a stirred tank reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 314–319. <https://doi.org/10.1002/jctb.2339>
- Rocha-Rios, J., Quijano, G., Thalasso, F., Revah, S., Muñoz, R., 2011. Methane biodegradation in a two-phase partition internal loop airlift reactor with gas recirculation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86, 353–360. <https://doi.org/10.1002/jctb.2523>
- Ruiz-Ruiz, P., Estrada, A., & Morales, M. (2020). Carbon dioxide capture and utilization using microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 185-206). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818536-0.00008-7>
- Safitri, A.S., Hamelin, J., Kommedal, R., Milferstedt, K., 2021. Engineered methanotrophic syntrophy in photogranule communities removes dissolved methane. *Water Res X* 12. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2021.100106>
- Sánchez-García, L., Cabello, J., Jiménez-García, L. F., Revah, S., & Morales-Ibarría, M. (2020). Enhancing the lipid content of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM by controlled acidification under indoor and outdoor conditions. *Algal Res*, 51, 102024 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102024>

- Sarat Chandra, T., Deepak, R.S., Maneesh Kumar, M., Mukherji, S., Chauhan, V.S., Sarada, R., Mudliar, S.N., 2016. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresour Technol* 207, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.044>
- Schaum, C.E., Barton, S., Bestion, E., Buckling, A., Garcia-Carreras, B., Lopez, P., Lowe, C., Pawar, S., Smirnof, N., Trimmer, M., Yvon-Durocher, G., 2017. Adaptation of phytoplankton to a decade of experimental warming linked to increased photosynthesis. *Nat Ecol Evol* 1. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0094>
- Semrau, J.D., Dispirito, A. a., Yoon, S., 2010. Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev* 34, 496–531.
- Sforza, E., Pastore, M., Franke, S.M., Barbera, E., 2020. Modeling the oxygen inhibition in microalgae: An experimental approach based on photorespirometry. *N Biotechnol* 59, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.06.003>
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M.Z., Nawaz, S., Asraful Alam, M., Mehmood, M.A., 2020. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of the Total Environment* 704, 135303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>
- Shen, X.F., Liu, J.J., Chu, F.F., Lam, P.K.S., Zeng, R.J., 2015. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation. *Appl Energy* 158, 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.08.057>
- Singh, R., Ryu, J., Kim, S.W., 2019. Microbial consortia including methanotrophs: some benefits of living together. *Journal of Microbiology* 57, 939–952. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9328-8>
- Skianes K, Knutsen G, Kallquist T (2008) H<sub>2</sub> production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design. *Int J Hydrog Energy*. (33) 511-521. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.09.040>
- Song, Y., Wang, X., Cui, H., Ji, C., Xue, J., Jia, X., Ma, R., Li, R., 2021. Enhancing growth and oil accumulation of a palmitoleic acid-rich *Scenedesmus obliquus* in mixotrophic cultivation with acetate and its potential for ammonium-containing wastewater purification and biodiesel production. *J Environ Manage* 297. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113273>
- Steel, K.M., Alizadehesari, K., Balucan, R.D., Bašić, B., 2013. Conversion of CO<sub>2</sub> into mineral carbonates using a regenerable buffer to control solution pH. *Fuel* 111, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.033>
- Stein, L. Y., 2018. Proteobacterial methanotrophs, methylotrophs, and nitrogen. In: *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability*, eds M. Kalyuzhnaya and X. H. Xing (Cham: Springer), 57–66. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_4)
- Stein, L.Y., Roy, R., Dunfield, P.F., 2012. Aerobic Methanotrophy and Nitrification: Processes and Connections. eLS. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022213>
- Stock, M., Hoefman, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., De Vos, P., De Baets, B., Heylen, K., Waegeman, W., 2013. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs. *Res Microbiol* 164, 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.08.006>
- Strong, P.J., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., Clarke, W.P., 2016. A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresour Technol* 215, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.099>

- Tays, C., Guarnieri, M.T., Sauvageau, D., Stein, L.Y., 2018. Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02239>
- Toledo-Cervantes, A., 2013. Estudio de la acumulación de lípidos en una microalga aislada de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Toledo-Cervantes, A., Madrid-Chirinos, C., Cantera, S., Lebrero, R., Muñoz, R., 2017. Influence of the gas-liquid flow configuration in the absorption column on photosynthetic biogas upgrading in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresour Technol* 225, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.087>
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour Technol* 130, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R.J., Estrada-Alvarado, I., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., Dendooven, L., Marsch, R., 2009. Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13, 609–621. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0244-4>
- Van Der Ha, D., Bundervoet, B., Verstraete, W., Boon, N., 2011. A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of methane oxidizing communities and microalgae. *Water Res* 45, 2845–2854. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.005>
- Van Der Ha, D., Nachtergaele, L., Kerckhof, F.M., Rameiyanti, D., Bossier, P., Verstraete, W., Boon, N., 2012. Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria. *Environ Sci Technol* 46, 13425–13431. <https://doi.org/10.1021/es303929s>
- Veraart, A.J., Garbeva, P., van Beersum, F., Ho, A., Hordijk, C.A., Meima-Franke, M., Zweers, A.J., Bodelier, P.L.E., 2018. Living apart together - Bacterial volatiles influence methanotrophic growth and activity. *ISME Journal* 12, 1163–1166. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0055-7>
- Webb, H.K., Ng, H.J., Ivanova, E.P., 2014. The family Methylocystaceae, in: *The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 341–347. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_254](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_254)
- Wobbe, L., Remacle, C., 2014. Improving the sunlight-to-biomass conversion efficiency in microalgal biofactories. *J Biotechnol* 201, 28–42.
- Yang, N., Lü, F., He, P., Shao, L., 2011. Response of methanotrophs and methane oxidation on ammonium application in landfill soils. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 1073–1082. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3389-x>
- Yang, Y., Tong, T., Chen, J., Liu, Y., Xie, S., 2020. Ammonium impacts methane oxidation and methanotrophic community in freshwater sediment. *Front Bioeng Biotechnol* 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00250>
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P.N.L., Tay, J.H., 2020. Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 118, 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>
- Zheng, Y., Zhang, L.M., He, J.Z., 2013. Immediate effects of nitrogen, phosphorus, and potassium amendments on the methanotrophic activity and abundance in a Chinese paddy soil under short-term incubation experiment. *J Soils Sediments* 13, 189–196. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0601-2>

Zúñiga, C., Morales, M., le Borgne, S., Revah, S., 2011. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. J Hazard Mater 190, 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.011>

Zúñiga, C., Morales, M., Revah, S., 2013. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. Bioresour Technol 129, 686–689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.120>

## **6. ANEXOS**

### **ANEXO 1. CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES POR EL MÉTODO DE DUBOIS**

Para cuantificar los carbohidratos totales se utiliza el método colorimétrico de Dubois et al., (1956), ya que es poco sensible a la interferencia por proteínas y el color producido es muy estable.

#### ***Procesamiento de muestras líquidas***

Para muestras frescas se utiliza 1 mL de cultivo (V1) con concentración de biomasa conocida, el cual se centrifuga a 4000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y a la pastilla celular se resuspende en 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, agitando en vortex hasta homogenizar. Posteriormente se coloca a baño maría a 100°C durante 20 minutos para llevar a cabo una hidrólisis ácida. Se debe tener cuidado de que el tubo utilizado este bien cerrado para evitar evaporación del hidrolizado. Al término se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos y se mide el volumen de hidrolizado recuperado (V2).

El extracto ácido es utilizado para la cuantificación de carbohidratos totales mediante la metodología de Dubois.

#### ***Procesamiento de muestras sólidas***

En caso de tratarse de muestra de biomasa seca, pesar de 10-20 mg de la muestra y resuspender en 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M como se indicó la técnica. Posteriormente se coloca a baño maría a 100°C durante 20 minutos para llevar a cabo una hidrólisis ácida. Se debe tener cuidado de que el tubo utilizado este bien cerrado para evitar evaporación del hidrolizado. Al término se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos y se mide el volumen de hidrolizado (V2) recuperado.

El extracto ácido es utilizado para la cuantificación de carbohidratos totales mediante la metodología de Dubois.

\* **Nota:** Realizar diluciones correspondientes con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M para que la medición de absorbancia se encuentre en el rango de la curva estándar.

### ***Curva estándar***

Para la realización de la curva estándar, se debe preparar una solución patrón de glucosa a 100 µg/mL. Para lo cual se pesan 0.01g (10mg) de glucosa, y se afora a 100mL con agua destilada.

De la solución patrón, se hacen las diluciones descritas en la tabla 1, en tubos de 2mL (Eppendorf). Todos los puntos deberán realizarse por triplicado.

**Tabla 1. Preparación de la curva de calibración**

<b>Tubo</b>	<b>Volumen solución patrón</b>	<b>Volumen agua destilada</b>	<b>Volumen total</b>	<b>Concentración de Glucosa</b>	<b>Absorbancia (485 nm)</b>
Blanco	0 µL	2000 µL	2000 µL	0 µg/mL (Blanco)	
1	400 µL	1600 µL	2000 µL	20 µg/mL	
2	800 µL	1200 µL	2000 µL	40 µg/mL	
3	1200 µL	800 µL	2000 µL	60 µg/mL	
4	1600 µL	400 µL	2000 µL	80 µg/mL	
5	2000 µL	0 µL	2000 µL	100 µg/mL	

Una vez realizadas las diluciones y mezclas en vórtex, se lleva a cabo la metodología de Dubois. Los datos de la Tabla 1 se grafican y se ajustan, utilizando el método de mínimos cuadrados, a una ecuación lineal obteniendo la R<sup>2</sup> y el valor de la pendiente (m). Donde R<sup>2</sup>>0.98, en caso de obtenerse un valor inferior deberá preparar nuevamente la curva.

### ***Metodología de Dubois***

1. En un tubo de ensaye de al menos 5 mL, agregar 500 µL de la muestra.

2. Posteriormente agregar 500  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de fenol al 5% (p/v), posteriormente agitar ligeramente.
3. Dejar la muestra 40 min en reposo.
4. Terminado el tiempo, adicionar 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado de manera lenta por las paredes (evitar ebullición excesiva) y agitar en el vortex usando pinzas para tubo de ensaye.
5. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y medir la absorbancia a una longitud de onda de 485 nm.

\* **Nota:** Utilizar 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M como blanco y seguir los puntos 2-5.

### ***Cálculos***

A partir de la curva de patrón se obtiene la concentración ( $\mu\text{g}_{\text{carbohidratos}}/\text{mL}$ ) en el extracto ácido.

*Para muestras líquidas:*

Se considera el volumen de muestra algal ( $V_1$ , mL), la concentración de la muestra ( $X$ ,  $\text{g}_{\text{biomasa}} \text{L}^{-1}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V_2$ , mL).

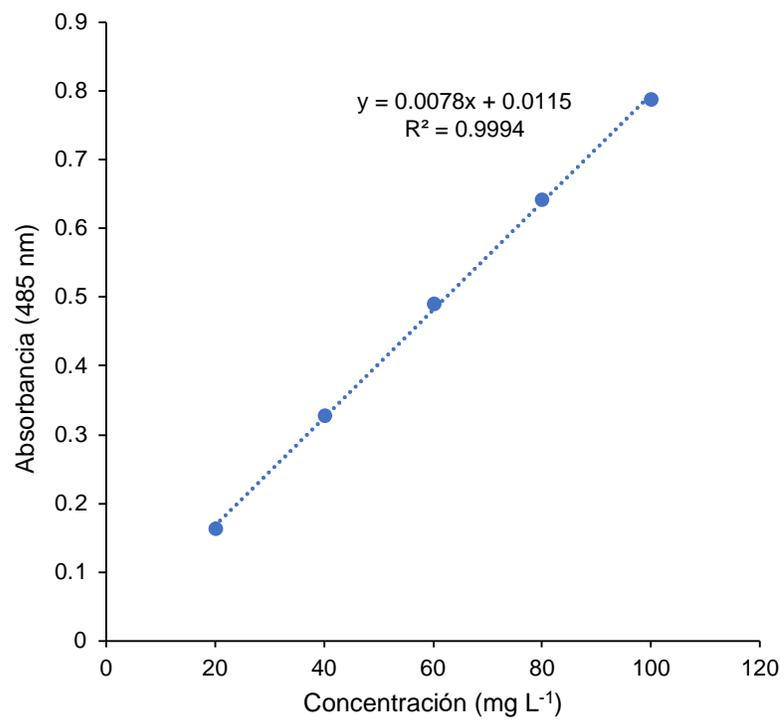
$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{carbohidratos}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1\text{g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000\text{ml}}{1\text{L}}\right) \left(\frac{\text{Vol. extracto } (V_2 \text{ mL})}{\text{Vol. de medio } (V_1 \text{ mL})}\right)}{\left(\frac{X \text{ g}_{\text{bio}}}{\text{L}}\right)} * 100$$

*muestras sólidas:*

Se considera el peso de la muestra ( $\text{mg}_{\text{biomasa}}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V_2$ , mL).

