

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD CUAJIMALPA

POSGRADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA  
IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

**“CAPTURA DE GASES DE EFECTO INVERNADERO POR CO-  
CULTIVOS DE BACTERIAS Y MICROORGANISMOS  
FOTOSINTÉTICOS: OPERACIÓN SOSTENIDA DE  
BIORREACTORES”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias Naturales e Ingeniería

PRESENTA:

Ing. Biol. Brenda Rodríguez Reyes

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesora: Dra. Marcia Guadalupe Morales Ibarría

Ciudad de México, 2024



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del programa de Maestría 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 del mes de agosto de 2021 a julio de 2023 en el Laboratorio de Bioprocesos y la Planta Piloto de Bioprocesos Dr. Sergio Revah M., del Departamento de Procesos y Tecnología de la DCNI.

### Agradecimientos de becas

El autor agradece la beca académica otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) para la realización de estudios de maestría (CVU1144663).

Así como, a la Universidad Autónoma Metropolitana por la beca para titulación de posgrado.

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 20 de mayo del año 2024, la que suscribe, Brenda Rodríguez Reyes, alumna del Programa de Maestría 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 presente idónea comunicación de resultados intitulada: **“Captura de gases de efecto invernadero por co-cultivos de bacterias y microorganismos fotosintéticos: operación sostenida de biorreactores”** realizada bajo la codirección del 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 del director del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [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.



---

**Brenda Rodríguez Reyes**



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La que suscribe, Brenda Rodríguez Reyes, alumna del Programa de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería, declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este 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 mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

---

**Brenda Rodríguez Reyes**

## DECLARACIÓN DE NO LUCRO

La que suscribe, Brenda Rodríguez Reyes alumna del Programa de Maestría 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 Brenda Rodríguez Reyes.



---

**Brenda Rodríguez Reyes**

## AGRADECIMIENTOS

---

---

Al Dr. Sergio Revah, quien confió en mí para desarrollar un proyecto de maestría, por su paciencia al explicarme cuando algo no me quedaba claro, por su apoyo constante y el enseñarme a analizar mejor las cosas. Le tengo un gran aprecio y admiración, sin duda me siento afortunada de haber sido su alumna.

A la Dra. Marcia, por su apoyo en el proyecto y por sus revisiones que me ayudaron a darme cuenta de mis errores y aprendí mucho de ello. Le agradezco que aceptara ser mi asesora.

A mi jurado evaluador la Dra. Irmene Ortiz, Dra. Teresa García y el Dr. José Félix Aguirre, por su tiempo, sus comentarios y sus correcciones, que me ayudaron a tener un mejor documento. A las Dras. Sylvie Le Borgne y Laura González por su ayuda en la extracción y purificación de las muestras de ADN. Al Mtro. Sergio Hernández quien me ayudó en la búsqueda de materiales y reactivos necesarios para realizar mis experimentos.

A la Dra. Patricia Ruiz, quien sin duda fue un gran ejemplo de profesionalismo y pasión por lo que hace. Pati, mil gracias por el apoyo brindado, por tus explicaciones, consejos y más aún el motivarme a seguir mi sueño de ser científica. Agradezco el haber tenido la oportunidad de conocerte y aprender de ti, te admiro y tengo Fe en que seguirás logrando muchas cosas.

A Geovanni, quien sin pensarlo se convirtió de un compañero de laboratorio a un amigo, a quien aprecio y admiro. Puede que seas un poco desordenado y a veces despistado, pero eres muy inteligente y de las personas que se, que lograra todo aquello que se proponga. Gracias por los ánimos, las pláticas, las discusiones científicas y las explicaciones, espero haber aportado algo a tu formación personal y académica; aunque siendo honesta, aprendí más yo de ti, que tú de mí.

A Alexis por su ayuda en el sistema Arduino y porque cuando tenía alguna duda me dabas unos minutos de tu atención para explicarme. A Jaqueline que tal vez no coincidimos mucho, pero me alegraban las pláticas que teníamos de vez en cuando.

A Néstor, por tu apoyo constante, tu paciencia, tu cariño, por siempre creer en mí y darme las palabras necesarias para no rendirme. Han sido muchos años compartidos y en cada uno de ellos agradezco infinitamente el coincidir en el camino. Gracias por estar cuando lo necesitaba, sabes que eres muy importante para mí.