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{carbohidratos}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^3 \mu\text{g}}\right) \text{Vol. extracto } (V_2, \text{mL})}{\text{Peso muestra } (\text{mg}_{\text{biomasa}})} * 100$$

## Curva de calibración



## **ANEXO 2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY**

La extracción de proteína se realiza mediante una hidrólisis alcalina utilizando NaOH (0.2M), y la cuantificación utilizando el método de Lowry et al., (1956).

La metodología descrita a continuación ha sido adaptada para la cepa *Scenedesmus obtusiusculus*, por lo que puede ser modificada de acuerdo con el tipo de cepa con el que se trabaje.

### ***Procesamiento de muestras líquidas***

Para muestras frescas se utiliza 1 mL de cultivo (V1) con concentración de biomasa conocida, (el volumen puede ser modificado dependiendo de la fase de crecimiento y/o concentración de la muestra, siempre y cuando se tome en cuenta el volumen utilizado para poder realizar los cálculos correspondientes), el cual se coloca en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifuga a 14000 rpm por 5 min. Posteriormente se desecha el sobrenadante.

La pastilla celular se resuspende en 2 mL de NaOH (0.2 N), agitando en vortex hasta homogenizar. Posteriormente se coloca a baño maría a 100°C durante 20 minutos para llevar a cabo una hidrólisis alcalina. Se debe tener cuidado de que el tubo utilizado este bien cerrado para evitar evaporación del hidrolizado. Al término se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos.

NOTA: Para el caso de *Spirulina* se recomienda filtrar el extracto en lugar de centrifugar.

El extracto alcalino es utilizado para la cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry.

### ***Procesamiento de muestras sólidas***

En caso de tratarse de muestra de biomasa seca, pesar de 10-20 mg de la muestra y resuspender en 2 mL de NaOH (0.2 N), agitando en vortex. Posteriormente se coloca a baño maría a 100°C durante 20 minutos para llevar a cabo una hidrólisis alcalina. Se debe tener cuidado de que el tubo utilizado este bien cerrado para evitar evaporación del hidrolizado. Al

término se centrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos. El extracto alcalino es utilizado para la cuantificación de proteínas mediante la metodología de Lowry.

### ***Curva estándar***

El stock de la solución estándar se prepara utilizando Sero Albumina bovina (BSA, por sus siglas en inglés). Se pesan 30 mg y se disuelven en 100 mL de NaOH (0.2N) para obtener una concentración final de 300 mg L<sup>-1</sup>. La solución estándar se reserva y almacena en refrigeración y oscuridad hasta utilizarse.

La curva estándar se realiza utilizando diferentes volúmenes del stock previamente descrita para obtener concentraciones de 30, 60, 120, 180, 240 y 300 mg<sub>proteína</sub>L<sup>-1</sup> (Tabla 2). Todos los puntos deberán realizarse por triplicado. Una vez preparados los volúmenes de solución estándar y solución de NaOH (0.2N) se realiza el procedimiento de medición de proteínas por el método de Lowry utilizando el kit de Bio-Rad.

**Tabla 2. Preparación de la curva de calibración de proteínas utilizando BSA como estándar.**

<b>Tubo</b>	<b>Vol. Sln. Estándar (mL)</b>	<b>Vol. Soln. NaOH 0.2 N (mL)</b>	<b>Concentración de proteína BSA (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbancia (750 nm)</b>
Blanco	0	1	0	
1	0.2	0.8	60	
2	0.4	0.6	120	
3	0.6	0.4	180	
4	0.8	0.2	240	
5	1	0	300	

Los datos de la Tabla 2 se grafican y se ajustan utilizando el método de mínimos cuadrados a una ecuación lineal obteniendo la R<sup>2</sup> y el valor de la pendiente (m). Donde R<sup>2</sup>>0.98, en caso de obtenerse un valor inferior deberá prepararse nuevamente la curva.

### ***Método de Lowry***

1. En un tubo Eppendorf de 2 mL agregar 200µL del extracto alcalino
2. Agregar 100 µL de reactivo A-Bio-Rad.
3. Posteriormente agregar 800 µL de reactivo B-Bio-Rad y agitar manualmente hasta homogenizar.
4. Dejar reaccionar en la oscuridad por 15 minutos y leer la absorbancia inmediatamente a 750 nm, manteniendo las muestras siempre en oscuridad.

\* **Nota:** Como blanco se utiliza 200µL de NaOH 0.2N y siguiendo los pasos 2-4.

### ***Cálculos***

A partir de la curva de patrón se obtiene la concentración ( $\mu\text{g}_{\text{proteínas}}/\text{mL}$ ) en el extracto alcalino.

*Para muestras líquidas:*

Se considera el volumen de muestra algal ( $V_1$ , mL), la concentración de la muestra ( $X$ ,  $\text{g}_{\text{biomasa}} \text{L}^{-1}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V_2$ , mL).

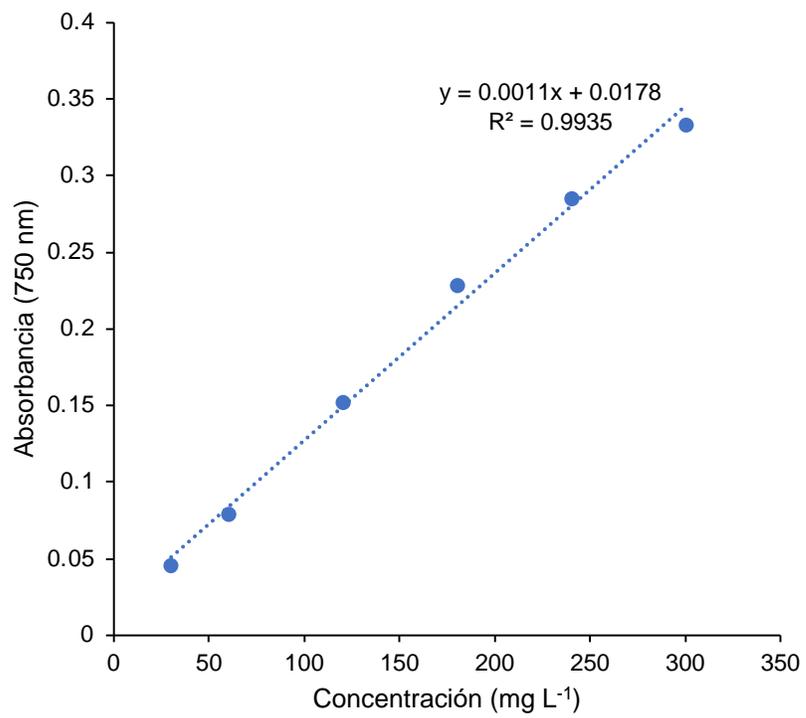
$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{proteínas}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1\text{g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000\text{ml}}{1\text{L}}\right) \left(\frac{\text{Vol. extracto } (V_2 \text{ mL})}{\text{Vol. de medio } (V_1 \text{ mL})}\right)}{\left(\frac{X \text{ g}_{\text{bio}}}{\text{L}}\right)} * 100$$

*Para muestras sólidas:*

Se considera el peso de la muestra ( $\text{mg}_{\text{biomasa}}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V_2$ , mL).

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{proteínas}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^3 \mu\text{g}}\right) \text{Vol. extracto } (V_2, \text{ mL})}{\text{Peso muestra } (\text{mg}_{\text{biomasa}})} * 100$$

### Curva de calibración



### **ANEXO 3. CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS NEUTROS POR EL MÉTODO DE SULFO-FOSFO-VAINILLINA (SPV)**

#### ***Procesamiento de muestras líquidas***

Tomar 100, 200 o 300  $\mu\text{L}$  de muestra de cultivo y poner en tubos HACH de acuerdo a la concentración de aproximada de biomasa, como se presenta en la siguiente tabla 3.

**Tabla 3.** Selección del volumen de medio de cultivo

<b>Concentración de biomasa de la muestra</b>	<b>Cantidad de muestra a tomar</b>
$C < 0.4 \text{ g/L}$	300 $\mu\text{L}$
$0.4 \leq C < 0.8 \text{ g/L}$	200 $\mu\text{L}$
$0.8 \text{ g/L} \leq C$	100 $\mu\text{L}$

Agregar 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98%) sobre las paredes del tubo. Posteriormente, tapar los tubos y agitar en vortex. Calentar a 100 °C durante 15 min utilizando preferentemente baño María. Posteriormente dejar enfriar 5 min en baño de hielo y seguir el procedimiento de cuantificación de lípidos con SPV.

#### ***Procesamiento de muestras sólidas***

En caso de procesar muestra de biomasa seca pesar directamente entre 10-20 mg de la biomasa y colocar en un tubo. Agregar 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98%) sobre las paredes del tubo. Posteriormente, tapar los tubos y agitar en vortex. Calentar a 100 °C durante 15 min utilizando preferentemente baño María. Posteriormente dejar enfriar 5 min en baño de hielo y seguir el procedimiento de cuantificación de lípidos con SPV.

#### ***Preparación del reactivo Fosfo-vainillina (PV)***

Se recomienda preparar el reactivo PV el mismo día en que se va a usar o cuidar que no tenga más de 1 semana de preparado. Conservar en refrigerador y protegido de la luz ya que el reactivo es fotosensible. El uso de guantes y bata obligatorios, realizar la reacción en campana de extracción y protección de la zona de trabajo.

Para preparar 500 mL de PV:

- 1) Disolver 0.6g de Vainillina en 10 mL de etanol absoluto y agitar hasta que se disuelva por completo.
- 2) Agregar 90 mL de agua destilada y agitar continuamente.
- 3) Agregar 400 mL de Ácido Fosfórico concentrado (98%).
- 4) Almacenar en refrigerador y en oscuridad hasta su uso.

### ***Preparación de las soluciones estándar y curva estándar***

El stock de solución estándar se prepara utilizando aceite de canola o de olivo comercial. Para ello se pesan 20 mg de aceite y se disuelven en 10 mL de Cloroformo para obtener una concentración final de  $2 \mu\text{g}_{\text{lípidos}} \mu\text{L}^{-1}$ . La solución estándar se reserva y se almacena a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de utilizarse. Se recomienda preparar un volumen grande de solución estándar debido a la dificultad de pesar el aceite y a su viscosidad.

La curva estándar se realiza utilizando diferentes volúmenes del stock previamente descrita para obtener 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu\text{g}_{\text{lípidos}}$  (Cálculos de volumen del stock, ver abajo).

#### *Cálculos de volumen del stock*

Los volúmenes requeridos de la solución estándar se calculan utilizando la ecuación  $M = C \cdot V$ . Donde, M es la cantidad de lípidos requerida, C es la concentración de la solución estándar ( $2 \mu\text{g}_{\text{lip}} \mu\text{L}_{\text{sln std}}^{-1}$ ) y V el volumen requerido de la solución estándar.

$$M/C = V$$

$$(10 \mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2 \mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 5 \mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(20 \mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2 \mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 10 \mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(30 \mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2 \mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 15 \mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(40 \mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2 \mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 20 \mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(50\mu g_{lip})\left(\frac{1\mu L_{sln\ std}}{2\mu g_{lip}}\right) = 25\mu L_{sln\ std}$$

$$(60\mu g_{lip})\left(\frac{1\mu L_{sln\ std}}{2\mu g_{lip}}\right) = 30\mu L_{sln\ std}$$

$$(70\mu g_{lip})\left(\frac{1\mu L_{sln\ std}}{2\mu g_{lip}}\right) = 35\mu L_{sln\ std}$$

Los volúmenes de solución estándar se colocan en tubos HACH y se almacenan a 60°C durante 10 minutos, con el fin de evaporar el solvente, después se agregan 100 µL de agua destilada y 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Posteriormente procesar siguiendo técnica de cuantificación de lípidos con SPV.

**Tabla 4. Preparación de la curva de calibración**

<b>Tubo</b>	<b>Vol. Stock (µL)</b>	<b>Lípidos (µg)</b>	<b>Vol. Agua (µL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>	<b>Vol. reactivo PV (mL)</b>	<b>Absorbancia (530 nm)</b>
Blanco	-	-	100	2	5	
1	5	10	100	2	5	
2	10	20	100	2	5	
3	15	30	100	2	5	
4	20	40	100	2	5	
5	25	50	100	2	5	
6	30	60	100	2	5	
7	35	70	100	2	5	

#### ***Cuantificación de lípidos con SPV en la muestra del cultivo***

- 1) Agregar 5 mL del reactivo PV al tubo que contiene la muestra de biomasa procesada (sólida o líquida) o lípidos de la curva de calibración. Se recomienda usar pipetas de repetición ya que el reactivo es fotosensible.

- 2) Tapar el tubo y mezclar manualmente por inversión e inmediatamente llevar a incubar.
- 3) La incubación se hace a 37°C por 20 min con agitación a 200 rpm y en oscuridad.
- 4) Leer en el espectrómetro a 530 nm.

*Preparación del blanco para análisis de muestras de biomasa:* Reemplazar la muestra de cultivo utilizada por 100 µL de agua destilada y 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Posteriormente, seguir los pasos 1-4.

**Nota:**

\* Se recomienda dejar reposar los tubos en caso de que se presenten burbujas antes de leer en el espectrómetro para evitar interferencias.

\* Desechar las muestras con SPV en un recipiente adecuado.

\* Lavar los tubos que se utilicen con jabón, enjuagar con agua destilada y enjuagar con alcohol para eliminar cualquier rastro de grasas.

**Cálculos**

A partir de la curva de patrón se obtiene la cantidad de lípidos (µg<sub>Lípidos</sub>).

*Para muestras líquidas:*

Se considera el volumen de muestra algal (V1, mL), la concentración de la muestra (X, g<sub>biomasa</sub> L<sup>-1</sup>).

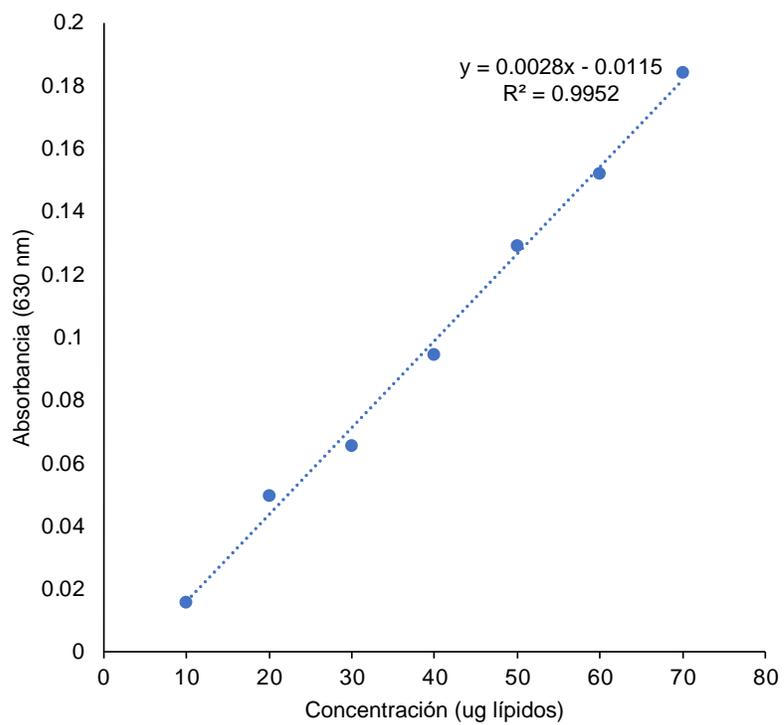
$$\% \text{ Lípidos} = \frac{(\mu g_{\text{lípidos}}) \left( \frac{1g}{1 \times 10^6 \mu g} \right) \left( \frac{1000ml}{1L} \right) (\text{Vol. de medio (V1 mL)})}{\left( \frac{X \text{ g}_{\text{bio}}}{L} \right)} * 100$$

*Para muestras sólidas:*

Se considera el peso de la muestra (mg<sub>biomasa</sub>) y la cantidad de lípidos en la muestra (µg<sub>lípidos</sub>)

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{(\mu g_{\text{lípidos}}) \left( \frac{1 \text{ mg}}{1 \times 10^3 \mu g} \right)}{\text{Peso muestra (mg}_{\text{biomasa}})} * 100$$

### Curva de calibración



## 7. SEMBLANZA, PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Ingeniera Biotecnóloga por el Instituto Tecnológico de Sonora. Tesis “Evaluación de dos medios de cultivo en los parámetros cinéticos y composición bioquímica de *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la elaboración de biodiesel” desarrollada en el Centro de Investigación e Innovación Biotecnológica, Agropecuaria y Ambiental del ITSON.

Maestra en Ciencias Bioquímicas por la Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis “Dinámica microbiana en biofiltros para el control de emisiones de CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>S de efluentes anaerobios municipales” desarrollada en el Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Mi investigación se ha centrado en las biotecnologías ambientales para el tratamiento de gases y captura de carbono con sistemas biológicos, particularmente con metanótrofos y microalgas, así como la generación de bioproductos a partir de ellos.

A continuación, se muestra una lista de los artículos, capítulos de libro y *proceedings* presentados en diferentes revistas y congresos internacionales derivados de mi proyecto doctoral.

### Artículos

Ruiz-Ruiz, P., Gómez-Borraz, T.L., Saldívar-García, A., Hernández, S., Morales, M., Revah, S (2023). Biotechnological GHGs mitigation with a co-culture of alkaliphilic methanotrophs with the microalgae *Scenedesmus obtusiusculus*. Sometido.

Ruiz-Ruiz, P., Gómez-Borraz, T.L., Revah, S., Morales, M., 2020. Methanotroph-microalgae co-culture for greenhouse gas mitigation: Effect of initial biomass ratio and methane concentration. Chemosphere 259. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127418>

### Capítulos de libro

Morales-Ibarra, M., Ruiz-Ruiz, P., Estrada-Graf, A., Razo-Flores, E., Rincón-Pérez, J., Celis, L.B., 2022. Biohydrogen from microalgae, in: 3rd Generation Biofuels. Elsevier, pp. 505–545. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90971-6.00037-1>

Ruiz-Ruiz, P., Estrada, A., Morales, M., 2020. Carbon dioxide capture and utilization using microalgae, in: Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. Elsevier, pp. 185–206. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818536-0.00008-7>

## **Congresos**

Patricia Ruiz-Ruiz, Marcia Morales, Sergio Revah. Co-culturing alkaliphilic methanotrophs with microalgae as a robust strategy leading to GHG mitigation and value products”. Simposio Ambiente y Bioenergía 2022. 30 de noviembre, 1 y 2 de diciembre del 2022. Modalidad oral.

Patricia Ruiz-Ruiz, Tania L. Gómez-Borraz, Marcia Morales, Sergio Revah. Methanotrophs and microalgae co-culture for greenhouse gases mitigation. The 6th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering (6ISEBE). Ciudad Obregón, Sonora. Modalidad oral.

Tania L. Gómez-Borraz, Patricia Ruiz-Ruiz, Sergio Hernández, Marcia Morales, Sergio Revah. Control de pH en un sistema bacteria-microalga para remover CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. León, Guanajuato. Modalidad oral



# Methanotroph-microalgae co-culture for greenhouse gas mitigation: Effect of initial biomass ratio and methane concentration

Patricia Ruiz-Ruiz<sup>a</sup>, Tania L. Gómez-Borraz<sup>b</sup>, Sergio Revah<sup>b, \*\*</sup>, Marcia Morales<sup>b, \*</sup>

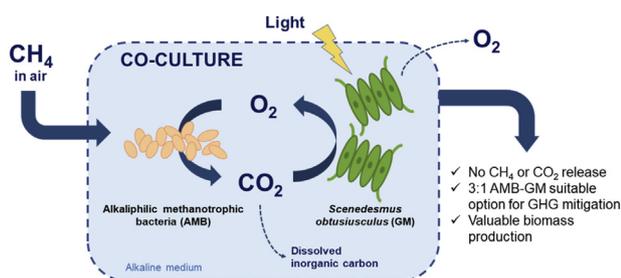
<sup>a</sup> Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Cd. de México, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Av. Vasco de Quiroga 4871, colonia Santa Fe Cuajimalpa, C.P. 05300, Cd. de México, Mexico

## HIGHLIGHTS

- Different ratios of methanotrophs and microalgae were tested in co-culture.
- Complete CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> mitigation was found with initial 4 and 8% CH<sub>4</sub> concentrations.
- rRNA sequencing revealed the presence and evolution of methanotrophic populations.
- pH increased during cultivation and needs regulation to maintain microbial activity.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 4 December 2019

Received in revised form

16 April 2020

Accepted 13 June 2020

Available online 18 June 2020

Handling Editor: Chang-Ping Yu

### Keywords:

Co-culture

Alkaliphilic methanotrophs

Microalgae

Methane emission reduction

Carbon dioxide sequestration

*Scenedesmus obtusiusculus*

## ABSTRACT

This work evaluated the effect of different initial biomass ratios in a co-culture of an alkaliphilic methanotrophic bacteria consortium (AMB) and the green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* (GM) on the maximum CH<sub>4</sub> specific biodegradation rate and global carbon uptake. The highest maximum specific biodegradation rate was  $589 \pm 0.01 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  obtained for a proportion of 3:1 AMB-GM ( $\text{w w}^{-1}$ ) and 8% of initial CH<sub>4</sub> in the headspace. The methane degradation rate was 1.5 times lower than the value obtained solely by the AMB consortium, and it was associated with pH increases due to the evolved CO<sub>2</sub> consumption by the microalga. Increased activity of the AMB consortium along the experiments was due to progressive adaptation. Massive sequencing revealed the presence of methanotrophic/methylotrophic species such as *Methylocystis* sp., *Methylomicrobium* sp., *Methylophaga* sp., and *Hyphomicrobium* sp. Successful complete methane and carbon dioxide uptake was obtained with the 3:1, 4:1, and 5:1 AMB-GM biomass ratios, while for the rest of the ratios tested, more than 70% of the initial methane was transformed into biomass and inorganic carbon. This study showed that methanotrophic-microalgal co-cultures lead to a promising strategy for greenhouse gases mitigation in one step.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The atmospheric accumulation of greenhouse gases (GHG) due to human activities and industrialization is considered the main cause of global climate change and recognized as one of the main problems facing humanity. Atmospheric GHG concentrations have reached unprecedented levels in the last 800,000 years, with

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [srevah@correo.cua.uam.mx](mailto:srevah@correo.cua.uam.mx) (S. Revah), [mmorales@correo.cua.uam.mx](mailto:mmorales@correo.cua.uam.mx) (M. Morales).

carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and methane (CH<sub>4</sub>) being the main contributors (IPCC, 2014). The CO<sub>2</sub> is considered the most important GHG, with approximately 77% of total emissions (considering both the volume and its global warming potential), while CH<sub>4</sub> is emitted to a lesser extent (14%), but has a global warming potential 34 times greater than CO<sub>2</sub> (GWP<sub>100</sub>) (IPCC, 2014; Myhre et al., 2013). This situation has led to a 0.87 °C rise in mean annual global temperatures (Hoegh-Guldberg et al., 2018), and they are expected to cause the increase of another 1–3.7 °C (Ciais et al., 2013).