A Verónica, porque eres de las personas que aún sin haber coincidido mucho en esta etapa, continuaste creyendo en mí y en que lograría llegar a la meta. Gracias por tu amistad.

A mis amigas de la gaceta Axcán UAM, Daniela y Adriana. Tuvimos momentos buenos y malos, algunos incluso sumamente estresantes, pero me siento feliz de haberlas conocido mejor y que entre nosotras nos diéramos ánimos para no rendirnos en este proceso.

A mi mamá, quien siempre me apoya en cada decisión, que confía en que puedo llegar lejos a cada paso que doy y sé, que siempre estará para mí. A mi hermana, que te diste el tiempo de ayudarme y diste tu punto de vista crítico desde otra rama de la ciencia. Sabes que eres muy inteligente y lograras grandes cosas si te lo propones, sabes que te quiero.

Y finalmente pero no menos importante a Fernanda, porque ha sido una amistad muy larga y en todo este tiempo y a tu manera, siempre me animas, me apoyas y me haces reír.

**A todos y cada uno de ustedes ¡muchas gracias!**

## ÍNDICE GENERAL

---

---

<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
1.1 Gases de efecto invernadero .....	12
1.1.1 Dióxido de carbono .....	13
1.1.2 Metano.....	14
1.1.3 Tecnologías de mitigación .....	15
1.2 Microorganismos metanotróficos .....	18
1.2.1 Metanótrofos facultativos.....	21
1.2.2 Productos de valor agregado .....	21
1.3 Microorganismos fotosintéticos.....	23
1.3.1 Clasificación de microorganismos fotosintéticos.....	24
1.3.2 Productos de valor agregado .....	25
1.4 Aplicación de co-cultivos .....	26
1.5 Antecedentes directos UAM.....	32
<b>CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	34
2.1 Justificación .....	34
2.2 Hipótesis .....	36
2.3 Objetivos.....	36
2.3.1 Objetivo general .....	36
2.3.2 Objetivos específicos.....	36
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA</b> .....	37
3.1 Microorganismos utilizados.....	37
3.1.1 Consorcio metanotrófico alcalófilo.....	37
3.1.2 Cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> UAM-C/S03 .....	37
3.2 Enriquecimiento de la población .....	38
3.3 Cinéticas en microcosmos a diferentes pH.....	39
3.4 Reactor de tanque agitado.....	39
3.5 Crecimiento en columna de burbujeo y conteo celular.....	42
3.6 Co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria en reactor de tanque agitado.....	43



3.7 Crecimiento del co-cultivo en microcosmos .....	44
3.8 Métodos analíticos .....	45
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>47</b>
4.1 Identificación del cultivo bacteriano.....	47
4.2 Cinéticas de consumo y generación a diferentes pH .....	50
4.3 Cinéticas de consumo a diferentes pH en reactor de tanque agitado .....	55
4.4 Crecimiento a pH 8.7 .....	60
4.5 Crecimiento en columna de la cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> UAM-C/S03 .....	65
4.6 Co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria en fotobiorreactor de tanque agitado.....	66
4.7 Crecimiento en microcosmos en condiciones de luz y oscuridad.....	74
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>82</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
ANEXO 1. Técnicas de perfil bioquímico.....	92
ANEXO 2. Árbol de abundancias del CMA-B.....	102
ANEXO 3. Curva de equilibrio carbonatos/bicarbonatos con respecto al pH.....	103
ANEXO 4. Gráfica de conteo celular vs biomasa de la cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> UAM–C/S03.....	103

## RESUMEN

---

Los gases de efecto invernadero (GEI) son los principales causantes del cambio climático y el calentamiento global. El CO<sub>2</sub> es considerado el principal GEI por contribuir en un 64% del total de emisiones, mientras que el CH<sub>4</sub>, posee un potencial de calentamiento 27-34 veces mayor que el CO<sub>2</sub>. Entre las tecnologías de tratamiento y mitigación, las alternativas biológicas presentan un especial interés, un ejemplo de ello es la utilización de co-cultivos bacterias metanotróficas-microorganismos fotosintéticos, como una propuesta novedosa para la mitigación de GEI y posible producción de moléculas de valor agregado.