Despite the environmental relevance of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions, the development of efficient methods for GHG emission mitigation has been scarce. In this sense, biological technologies can be considered as an inexpensive and environmentally friendly option as compared to physical and chemical methods (López et al., 2013). Biotechnological options are based on recycling CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> by the action of microbes, which use them as carbon and energy sources. Methanotrophs metabolize CH<sub>4</sub> as the sole carbon and energy source initially by transforming it to methanol by the methane monooxygenase enzyme (MMO) (Hanson and Hanson, 1996). On the other hand, microalgae are photosynthetic microorganisms that rely on the enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) and the Calvin Cycle for net assimilation of CO<sub>2</sub> (Beardall and Raven, 2016).

Mixed cultures or microbial co-cultures have been explored in various applications with positive effects, such as improved biomass, biocatalytic potential, stability etc. (Singh et al., 2019). Co-cultivation of methanotrophs with other microorganisms to achieve a common goal or to optimize a process has been previously explored (Iguchi et al., 2011; Singh et al., 2019; Stock et al., 2013). More recently, Patel et al. (2018, 2020) used this strategy to enhance methanol production from biogas and CH<sub>4</sub> utilizing co-cultures of different methanotrophic strains. Jeong and Kim (2019) combined a methanotroph and a methylotroph to obtain an efficient and steady system for methane oxidation and recently, Pan et al. (2019) coupled methane-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing bacteria for CH<sub>4</sub> and ammonia reduction in municipal solid waste landfills. In the methanotroph-non methanotrophic association, the non-methanotrophs provide key nutrient factors and alleviate the toxicity from metabolic byproducts such as organic acids (Singh et al., 2019).

Regarding bacteria and microalgae co-cultures, most studies are mainly for wastewater treatment, biogas enrichment and the reduction of GHG emissions in liquid effluents from anaerobic wastewater treatment plants (Rashid et al., 2018; Shahid et al., 2020; Toledo-Cervantes et al., 2017; Zhang et al., 2020). In nature, synergistic relationships between these two groups are common: while bacteria provide the oxidized carbon source for microalgae, oxygen (O<sub>2</sub>) is produced in exchange by photosynthetically active species (Ho et al., 2014; Zhang et al., 2020). In this sense, co-culturing methanotrophic bacteria with microalgae can be considered a promising approach for the simultaneous conversion of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> into valuable biomass by coupling methane oxidation and oxygenic photosynthesis.

There are few reports on the co-culturing of methane-oxidizing bacteria and microalgae communities for the simultaneous mitigation of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. Van Der Ha et al. (2011) studied the non-axenic co-culture of methanotrophic bacteria and microalgae for CH<sub>4</sub> oxidation (synthetic stream of biogas) without the external supply of O<sub>2</sub>, testing the influence of nitrogen (N) source. In addition, Van Der Ha et al. (2012) evaluated the consumption of a synthetic stream of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> by the microalga *Scenedesmus* sp. and the methanotrophic bacterium *Methylocystis parvus* in sequential reactors, and subsequently, they tested a third configuration where both microorganisms were co-cultured in a single reactor. Hill et al. (2017) evaluated the co-culture of *Synechococcus*

7002 and *M. alcaliphilum* 20z using biogas from an anaerobic digester of dairy residues, obtaining a robust growth on raw biogas. Moreover, the co-culture produced biomass could have many applications as methanotrophs and microalgae have been reported for the production of a wide range of valuable metabolites (Martínez-Macías et al., 2018; Strong et al., 2016). However, the methanotrophic-microalgal co-culture approach for CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> mitigation still requires in-depth research efforts to establish and optimize cultivation conditions. The overall carbon mitigation performance for both CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> is related to the trade-off between the amounts of biomass of each microbial group. Up to date, there is only a work by Patel et al. (2018) who tested different ratios of pure methanotrophic cultures for the production of methanol varying the CH<sub>4</sub> concentrations. To the best of our knowledge the biomass proportions for co-culture of methanotrophic and microalgal groups have not yet been studied.

Aiming to develop efficient processes to biologically convert CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> into useful products, in this work, the effect of the biomass ratio of an alkaliphilic methanotrophic bacteria consortium with the green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM on carbon uptake is explored. Specifically, CH<sub>4</sub> specific biodegradation rates, carbon balances, and the evolution of the population was evaluated under two initial CH<sub>4</sub> concentrations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms and culture media

The alkaliphilic methanotrophic bacteria consortium (AMB) was obtained from soil samples of the former Texcoco Lake (The Valley of Mexico), after a more than a yearlong enrichment. It was cultivated in a 3 L-Stirred Tank Reactor, which was fed with 5% (v v<sup>-1</sup>) CH<sub>4</sub> in air and had the pH controlled with NaOH 1 M at 9.15. The AMB was grown on mineral salt medium (MSM) containing (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub>, 2.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.001; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.09; KCl, 0.04; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.015; and the following salts (mg L<sup>-1</sup>): CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.5; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 35; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8.5; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5; CoCl<sub>2</sub>, 50. The green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM (GM) was previously isolated from the wetlands of Cuatro Ciénegas, Mexico (Toledo-Cervantes et al., 2013), and maintained in modified BG-11 medium containing (g L<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.075; magnesium disodium EDTA, 0.001; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.036; citric acid, 0.006; ferric ammonium citrate, 0.006; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02; and the following trace elements (mg L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.222; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.39; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.079; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.494; pH 7.5.

### 2.2. Biomass ratio microcosm kinetic assays

Experiments were performed in 125 mL glass bottles with 25 mL of AMB-GM co-cultures on MSM and BG-11 sterile media (50% v v<sup>-1</sup>, adjusting pH at 9.15) and 100 mL of gas headspace. In a first series of experiments (AMB1), three different initial biomass ratios of AMB-GM (w w<sup>-1</sup>) were tested (1:1, 1:3, and 3:1) to get an initial total biomass content of 1 g L<sup>-1</sup> using two CH<sub>4</sub> concentrations in the headspace, 4% and 8% (v v<sup>-1</sup>), (Table 1). The glass bottles were sealed with butyl septa and aluminum crimp seals. Initial CH<sub>4</sub> headspace concentrations were set using a 20 mL syringe to inject a given volume of pure CH<sub>4</sub> (99% v v<sup>-1</sup>, Praxair, Mexico) into the headspace, just after removing the same volume of air to avoid overpressure in the glass bottles. It was done to obtain CH<sub>4</sub> concentrations of 4 and 8% in the headspace. Glass bottles were incubated in a horizontal orbital shaker at 400 rpm, 28 ± 1 °C, and irradiance of 115 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. A second experiment, AMB2,

**Table 1**  
Cultivation conditions during microcosm kinetic assays.

Experiment	Initial CH <sub>4</sub> on headspace (%)	AMB-GM Biomass ratio (w w <sup>-1</sup> )
AMB1	4	1:1
	4	1:3
	4	3:1
	8	1:1
	8	1:3
	8	3:1
AMB2	4	3:1
	4	4:1
	4	5:1
	8	3:1
	8	4:1
	8	5:1

included AMB-GM (w w<sup>-1</sup>) ratios of 3:1, 4:1, and 5:1 with 4% and 8% CH<sub>4</sub> concentrations (v v<sup>-1</sup>) in the headspace at the same conditions (Table 1). AMB controls without GM cultivated on MSM with 4% and 8% CH<sub>4</sub> concentrations (v v<sup>-1</sup>) in the headspace were also tested inoculated to get 0.5 g<sub>biomass</sub> L<sup>-1</sup> for AMB1 and 0.75 g<sub>biomass</sub> L<sup>-1</sup> for AMB2. The period between AMB1 and AMB2 was two months. CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> in the headspace were monitored by gas chromatography (GC). The initial and final O<sub>2</sub>, pH, and biomass were quantified.

### 2.3. Bacterial diversity of the alkaliphilic methanotrophic consortium

DNA extraction and Illumina sequencing of 16S rRNA were performed to determine the bacterial composition of the alkaliphilic methanotrophic consortium. 50 mL of AMB culture were centrifuged, and the pellet was washed five times with 1X PBS prior to DNA extraction. MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) was used to extract DNA following the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured spectrophotometrically with a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, MA, USA), and the extracted DNA was stored at -20 °C. DNA samples were submitted to the Research and Testing Laboratory (RTL, Lubbock, USA) for Illumina MiSeq sequencing analysis. The hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene was amplified according to the standard Illumina protocol. Primers used for amplification were 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) (Caporaso et al., 2011) and 806bR (GGACTACNVGGGTWCTAAT) (Apprill et al., 2015). The raw sequencing reads were preprocessed using QIIME2 software (Caporaso et al., 2010). Noise from the data was removed from the forward and reverse reads. This denoising step was conducted using DADA2 (Callahan et al., 2016), which also removed chimeras and contaminating sequences, and combined the forward and reverse reads. After cleaning and preprocessing, the reads from all samples were aligned to the V4 region of a curated reference database of 16S rRNA sequences, the SILVA database (Quast et al., 2013), to assign taxonomic affiliation to each Operational Taxonomic Unit (OTU).

### 2.4. Flow cytometry

The proportion in cell number within the biomass ratio tests of each microbial group (AMB or GM) was observed by means of flow cytometry using a BD FACSCalibur (FACS, BD Bioscience, San José, CA). A pretreatment was applied to samples by adding 1 mL of 50 mM Na<sub>2</sub>EDTA and stirring for 30 min to disrupt large aggregates. Samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 min, and the supernatant was discarded. They were further fixed with 500 µL of 1%

paraformaldehyde, then centrifuged at 2500 rpm for 3 min at 4 °C and resuspended in 500 µL of FACS flow buffer. The ratio of different AMB-GM within the co-culture was identified from 10,000 recorded cells via size and complexity gates, and the data were analyzed using FlowJo software (FlowJo™; version 10.6.1; FlowJo LLC).

### 2.5. Analytical procedures

CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, and CO<sub>2</sub> gas concentrations were measured in a gas chromatograph (GowMac Series 550, USA) equipped with a thermal conductivity detector and a CTR1 column (Alltech, USA). Helium was used as the carrier gas at 100 mL min<sup>-1</sup>. The temperatures of the injector, detector and the column were 50 °C, 115 °C and 50 °C, respectively. Biomass concentration was measured by dry weight. The pH was determined using an SG200C electrode (Sensorex, USA). Liquid samples of co-cultures were filtered through a 0.2 µm pore size membrane prior to the determination of inorganic carbon (IC) by a TOC-VCSH analyzer (Shimadzu, TOC-L Series, Japan). The elemental biomass composition (C, H, O, N, and S content) of the alkaliphilic methanotrophic consortium and *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM was determined using a CHNS analyzer (Series II 2400 CHNS/O PerkinElmer, USA).

### 2.6. Calculations

The maximum specific CH<sub>4</sub> biodegradation rate (expressed as mg<sub>CH4</sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) was calculated by adjusting the CH<sub>4</sub> consumption data to the Gompertz model, according to Zúñiga et al. (2011). CH<sub>4</sub> removal efficiency (RE, %) in co-cultures was calculated using Equation (1), where C<sub>i</sub> is the initial CH<sub>4</sub> concentration and C<sub>f</sub> the final CH<sub>4</sub> gas concentration.

$$RE = 100 \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \quad (1)$$

### 2.7. Statistical analysis

The statistical data analysis was performed using SPSS 25.0 (IBM). Experiments were performed in duplicate, and results are presented as the average ± standard deviation. The homogeneity of the variance of the parameters was evaluated using a Levene test. Significant differences were analyzed by the Student's t-test for two group comparisons. ANOVA and post-hoc Dunnett analysis were used to compare the biodegradation rates of different biomass ratios tested with AMB controls. Differences were considered to be statistically significant at p ≤ 0.05.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of biomass ratio and CH<sub>4</sub> concentration on biodegradation rates

Table 2 shows the maximum specific CH<sub>4</sub> biodegradation rates for AMB-GM ratios for the AMB1 test. No statistically significant differences were found in degradation rates due to the initial concentration of CH<sub>4</sub> used (p-value ≥ 0.05). On the contrary, statistically significant differences were found for the different biomass ratios tested, demonstrating that varying amounts of AMB-GM does have an effect on the CH<sub>4</sub> degradation rates. As can be seen, the highest value was 393 ± 0.013 mg<sub>CH4</sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, obtained for 3:1 AMB-GM biomass ratio and 8% of CH<sub>4</sub>. Conversely, 264 ± 0.053 mg<sub>CH4</sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> was the lowest value achieved for the 1:1 AMB-GM biomass ratio and 4% of CH<sub>4</sub>. The biodegradation

**Table 2**  
Results for AMB1 for AMB-GM biomass ratios of 1:1, 1:3, 3:1, and AMB controls with 4% and 8% CH<sub>4</sub> in the headspace.

CH <sub>4</sub> (%)	Biomass ratio AMB-GM (w w <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> degradation rate (mg <sub>CH<sub>4</sub></sub> g <sub>biomass</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> RE (%)	Initial pH	Final pH	Initial O <sub>2</sub> (%)	Final O <sub>2</sub> (%)	Final CO <sub>2</sub> (%)
4	1:1	264 ± 0.053*	32.6	9.15	11.5	17.5	28.7	0.0
4	1:3	297 ± 0.000*	15.7	9.15	11.6	17.7	28.0	0.0
4	3:1	335 ± 0.007*	100	9.15	10.1	17.3	24.4	0.0
4	AMB control	381 ± 0.012	100	9.15	7.5	17.2	12.5	3.4
8	1:1	271 ± 0.054*	19.0	9.15	11.6	17.2	28.1	0.0
8	1:3	307 ± 0.106*	13.0	9.15	11.6	17.9	27.8	0.0
8	3:1	393 ± 0.013*	65.3	9.15	10.9	17.0	24.4	0.0
8	AMB control	581 ± 0.042	100	9.15	6.8	17.5	7.6	7.5

CH<sub>4</sub> degradation rates are presented as mean values ± standard deviations for each duplicate. \*Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  (Dunnett's multiple comparison test).

rate of the AMB consortium alone ( $581 \pm 0.042 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  equivalent to  $12.28 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) was higher than rates reported for enrichments of other haloalkaliphilic methanotrophic bacteria,  $1.08\text{--}1.12 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Cantera et al., 2019), and the highest rate of AMB-GM (3:1 ratio,  $393 \pm 0.013 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , corresponding to  $10.63 \text{ g}_{\text{CH}_4} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) was ten-fold higher, demonstrating that even in combination with the microalgae, AMB degraded CH<sub>4</sub> with high rates if compared of other methanotrophic bacteria cultivated at alkaline pH (9.0). The yields were  $0.23 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  and  $0.40 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  for 4% initial methane concentration and  $0.34 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  and  $0.40 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  for 8%.

Both the initial O<sub>2</sub> and that produced by the microalga during the test were sufficient for CH<sub>4</sub> oxidation. Increases from 17 to 18% to 24 and 28% were observed for the three initial AMB-GM biomass ratios tested (see Table 2). On AMB controls, headspace O<sub>2</sub> was consumed to final concentrations of 12.5% and 7.6% for 4 and 8% of CH<sub>4</sub>, respectively. CO<sub>2</sub> was only detected in the headspace of AMB controls and not in the co-cultures, due to uptake by microalgae and the alkaline pH that favored the formation of carbonates (Acién et al., 2016).

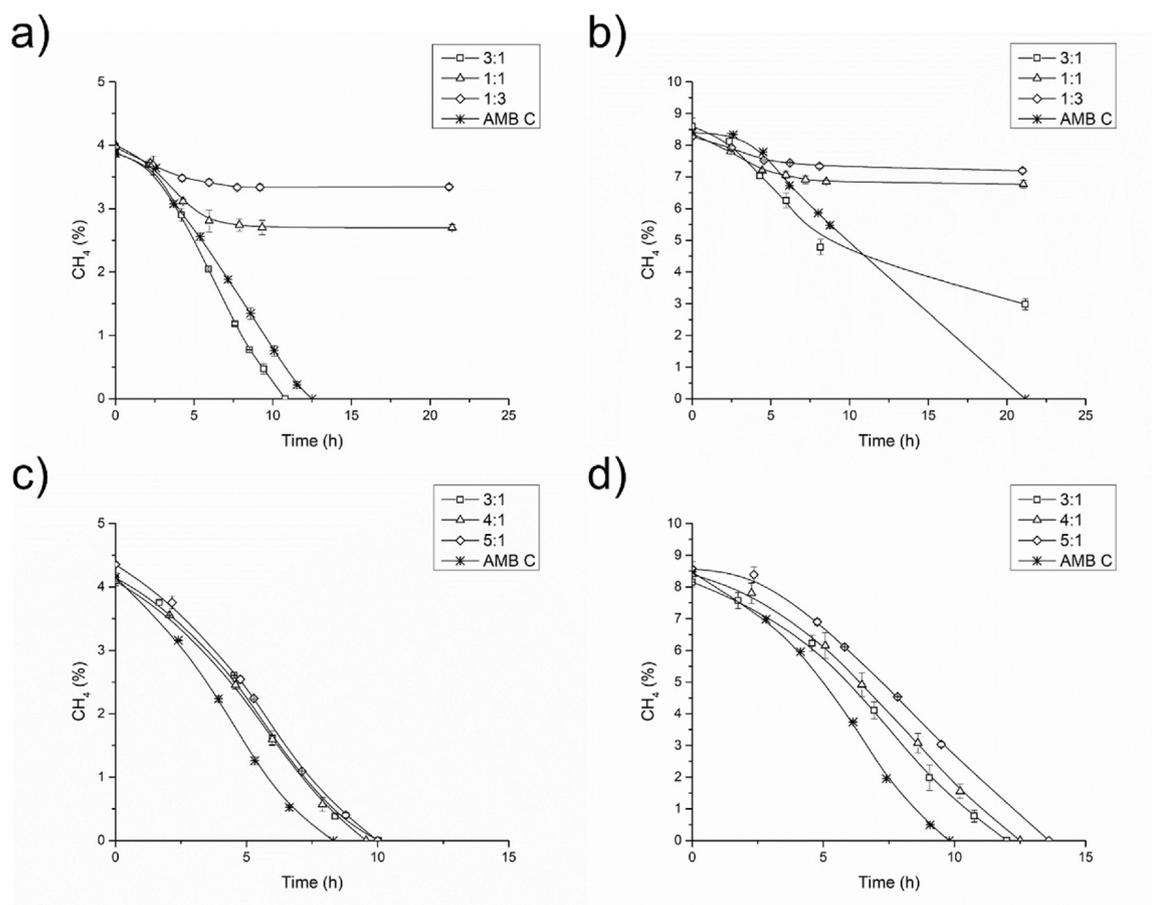
The lowest RE was obtained in the 1:3 ratio. The CH<sub>4</sub> REs were 15 and 13%, for 4% and 8% of CH<sub>4</sub> in headspace, respectively. CH<sub>4</sub> REs of 32% and 19% were obtained for the 1:1 ratio for 4% and 8% of CH<sub>4</sub> in headspace, respectively. In the same way, CH<sub>4</sub> biodegradation was observed to cease in the closed systems in the 1:3 and 1:1 ratios (Fig. 1a and b). The latter may be attributed to the alkalization related to CO<sub>2</sub> fixation and nitrate consumption by the assimilatory nitrate reductase (Albina et al., 2019). During the assays, the pH was not controlled, so it varied according to the relative metabolic activities of AMB and GM. In these two ratios, 1:3 and 1:1, an increase in pH (>11) was observed, which may explain why the REs were too low. This pH rise affects the AMB activity within the co-cultures as the consortium has been adapted to grow in a pH range 9.0–9.2. The pH increase, due to CO<sub>2</sub> uptake by microalgae, depends on both the biomass present and the growth rate (Morales et al., 2015). Studies have shown significant pH increases with biomass accumulation in algal cultures (Chi et al., 2011). The ratios with more microalgae tend to unbalance the system since there was an increase in the pH to a point not favorable for methanotrophs.

On the other side, in the AMB controls without GM, the pH lowers due to the acidifying effect of the produced and solubilized CO<sub>2</sub>. This decrease in pH may also affect the CH<sub>4</sub> biodegradation rates considering the alkaliphilic nature of the consortium. The acidification, caused by the accumulation of dissolved CO<sub>2</sub> as a result of methanotrophic activity, could thus be neutralized by microalgal growth, which in turn depends on the number of initial microalgae, the medium (nutrients and pH), and the light intensity. Besides the dissolved inorganic carbon equilibrium, the uptake of ionic species, such as nitrate, phosphates, ammonia, etc., by the

microalga induces major pH changes in the medium (Morales et al., 2015). The results presented above underline the importance of a precise pH control to maintain high activity in both microbial groups in the co-culture.

The results in AMB1 showed that the highest degradation rate was obtained for the 3:1 AMB-GM ratio. Therefore, the second round of tests, AMB2 (Table 1), evaluated the effect of higher proportions of methanotrophic bacteria. In these assays, the biodegradation rates were consistently higher, ( $p \leq 0.05$ ), with 8% CH<sub>4</sub> in the headspace as compared to 4% which was probably due to the increased CH<sub>4</sub> demand due to the higher initial AMB concentration. Higher gas concentration in the gas phase, especially with low-soluble compounds such as CH<sub>4</sub> (dimensionless Henry's law constant equals 30 at 25 °C, AlSayed et al., 2018; Ordaz et al., 2014) favors its degradation by increasing its bioavailability through higher volumetric mass transfer rates (Kraakman et al., 2011). In AMB controls, the yields were  $0.33 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  and  $0.43 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  for 4% initial methane concentration and  $0.51 \text{ g}_{\text{biomass}} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  and  $0.47 \text{ g}_{\text{CO}_2} \text{ g}_{\text{CH}_4}^{-1}$  for 8%. The CH<sub>4</sub> RE for the three biomass ratios and the AMB controls were 100% for both CH<sub>4</sub> concentrations (Fig. 1c and d). As can be seen in Table 3, CH<sub>4</sub> degradation rates did not improve for 4:1 and 5:1 ratios, and the highest maximum specific CH<sub>4</sub> biodegradation rate,  $589 \pm 0.011 \text{ mg}_{\text{CH}_4} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , was obtained for the 3:1 AMB-GM biomass ratio and 8% of CH<sub>4</sub>. This high CH<sub>4</sub> degradation rate, coupled with a higher CO<sub>2</sub> production rate, allowed maintaining a lower pH, favoring methanotrophic activity. In contrast, lower rates in 4% assays were associated with pH increases >10.3.

As in AMB1 assays, statistically significant differences were also found in the biodegradation rates with the different biomass ratios tested ( $p \leq 0.05$ ) and the 3:1 remained the best initial ratio. The difference in biodegradation rates between AMB1 and AMB2 can be attributed to changes due to the consortium specialization and enrichment of certain methanotrophic species such as *Methylobacterium* sp. (Table 4). While the net effect of the presence of microalga in the biomass ratio tests on methane biodegradation rates seems negative as compared to the AMB controls, there was a positive balance regarding the CO<sub>2</sub> consumption/retention. It contributed to the reduction of both GHG, as no CO<sub>2</sub> was present in the gas phase on the co-cultures at the end of AMB1 and AMB2. Rasouli et al. (2018) also found slower CH<sub>4</sub> consumption rates on methanotrophic-microalgal co-cultures using *M. capsulatus* and *C. sorokiniana*, compared to that of the methanotroph *M. capsulatus* alone. Authors proposed that *M. capsulatus* competes with the alga for micronutrients such as copper, which may have hindered its growth. In the same study, O<sub>2</sub> accumulation at the end of the experiment (27%) was reported, indicating that O<sub>2</sub> consumption for CH<sub>4</sub> oxidation was not balanced with O<sub>2</sub> production by photosynthesis in the system, with *M. capsulatus* consuming O<sub>2</sub> at a lower rate than the rate of O<sub>2</sub> production by *C. sorokiniana*. Similarly, the



**Fig. 1.** CH<sub>4</sub> consumption in microcosm kinetic assays for different biomass ratios tested in this study. AMB-GM biomass ratios and AMB controls are shown. Results for AMB1 are presented in: a) for 4% of CH<sub>4</sub> in the headspace and, b) for 8%. Results for AMB2 are given in: c) for 4% of CH<sub>4</sub> in the headspace and d) for 8%.