En este trabajo, se enriqueció un consorcio metanotrófico alcalófilo y se caracterizó mediante cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub> a diferentes pH para calcular su capacidad de biodegradación, posteriormente fue crecido a pH 8.7 favoreciendo la limitación de nitrógeno para la determinación del perfil bioquímico. A la par, se monitoreo el crecimiento de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 por observación en microscopia y conteo celular. Posteriormente, en un fotobiorreactor de tanque agitado bajo una proporción 3:1, se evaluó el co-cultivo bacteria metanotrófica-cianobacteria mediante diferentes parámetros de operación por un periodo de 63 días. Finalmente, para determinar la limitación de O<sub>2</sub> en el sistema, se colocaron microcosmos bajo condiciones de luz y oscuridad por 28 horas a diferentes concentraciones de CH<sub>4</sub> (0, 10 y 17%).

Los resultados obtenidos revelaron una abundancia de 84.12% del filo proteobacteria, donde, los géneros *Methylocystis* y *Pseudoxanthomonas* fueron predominantes. Los experimentos realizados en botellas serológicas a diferentes pH mostraron tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub> más altas a pH 8.0 con  $77.45 \pm 15.25 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  al finalizar el primer ciclo y  $46.67 \pm 9.43 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  a pH 9.0 para el séptimo ciclo. Por otro lado, los resultados en el reactor de tanque agitado operado con valores de pH controlados a 8.0, 8.7, 9.4 y 10.0 mostraron que la mayor actividad se obtiene a un pH de 8.7 con tasas específicas de biodegradación de  $25.2 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$ . El nitrógeno total en este experimento se consumió en un 59.7% después de 11 días y el carbono inorgánico total disuelto en el medio de cultivo incrementó 107.6 veces desde el día de inoculación, alcanzando 817.6 mg/L.

En un nuevo experimento en el reactor de tanque agitado a pH 8.7 alimentado con 5% v/v de CH<sub>4</sub> en aire, se obtuvo una concentración de 1.14 g/L de biomasa con un consumo del 99.23% del nitrógeno total después de 27 días de operación. La composición bioquímica de la biomasa fue  $51.8 \pm 2.16$  % de proteínas,  $8.6 \pm 0.06$  % de carbohidratos y  $47.4 \pm 0.09$  % de productos intracelulares de reserva. Para la replicación de este experimento durante 21 días de crecimiento, se alcanzó una concentración de 0.93 g/L con un consumo de 62.96% de nitrógeno total, la tasa máxima de biodegradación fue  $9.62 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$ , las proporciones de proteínas y carbohidratos fueron  $60.8 \pm 3.60\%$  y  $9.3 \pm 0.28\%$  respectivamente, mientras que, para lípidos el valor máximo registrado fue  $15.3 \pm 3.26$  %.

El co-cultivo del consorcio metanotrófico-cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 en un fotobiorreactor de tanque agitado, presentó modificaciones en tiempos de alimentación de 3 minutos cada 6 horas hasta 1 minuto cada 10 horas, así como velocidades de agitación de 500-700 rpm. Al finalizar el experimento, el co-cultivo alcanzó una concentración de 4.11 g/L de biomasa, donde 3.62 g pertenecen al consorcio metanotrófico, una concentración de biomasa siete veces mayor a la concentración de cianobacterias. Por otra parte, los microcosmos en condiciones de luz y oscuridad permitieron identificar la posible causa de la limitación de O<sub>2</sub> ocasionado por una baja concentración de cianobacterias en el co-cultivo.

Los experimentos realizados en este trabajo permitieron obtener un consorcio metanotrófico alcalófilo con potencial de acumulación de proteínas y productos intracelulares de reserva con posible aplicabilidad industrial, del mismo modo, se logró identificar los parámetros a considerar previo a la evaluación de un co-cultivo para encaminar a una operación sostenida, que involucre crecimiento en reactores y periodos de al menos dos meses, entre estos parámetros se encuentra la necesidad de determinación de proporciones bacteria:cianobacteria, el pH y temperatura óptimos de crecimiento y la intensidad de luz suministrada al microorganismo fotosintético.

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Gases de efecto invernadero

El efecto invernadero es un fenómeno natural donde los gases acumulados en la atmósfera de la Tierra denominados gases de efecto invernadero (GEI) como el vapor de agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), metano (CH<sub>4</sub>), ozono (O<sub>3</sub>) y clorofluorocarbonos (CFC), atrapan el calor reflejado por la superficie terrestre en forma de radiación infrarroja contribuyendo a mantener un ambiente cálido en la Tierra; lo que ha exacerbado el calentamiento global y el cambio climático (IPCC, 2007).

El CO<sub>2</sub> es considerado el principal GEI al ser mayormente emitido de manera antropogénica, contribuir en un 64% al total de emisiones globales y mantener un aumento del  $\geq 0.5\%$  anualmente (IEA, 2023). Durante el año 2020 eventos como la pandemia por el virus Sars-Cov-2 (Covid-19), favorecieron a la disminución de emisiones en 5.3%, posterior a ello y debido a la reactivación de la actividad económica, durante el año 2023 se presentó un incremento de emisiones en 1.1%, finalizando el mismo año con una concentración atmosférica global de 421.23 ppm (Crippa *et al.*, 2022; IEA, 2023; NOAA, 2023).

El segundo GEI más importante es el CH<sub>4</sub>, que a pesar de ser emitido en 10-16% del total de emisiones globales, presenta un potencial de calentamiento global 27-34 veces mayor en un periodo de 100 años comparado con el CO<sub>2</sub> (Guerrero *et al.*, 2021). Las concentraciones atmosféricas reportadas para 2020 y 2021 presentaron un aumento de 15.2 y 17.8 ppb respectivamente, una concentración no registrada desde el año 1980; y para finales del 2023 la concentración total atmosférica reportada alcanzó 1932.23 ppb (NOAA, 2023b; Skeie *et al.*, 2023).

Dentro de las acciones a nivel global para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, se encuentran las pactadas durante la 26a Conferencia de las Partes (COP 26) de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, celebrada en Glasgow, Escocia, en el 2021, donde se estableció la creación del observatorio internacional de emisiones de CH<sub>4</sub>, proyecto liderado por Estados Unidos y la Unión Europea para contar con un registro público mundial y preciso proveniente

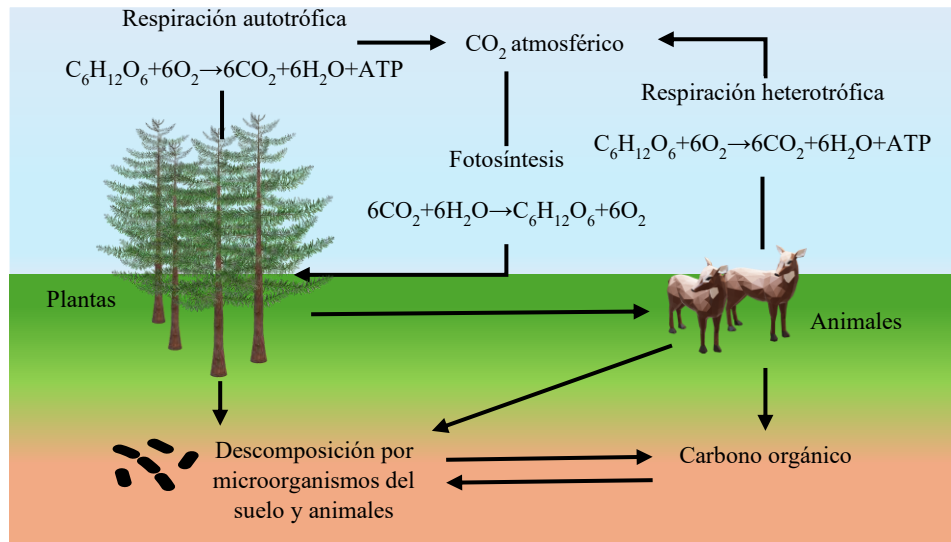
de informes de la asociación de petróleo y gas metano 2.0 (OMGP 2.0), datos de estudios científicos, de teleobservación e inventarios nacionales. A su vez, se espera contar con una disminución del 30% de las emisiones de CH<sub>4</sub> para 2030, donde se han sumado 150 países al compromiso mundial del metano, alcanzando dicho objetivo mediante la acción en sectores de petróleo, gas, agricultura y residuos (ONU, 2021b). Además, se pactó la reducción del uso de carbón, principalmente por los países dependientes para la generación de electricidad, disminuir los subsidios a combustibles fósiles y mantener una transición hacia energías limpias.

Todos estos esfuerzos representan la oportunidad de limitar la temperatura mundial para 2050, pero considerando que existe un 50% de probabilidad de que la temperatura media anual sobrepase 1.5 °C en las próximas dos décadas, es necesario una disminución del 55% de emisiones totales para limitar un aumento máximo de 2°C, así como esfuerzos por parte de México para contribuir a la mitigación de GEI (UNEP, 2021).