**Table 3**

Results for AMB2 for AMB-GM biomass ratios of 3:1, 4:1, 5:1 and AMB controls with 4% and 8% CH<sub>4</sub> in the headspace.

CH <sub>4</sub> (%)	Biomass ratio AMB-GM (w w <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> degradation rate (mg <sub>CH<sub>4</sub></sub> g <sub>biomass</sub> <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Initial pH	Final pH	Initial O <sub>2</sub> (%)	Final O <sub>2</sub> (%)	Final CO <sub>2</sub> (%)
4	3:1	374 ± 0.001*	9.15	10.8	17.3	16.7	0.0
4	4:1	337 ± 0.007*	9.15	10.4	17.3	16.8	0.0
4	5:1	329 ± 0.015*	9.15	10.3	17.1	16.1	0.0
4	AMB control	495 ± 0.008	9.15	6.8	17.2	10.0	3.4
8	3:1	589 ± 0.011*	9.15	8.8	17.0	12.7	0.0
8	4:1	540 ± 0.015*	9.15	9.1	17.1	12.1	0.0
8	5:1	490 ± 0.023*	9.15	9.1	17.0	11.4	0.0
8	AMB control	855 ± 0.068	9.15	6.7	17.1	2.8	6.4

CH<sub>4</sub> degradation rates are presented as mean values ± standard deviations for each duplicate. \*Differences were considered statistically significant at p ≤ 0.05 (Dunnnett's multiple comparison test).

degradation rates of CH<sub>4</sub> for co-cultures in this study were lower than the performance of AMB alone. A balance in the proportion of these two microbial groups must ensure the activity of both of them to provide the conditions that would allow the consumption of both CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>. For the combination of the alkaliphilic methanotrophic consortium and *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM used in this study, a 3:1 AMB-GM biomass ratio was adequate for global CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> mitigation.

### 3.2. Carbon fate on co-cultures

Fig. 2 shows the carbon fate on co-cultures and AMB controls for AMB1 and AMB2. The carbon content in the biomass was

determined by elemental analysis. The AMB composition was 49.1% C, 7.4% H, 11.0% N, and 0.7% S, while biomass composition of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM was 49.5% C, 7.3% H, 6.9% N, and 0.78% S.

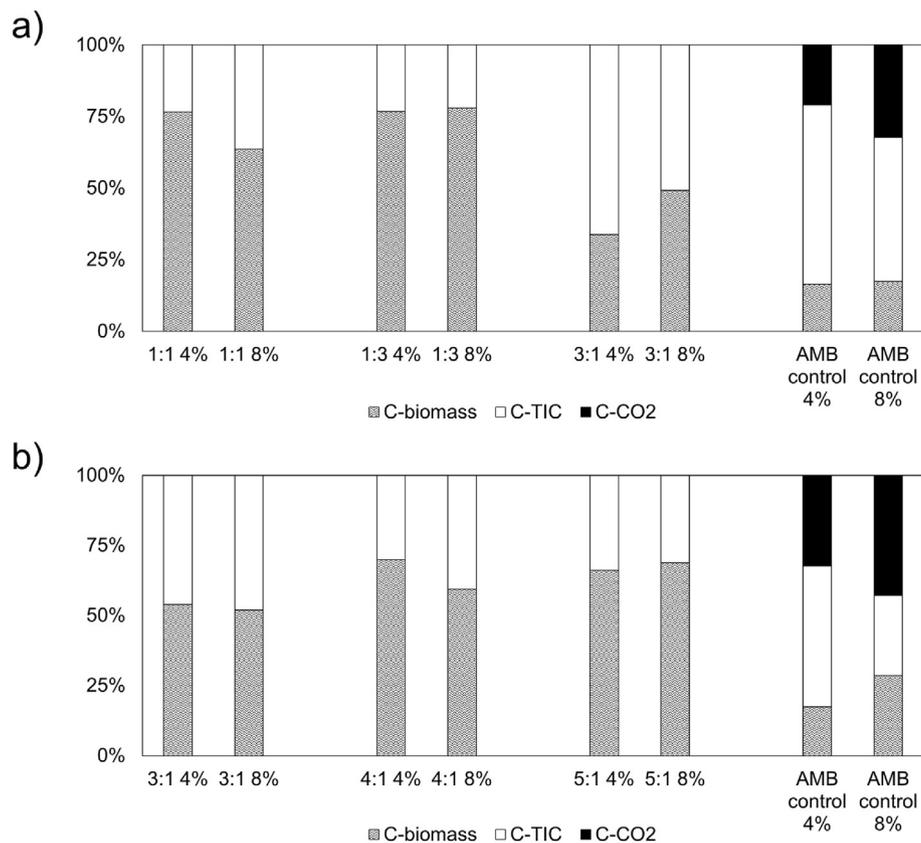
AMB1 experiment showed that only the 3:1 AMB-GM ratio with 4% of CH<sub>4</sub> in the headspace did not have CH<sub>4</sub> nor CO<sub>2</sub> in the gas-phase at the end of the kinetics, as the latter remained dissolved in the culture because of pH equilibrium. In general, the carbon present in the biomass (C-biomass) accounted for approx. 35–80%, while the carbon present as inorganic carbon (C-TIC) was in the range of 20–65% on the co-cultures. This dissolved CO<sub>2</sub> still represents a source of carbon that can be subsequently used for microalgal growth. It can be expected that under appropriate

**Table 4**

Main taxonomic affiliations obtained from the alignment of AMB OTUs with reference sequences of the SILVA database (for the V4 region of 16S rRNA).

Phylum	Taxonomic affiliation	AMB1	AMB2		
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<b>Methylocystis sp.</b>	27.4	ND	
		<b>Hyphomicrobium sp.</b>	3.7	2.8	
		Fodinicurvataceae bacterium	3.6	2.6	
		Uncultured <i>Parvibaculum</i> sp.	1.8	3.1	
		Rhizobiaceae bacterium	3.0	ND	
		<i>Chelativorans</i> sp.	2.5	ND	
		Rhodobacteraceae bacterium	4.9	ND	
		Uncultured Alphaproteobacteria	ND	2.2	
		Gammaproteobacteria	<b>Methylophilum sp.</b>	6.8	10.4
			Xanthomonadaceae bacterium	4.0	9.8
	<i>Dokdonella</i> sp.		2.8	6.3	
	<b>Methylophilaceae bacterium</b>		5.0	ND	
	<b>Methylophaga sp.</b>		5.0	4.7	
	Xanthomonadaceae bacterium		1.9	4.0	
	<i>Luteimonas</i> sp.		ND	3.2	
	Uncultured <i>Pseudofulvimonas</i> sp.		3.0	ND	
	Salinisphaerales bacterium		2.3	ND	
	Uncultured Diplorickettsiaceae		1.6	ND	
	Gemmatimonadetes	<i>Halomonas</i> sp.	1.5	0.9	
		<i>Alisewanella</i> sp.	ND	0.4	
Uncultured Longimicrobiaceae		5.1	8.9		
Uncultured Gemmatimonadetes		4.1	7.1		
Uncultured Gemmatimonadetes		ND	4.8		
Bacteroidetes		Balneolaceae bacterium	3.4	4.0	
		Uncultured Cyclobacteriaceae	0.9	2.2	
		<i>Cyclobacterium</i> sp.	ND	2.2	
Cyanobacteria		Uncultured Oxyphotobacteria	ND	4.5	
Chlamydiae		Parachlamydiaceae bacterium	1.6	ND	
Unassigned	Unassigned	ND	14.4		

ND: Not detected.

**Fig. 2.** Carbon fate (% C) on AMB-GM biomass ratios and AMB controls. The carbon in the biomass (C-biomass), inorganic carbon (C-TIC) and CO<sub>2</sub>-carbon (C-CO<sub>2</sub>) is shown. Results for AMB1 are presented in a) and AMB2 are depicted in b).

culture conditions (e.g., pH, nutrients, and light), all carbon could be eventually consumed. The extreme cultivation conditions and the short time of the kinetics did not allow all the CH<sub>4</sub>-carbon to be converted into biomass and instead remained in the medium as carbonates (C-TIC, Fig. 2). On the other hand, in AMB2, neither CH<sub>4</sub> nor CO<sub>2</sub> was observed in the gas phase at the end of the experiment, demonstrating that a proportion of AMB greater than 3 parts per one part of GM is a successful strategy that favors the overall consumption of CH<sub>4</sub> and the consumption/retention of CO<sub>2</sub>. In this experiment, it was observed that more than 50% of the consumed CH<sub>4</sub>-carbon was present in the biomass (C-biomass), and 30–50% was present as dissolved inorganic carbon (C-TIC).

### 3.3. Bacterial diversity of alkaliphilic methanotrophic consortium

Molecular characterization of the alkaliphilic methanotrophic consortium identified the main species in both AMB1 and AMB2 experiments. The 16S rRNA pyrosequencing analysis showed that AMB bacterial community was composed of eight different phyla: Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Chlamydiae, Planctomycetes, Actinobacteria, and Dependientiae (Fig. 3). The phylum Proteobacteria was predominant in both experiments with a relative abundance of 79.54% in AMB1 and 56.46% in AMB2 of the identified bacterial OTUs. As previously mentioned, the AMB1 and AMB2 experiments were performed with two months of difference, which sufficed for the AMB consortium to evolve and specialize, as shown by previous kinetic results.

Table 4 exhibits the main taxonomic affiliations obtained from the alignment of AMB OTUs with reference sequences of the SILVA database (for V4 region of the 16S rRNA). Within methane-oxidizing organisms, the OTU related to *Methylocystis* sp. were found only on AMB1 (27.37%), but none was detected on AMB2. The genus *Methylocystis* is classified into Group II of methanotrophs (Alphaproteobacteria) (Kalyuzhnaya et al., 2015).

Species of this group are able to utilize methane and its derivatives as carbon sources through the serine pathway.

Many of these methanotrophic bacteria perform important environmental functions as they are a link in the global carbon cycle, act as nitrogen fixers, and have the ability to degrade a variety of organic contaminants (Webb et al., 2014). The presence of this

genus in alkaline environments is not rare (Han et al., 2009).

Another methanotrophic OTU, *Methylomicrobium* sp., was detected in both AMB1 (6.76%) and AMB2 (10.37%). This genus is a methane oxidizer that belongs to Group I of methanotrophs (Gammaproteobacteria) (Kalyuzhnaya et al., 2015). *Methylomicrobium* spp. have a strictly aerobic respiratory metabolism, and they can use methane or methanol as carbon and energy source, but no other C<sub>1</sub> or C<sub>n</sub> compounds. They use the ribulose monophosphate (RuMP) pathway for carbon assimilation, and nitrate and ammonium salts as N sources. Most species are mesophilic, with optimal growth at 25–30 °C, but there are some alkali-tolerant or alkaliphilic strains, growing well in the pH range 9–10.5, which require sodium ions for growth (Kalyuzhnaya et al., 2008). The presence of this OTU in the alkaliphilic consortium makes sense since the inoculum for AMB culture enrichment was obtained from samples collected from a soda lake in Mexico with a high pH and high salt concentration conditions (Valenzuela-Encinas et al., 2009).