### **1.1.1 Dióxido de carbono**

El CO<sub>2</sub> es considerado el principal GEI con un tiempo de vida de 100 años en la atmósfera terrestre (AlSayed *et al.*, 2019). Molecularmente posee dos átomos de oxígeno unidos mediante dobles enlaces a un átomo de carbono, es más pesado que el aire y tiene una solubilidad en agua de 1.48 mg/mL. Dentro de las aplicaciones industriales, es añadido a bebidas carbonatadas, usado para control de reacciones químicas y producción de extintores de incendios.

De manera natural, es emitido en el ciclo biogeoquímico del carbono (Figura 1.1) y de manera antropogénica está presente en la quema de combustibles fósiles como carbón (40%), gas natural, petróleo y transporte (28%), reacciones químicas como la fabricación de cemento (20%) y prácticas agrícolas (12%). Los países con mayor emisión de dióxido de carbono antropogénico a nivel global son: China, Estados Unidos, India y Rusia (Crippa *et al.*, 2022).

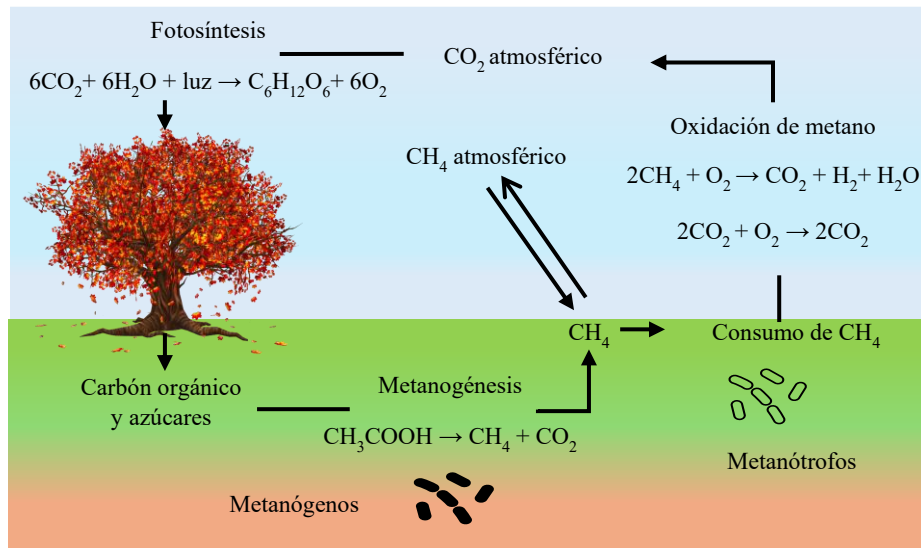


**Figura 1.1** Ciclo biogeoquímico del carbono (Modificado de Singh *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Metano

El CH<sub>4</sub> es un GEI de vida corta con ~12 años que aporta el 40% del calentamiento atmosférico, por lo que su mitigación permitiría limitar el calentamiento global a corto plazo (AlSayed *et al.*, 2019; ONU, 2021a). Molecularmente presenta un único carbono unido por enlaces covalentes a cuatro átomos de hidrógeno, su solubilidad en agua incrementa al elevar la presión y disminuye al incrementar la temperatura, es decir, es regido por la ley de Henry (22 mg/L en estado puro, 20°C y 1 atm). Es aplicado como combustible fósil, forma parte del gas natural en un 85%, del biogás en un 75% y combinado con aire presenta un límite de explosividad entre 5-15%.

De manera natural está presente mediante el ciclo biogeoquímico del metano (Figura 1.2), donde las emisiones naturales más comunes son: pantanos, volcanes y humedales que representan el 40% del total de emisiones, mientras que, las emisiones antropogénicas provienen de rumiantes (32%), subproductos de petróleo (23%), plantas de tratamiento de aguas residuales (20%), minas (12%), arrozales (8%) e industria y transporte (2%). Se estima que a nivel global los países que contribuyen en mayor medida a la generación de este GEI son: Estados Unidos, Rusia, India, Brasil, Indonesia, Nigeria y México (EPA, 2021 ; ONU, 2021a).



**Figura 1.2** Ciclo biogeoquímico del metano (Modificado de Singh *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Tecnologías de mitigación

Existen dos clases de tecnologías para la reducción de GEI, las primeras clasificadas en el orden fisicoquímico, estas son consideradas ineficientes debido al alto costo económico, demanda de recursos y energía, así como, la generación de subproductos que afectan al medio ambiente. Algunos ejemplos de estas tecnologías son aquellos centrados en sistemas catalíticos como zeolitas para conversión de  $\text{CH}_4$ , las cuales presentan limitaciones como su irreversibilidad, y la destilación criogénica para  $\text{CO}_2$  que puede operar a presión atmosférica, pero requiere alta energía para el proceso de enfriamiento (Mitra *et al.*, 2022; Samanta & Sani, 2023).

En contraste, las tecnologías biológicas son novedosas al ser económicas, hacen uso de condiciones ambientales, presión y temperatura no necesariamente extremas, no utilizan sustancias peligrosas y son factibles para generación de productos de valor agregado (AlSayed *et al.*, 2018). Un ejemplo son los co-cultivos con crecimiento simbiótico que permite la captura y oxidación simultánea de GEI y la ingeniería genética como la inducción de mutaciones a *Escherichia coli* para una dependencia hacia la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa “Rubisco” así como, bacterias metanotróficas con aplicación en biorremediación y degradación de  $\text{CH}_4$  en plantas de tratamiento de aguas residuales.

En la Tabla 1.1 se enlistan algunas de las tecnologías fisicoquímicas y biológicas para captura y mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

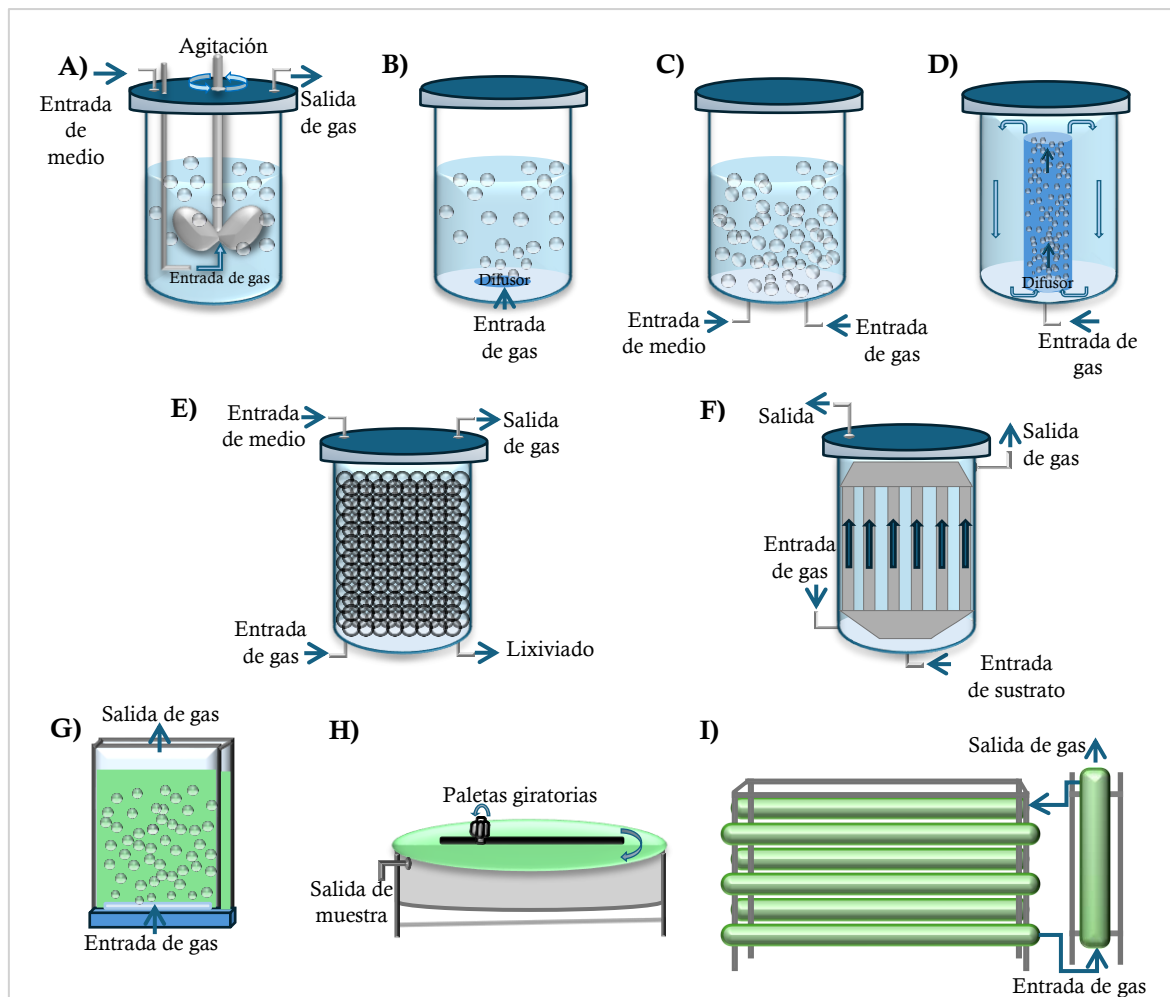
**Tabla 1.1** Tecnologías de captura y mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por procesos fisicoquímicos y biológicos (Mitra *et al.*, 2022; Samanta & Sani, 2023).