Other OTUs related to CH<sub>4</sub> oxidation metabolism and found in both AMB samples were methylotrophs *Methylophaga* sp. and *Hyphomicrobium* sp. These methylotrophic bacteria are able to oxidize methanol, monomethylamines, dimethylsulfides, etc. The genus *Methylophaga* consists of halophilic strictly methylotrophic members of Gammaproteobacteria, many of which were isolated from marine or other low water activity environments, such as the surface of marble or hypersaline lakes (Boden, 2012). The genus *Hyphomicrobium* (Alphaproteobacteria), however, is metabolically very versatile, as they can grow on methylamine, dimethylsulfide, dimethylsulfone, and other C<sub>1</sub>-compounds (Kelly and Wood, 2010). The presence of these OTUs can be attributed possibly to the production of methanol as part of the CH<sub>4</sub> oxidation reaction to CO<sub>2</sub>, carried out by the methane-oxidizing bacteria. Cantera et al. (2019) also found these two organisms on haloalkaliphilic methanotroph enrichments for the production of ectoine at pH 9, which demonstrates that these alkaline conditions favor the growth of these microorganisms and the global carbon consumption from CH<sub>4</sub>.

OTUs related to other alkaliphilic microorganisms, such as *Alishewanella* sp. and *Halomonas* sp. were also found on AMB. Previous reports of methanotrophic enrichment cultures in alkaline

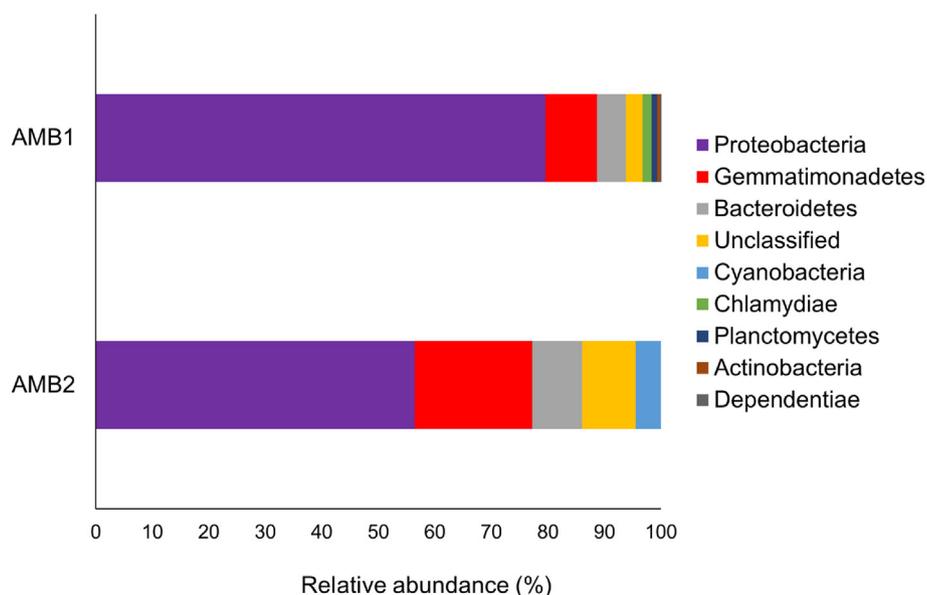


Fig. 3. The abundance of bacterial phyla during AMB1 and AMB2 experiments.

**Table 5**  
Proportion of each microbial group (%) within 10,000 cell counts obtained by flow cytometry for different AMB-GM biomass ratios tested in this study at the beginning and the end of kinetic assays.

AMB-GM biomass ratio	Initial CH <sub>4</sub> in the headspace (%)	AMB		GM	
		Initial	Final	Initial	Final
1:1	4	66.3	69.0	33.7	31.0
1:3	4	62.2	60.8	37.8	39.2
3:1	4	81.4	72.9	18.6	27.1
4:1	4	85.1	91.0	14.9	9.0
5:1	4	92.5	97.6	7.5	2.4
1:1	8	55.3	69.4	44.7	30.6
1:3	8	60.3	37.3	37.8	57.9
3:1	8	76.4	96.7	19.4	1.96
4:1	8	85.2	91.7	14.8	8.3
5:1	8	86.6	92.1	13.4	7.9

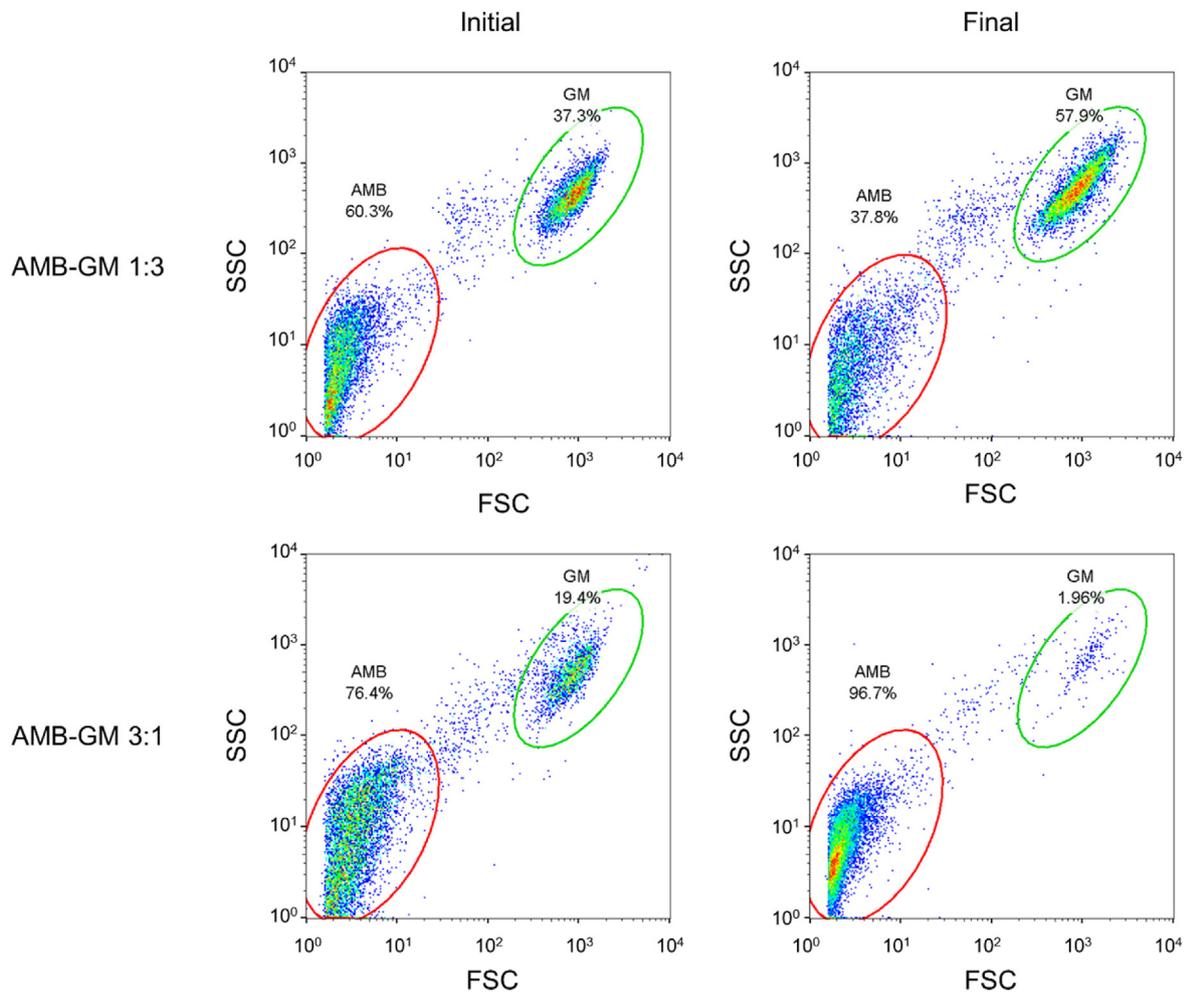
conditions (Cantera et al., 2019) or from soda lakes (Antony et al., 2010) have shown the presence of these two genera. Finally, other non-methanotrophic and oligotrophic heterotrophic bacteria from the phylum Proteobacteria, such as *Dokdonella*, and the phylum Gemmatimonadetes, were present and favored by AMB culture conditions. These OTUs have been retrieved from bioreactors treating waste gases (Lebrero et al., 2013) and enrichment cultures of methanotrophic bacteria at low CH<sub>4</sub> concentrations (Cantera et al., 2016).

Overall, the diversity of AMB culture was determined by the imposed conditions (using CH<sub>4</sub> as the only carbon source and high

pH) during enrichment and the source of inoculum. Despite changes in the AMB populations, the culture maintained its capacity to oxidize CH<sub>4</sub>. Maintenance of functional stability, in this case, CH<sub>4</sub> biodegradation, indicates functional redundancy, which is ensured by the presence of a reservoir of species able to perform the same ecological function (Cabrol and Malhautier, 2011).

### 3.4. Flow cytometry of co-cultures

Flow cytometry of co-culture samples was used to observe the global proportions of each microbial group at the beginning and the



**Fig. 4.** Initial and final 1:3 and 3:1 AMB-GM biomass ratios (with 8% of CH<sub>4</sub>) by enumeration of each cell type from 10,000 recorded cells via size and complexity; side scatter (SSC) plotted against forward scatter (FSC). Percentages of alkaliphilic methanotrophic bacteria (AMB) and the green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM (GM) are shown as well. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

end of kinetics. AMB and *S. obtusiusculus* AT-UAM (GM) were separated by size and complexity at different initial biomass ratios tested, and the proportion of each microbial group within 10,000 cells on the co-cultures was determined (Table 5).

It is important to note that initial biomass ratios were made on a weight basis and not on the number of cells of each microbial group. In this sense, the number of initial bacteria will always be greater as the average individual size of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM is 4.8  $\mu\text{m}$  width  $\times$  13.2  $\mu\text{m}$  length (Toledo-Cervantes et al., 2013) and the alkaliphilic methanotrophic bacteria average size is 0.5–4.0  $\times$  0.5–2.0  $\mu\text{m}$  (Bowman, 2016). Fig. 4 shows the initial and final 1:3 and 3:1 AMB-GM ratios (both with 8% of  $\text{CH}_4$ ). An increase in the proportion of algal cells was observed for the 1:3 ratio (from 37 to 57%) favored by the steep pH rise that inhibited methane degradation. On the contrary, the inoculation with the 3:1 AMB-GM ratio increased the AMB proportion (from 76 to 96%), which can be associated with the high  $\text{CH}_4$  biodegradation rate. Flow cytometry technique was a useful and simple tool to observe the evolution of co-cultures, in this case, eukaryotic microalgae and a consortium of methanotrophic (and heterotrophic) bacteria. Given the differences in their size and morphology, the changes in the proportion of each were clearly resolved and supported the results of kinetic data for each biomass ratio. Although this is an approximation of the growth in cell number of each group within the co-culture, further work is necessary for more precise monitoring of the mixed culture.

This technique was previously used by Hill et al. (2017) to determine the species-specific abundances via cell counting of the mass fractions of *Synechococcus* 7002 and *M. alcaliphilum*. The authors in that study determined that 66.6% of biomass belonged to *M. alcaliphilum* and 33.2% to *Synechococcus* 7002, when they used a 1:1 biomass ratio to inoculate. The most recent attempts to track individual species within methanotrophic-microalgal co-cultures were presented by Badr et al. (2019).

#### 4. Conclusions

Successful simultaneous sequestration of both  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  was achieved using the strategy of co-culturing an alkaliphilic methanotrophic bacteria consortium (AMB) and the green microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM (GM). This work addresses the initial proportion of each microorganism, which is an important aspect to be considered for the implementation of systems with methanotrophic-microalgal co-cultures as it affects the rate and amount of  $\text{O}_2$  and  $\text{CO}_2$  that will be produced/consumed. Results for a 3:1 biomass ratio of AMB-GM presented the highest maximum specific  $\text{CH}_4$  biodegradation rate. The pH increased as the cultivation time elapsed due to microalgal activity, which indicates that this parameter must be monitored and controlled within a range of 8–9.5 to ensure the optimal activity of both microbial groups.