Tipo	Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )		Metano (CH <sub>4</sub> )	
	Tecnologías	Descripción	Tecnologías	Descripción
Fisicoquímico	Lavado químico	Se realiza mediante absorción, en donde la finalidad es disolver el gas en líquido.	Oxidación química	Hacen uso de catalizadores de paladio, platino y rodio que activan el enlace C-H para promover la oxidación.
	Carbón activado	Alternativa de adsorción que se produce mediante activación física o química.	Minerales de zeolita	Las zeolitas permiten una destrucción catalítica, además de convertir el metano en metanol.
	Destilación criogénica	Se aplican ciclos de condensación-vaporización, para generar un fluido y finalmente ser destilado.	Separación criogénica	El metano es comprimido para aumentar la presión y finalmente licuarlo.
Biológico	Microalgas y cianobacterias	El proceso fotosintético permite la captura de CO <sub>2</sub> el cual es mayor que en plantas terrestres y su crecimiento puede ocurrir en diferentes sistemas.	Co-cultivos	Las interacciones heterótrofas permiten la oxidación de GEI. Un ejemplo es aplicación del co-cultivo bacteria-cianobacteria.
	Bacterias	Solo se pueden utilizar aquellas con capacidad de fijación de CO <sub>2</sub> en condiciones anaerobias.	Ingeniería genética	Se realiza modificación dirigida a dominios catalíticos, para mejorar el proceso de oxidación de metano en bacterias.

Una herramienta importante para las tecnologías biológicas y que permite la mitigación y captura de corrientes de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> son los biorreactores, los cuales se han diseñado de



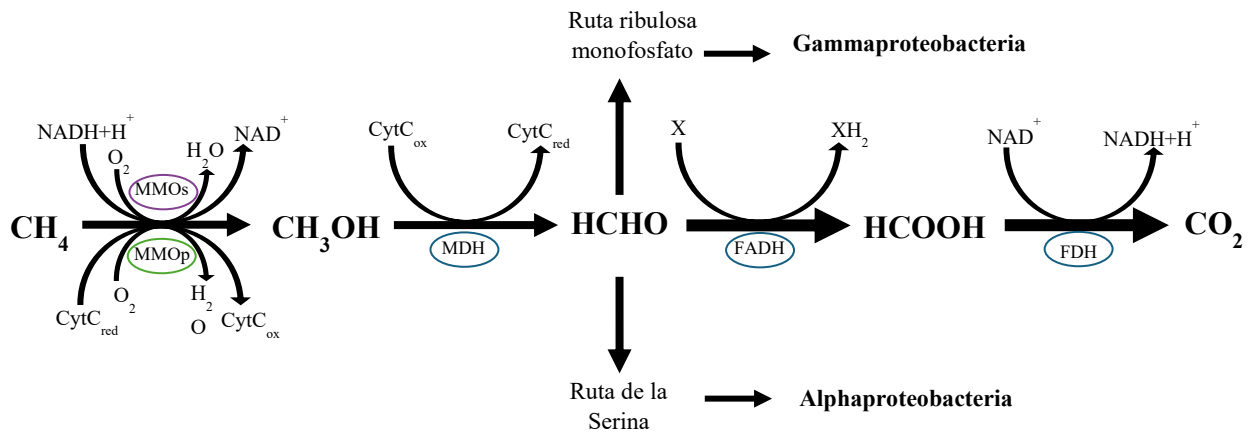
diferentes maneras de acuerdo con la literatura. Específicamente para CH<sub>4</sub> se han propuesto: tanques agitados, columnas de burbujeo, reactor de lecho fluidizado, reactor de lecho empacado, biorreactor de membrana y airlift. Mientras que, para captura de CO<sub>2</sub> se han implementado: columnas de burbujeo, estanques tipo raceway, reactores de placa plana y reactores tubulares. Cabe destacar que cada configuración del biorreactor estará delimitada por el objetivo del proyecto de investigación, la concentración de gas y los microorganismos a utilizar. Los diferentes tipos de biorreactores se muestran en la Figura 1.3.