The methanotrophs present in the AMB culture could potentially be used as a source for the production of a wide range of bioproducts and the microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM accumulates different valuable metabolites (Toledo-Cervantes et al., 2018). This is a first step to seek the optimization of cell growth conditions for the methanotrophs-microalgae co-cultures that can lead to a promising strategy to mitigate greenhouse gases such as  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  in one step, with the production of biomass and high added-value compounds.

#### CRedit authorship contribution statement

**Patricia Ruiz-Ruiz:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Tania L. Gómez-Borraz:** Conceptualization, Methodology, Investigation. **Sergio Revah:** Supervision, Resources, Writing - review & editing. **Marcia**

**Morales:** Conceptualization, Supervision, Resources, Writing - review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This study was funded by the National Science Foundation of Mexico (CONACyT) project PDCPN 2015\_241. Ruiz-Ruiz wishes to acknowledge the fellowship for her doctoral studies supported by CONACyT. The authors thank Sergio Hernández, Alexis Saldívar, and Marysol Bello for the technical support given and their contribution to the realization of this work.

#### References

- Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Grima, E.M., 2016. Supply of  $\text{CO}_2$  to closed and open photobioreactors. In: Slocombe, S.P., Benemann, J.R. (Eds.), *Microalgal Production for Biomass and High-Value Products*. CRC Press, Boca Raton, pp. 225–252.
- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J.C., Erable, B., 2019. Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>.
- AlSayed, A., Fergala, A., Eldyasti, A., 2018. Sustainable Biogas Mitigation and Value-Added Resources Recovery Using Methanotrophs Intergrated into Wastewater Treatment Plants, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9464-3>.
- Antony, C.P., Kumaresan, D., Ferrando, L., Boden, R., Moussard, H., Fernández Scavino, A., Shouche, Y.S., Murrell, J.C., 2010. Active methylotrophs in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem formed by meteor impact. *ISME J.* 4, 1470–1480. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.70>.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L., 2015. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 75, 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>.
- Badr, K., Hilliard, M., Roberts, N., He, Q.P., Wang, J., 2019. Photoautotroph-methanotroph coculture – a flexible platform for efficient biological  $\text{CO}_2$ - $\text{CH}_4$  co-utilization. *IFAC-PapersOnLine* 52, 916–921. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.179>.
- Beardall, J., Raven, J.A., 2016. Carbon acquisition by microalgae. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (Eds.), *The Physiology of Microalgae*. Springer, New York, pp. 89–99. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_4).
- Boden, R., 2012. Emended description of the genus *Methylophaga* Janvier et al. 1985. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1644–1646. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.033639-0>.
- Bowman, J.P., 2016. Methylococcaceae. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00225.pub2>.
- Cabrol, L., Malhautier, L., 2011. Integrating microbial ecology in bioprocess understanding: the case of gas biofiltration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 837–849. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3191-9>.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Cantera, S., Lebrero, R., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures. *J. Environ. Manag.* 171, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.002>.
- Cantera, S., Sánchez-Andrea, I., Sadornil, L.J., García-Encina, P.A., Stams, A.J.M., Muñoz, R., 2019. Novel haloalkaliphilic methanotrophic bacteria: an attempt for enhancing methane bio-refinery. *J. Environ. Manag.* 231, 1091–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.017>.
- Caporaso, J.G., et al., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Publ. Gr.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>.
- Caporaso, J.G., et al., 2011. Global patterns of 16S rRNA at a depth of diversity millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.100080107>.
- Chi, Z., O'Fallon, J.V., Chen, S., 2011. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol.* 29, 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.006>.
- Ciais, P., et al., 2013. Carbon and other biogeochemical cycles. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., et al. (Eds.), *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*.

- Cambridge University Press, pp. 465–570.
- Han, B., Chen, Y., Abell, G., Jiang, H., Bodrossy, L., Zhao, J., Murrell, J.C., Xing, X.H., 2009. Diversity and activity of methanotrophs in alkaline soil from a Chinese coal mine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70, 196–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00707.x>.
- Hanson, R.S., Hanson, T.E., 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471.
- Hill, E.A., Chrisler, W.B., Beliaev, A.S., Bernstein, H.C., 2017. A flexible microbial co-culture platform for simultaneous utilization of methane and carbon dioxide from gas feedstocks. *Bioresour. Technol.* 228, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.111>.
- Ho, A., De Roy, K., Thas, O., De Neve, J., Hoefman, S., Vandamme, P., Heylen, K., Boon, N., 2014. The more, the merrier: heterotroph richness stimulates methanotrophic activity. *ISME J.* 8, 1945–1948. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.74>.
- Hoegh-Guldberg, et al., 2018. Impacts of 1.5 °C global warming on natural and human systems. In: Masson Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H.O., Roberts, D., Skea, J., Shukla, P.R., et al. (Eds.), *Global Warming of 1.5 °C. An IPCC Special Report on the Impacts of Global Warming of 1.5 °C above Pre-industrial Levels and Related Global Greenhouse Gas Emission Pathways, in the Context of Strengthening the Global Response to the Threat of Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty*, pp. 175–311.
- Iguchi, H., Yurimoto, H., Sakai, Y., 2011. Stimulation of methanotrophic growth in cocultures by cobalamin excreted by rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8509–8515. <https://doi.org/10.1128/AEM.05834-11>.
- IPCC, 2014. *Climate change 2014: synthesis report*. In: Pachauri, R.K., Meyer, L.A. (Eds.), *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–112.
- Jeong, S.Y., Kim, T.G., 2019. Development of a novel methanotrophic process with the helper micro-organism *Hyphomicrobium* sp. NM3. *J. Appl. Microbiol.* 126, 534–544. <https://doi.org/10.1111/jam.14140>.
- Kalyuzhnaya, M.G., Khmel'nina, V., Eshinimaev, B., Sorokin, D., Fuse, H., Lidstrom, M., Trotsenko, Y., 2008. Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylobacterium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylobacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 591–596. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65317-0>.
- Kalyuzhnaya, M.G., Puri, A.W., Lidstrom, M.E., 2015. Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metab. Eng.* 29, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>.
- Kelly, D.P., Wood, A.P., 2010. Isolation and characterization of methanotrophs and methylotrophs: diversity of methylotrophic organisms and of one-carbon substrates. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pp. 3827–3845.
- Kraakman, N.J.R., Rocha-Rios, J., Van Loosdrecht, M.C.M., 2011. Review of mass transfer aspects for biological gas treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 873–886. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3365-5>.
- Lebrero, R., Volckaert, D., Pérez, R., Muñoz, R., Van Langenhove, H., 2013. A membrane bioreactor for the simultaneous treatment of acetone, toluene, limonene and hexane at trace level concentrations. *Water Res.* 47, 2199–2212. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.041>.
- López, J.C., Quijano, G., Souza, T.S.O., Estrada, J.M., Lebrero, R., Muñoz, R., 2013. Biotechnologies for greenhouse gases (CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, and CO<sub>2</sub>) abatement: state of the art and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2277–2303. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>.
- Martínez-Macías, R., Meza-Escalante, E., Serrano-Palacios, D., Gortáres-Moroyocui, P., Ruíz-Ruiz, P.E., Ulloa-Mercado, G., 2018. Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on *Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 585–590. <https://doi.org/10.1002/jctb.5405>.
- Morales, M., Cabello, J., Revah, S., 2015. Gas balances and growth in algal cultures. In: Prokop, A., Bajpai, R.K., Zappi, M.E. (Eds.), *Algal Biorefineries*. Springer International Publishing Inc, Switzerland, pp. 263–314.
- Myhre, G., et al. Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Midgley, B., 2013. Anthropogenic and natural radiative forcing. In: V. Midgley, P.M. (Eds.), *Climate Change 2013: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, pp. 659–740.
- Ordaz, A., López, J.C., Figueroa-González, I., Muñoz, R., Quijano, G., 2014. Assessment of methane biodegradation kinetics in two-phase partitioning bioreactors by pulse respirometry. *Water Res.* 67, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.054>.
- Pan, J., Wang, X., Cao, A., Zhao, G., Zhou, C., 2019. Screening methane-oxidizing bacteria from municipal solid waste landfills and simulating their effects on methane and ammonia reduction. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 37082–37091. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06545-5>.
- Patel, S.K.S., Kalia, V.C., Joo, J.B., Kang, Y.C., Lee, J.K., 2020. Biotransformation of methane into methanol by methanotrophs immobilized on coconut coir. *Bioresour. Technol.* 297, 122433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122433>.
- Patel, S.K.S., Kumar, V., Mardina, P., Li, J., Lestari, R., Kalia, V.C., Lee, J.K., 2018. Methanol production from simulated biogas mixtures by co-immobilized *Methylobacterium methanica* and *Methylocella trundae*. *Bioresour. Technol.* 263, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.096>.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- Rashid, N., Park, W.K., Selvaratnam, T., 2018. Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and bioflocculation. *Chemosphere* 194, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.108>.
- Rasouli, Z., Valverde-Pérez, B., D'Este, M., De Francisci, D., Angelidaki, I., 2018. Nutrient recovery from industrial wastewater as single cell protein by a co-culture of green microalgae and methanotrophs. *Biochem. Eng. J.* 134, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.010>.
- Shahid, A., Malik, S., Zhu, H., Xu, J., Nawaz, M.Z., Nawaz, S., Asraf Alam, M., Mehmood, M.A., 2020. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Sci. Total Environ.* 704, 135303. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135303>.
- Singh, R., Ryu, J., Kim, S.W., 2019. Microbial consortia including methanotrophs: some benefits of living together. *J. Microbiol.* 57, 939–952. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9328-8>.
- Stock, M., Hoefman, S., Kerckhof, F.M., Boon, N., De Vos, P., De Baets, B., Heylen, K., Waegeman, W., 2013. Exploration and prediction of interactions between methanotrophs and heterotrophs. *Res. Microbiol.* 164, 1045–1054. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.08.006>.
- Strong, P.J., Kalyuzhnaya, M., Silverman, J., Clarke, W.P., 2016. A methanotroph-based biorefinery: potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation. *Bioresour. Technol.* 215, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.099>.
- Toledo-Cervantes, A., Garduño Solórzano, G., Campos, J.E., Martínez-García, M., Morales, M., 2018. Characterization of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM for high-energy molecules accumulation: deeper insight into biotechnological potential of strains of the same species. *Biotechnol. Rep.* 17, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.11.009>.
- Toledo-Cervantes, A., Madrid-Chirinos, C., Cantera, S., Lebrero, R., Muñoz, R., 2017. Influence of the gas-liquid flow configuration in the absorption column on photosynthetic biogas upgrading in algal-bacterial photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 225, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.087>.
- Toledo-Cervantes, A., Morales, M., Novelo, E., Revah, S., 2013. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresour. Technol.* 130, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.081>.
- Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R.J., Estrada-Alvarado, I., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., Dendooven, L., Marsch, R., 2009. Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* 13, 609–621. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0244-4>.
- Van Der Ha, D., Bundervoet, B., Verstraete, W., Boon, N., 2011. A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of methane oxidizing communities and microalgae. *Water Res.* 45, 2845–2854. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.005>.
- Van Der Ha, D., Nachtergaele, L., Kerckhof, F.M., Rameiyanti, D., Bossier, P., Verstraete, W., Boon, N., 2012. Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13425–13431. <https://doi.org/10.1021/es303929s>.
- Webb, H.K., Ng, H.J., Ivanova, E.P., 2014. The family Methylocystaceae. In: *The Prokaryotes – Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 341–347. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_254](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_254).
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P.N.L., Tay, J.H., 2020. Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 118, 109563. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>.
- Zúñiga, C., Morales, M., Le Borgne, S., Revah, S., 2011. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Methylobacterium organophilum* isolated from a methanotrophic consortium in a two-phase partition bioreactor. *J. Hazard Mater.* 190, 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.011>.