**Figura 1.3** Tipos de reactores utilizados para captura y mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. A) Tanque agitado, B) Columna de burbujeo, C) Lecho fluidizado, D) Airlift, E) Lecho empacado, F) Membrana, G) Placas planas, H) Tanque Raceway, I) Tubular (Modificado de López *et al.*, 2013; Mühlemeier *et al.*, 2018; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020).

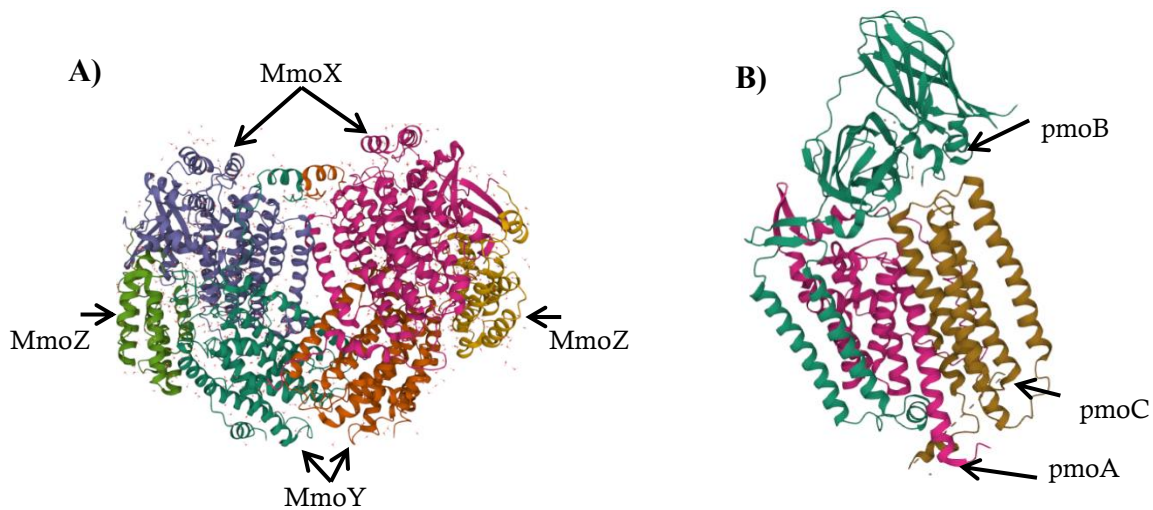
## 1.2 Microorganismos metanotróficos

Los metanótrofos son un subconjunto de los metilótrofos con capacidad de utilizar el metano como única fuente de carbono y energía, estas bacterias gram-negativas aerobias, realizan la oxidación de metano a metanol a partir de la enzima metano monooxigenasa dependiente de oxígeno (MMO), para posteriormente hacer la conversión a formaldehído que es oxidado en formiato y  $\text{CO}_2$ , al mismo tiempo que utilizan alternativamente las vías de la serina y ribulosa 5-fosfato para producción de biomasa (Figura 1.4) (Jawaharraj *et al.*, 2020).



**Figura 1.4** Vía de oxidación de metano en bacterias metanotróficas (Modificado de Hanson & Hanson, 1996).

El proceso de oxidación del metano, requiere dos moléculas de oxígeno por cada molécula de metano, para generar una molécula de dióxido de carbono y dos de agua, así como, la enzima metano monooxigenasa (MMO) característica en bacterias metanotróficas en dos conformaciones posibles: la forma soluble (MMOs) situada en el citoplasma (Figura 1.5A) que cuenta con un centro catalítico de hierro y la forma particulada (MMOp) acoplada a la membrana intracelular que posee un centro catalítico de cobre (Figura 1.5B). En su mayoría las bacterias metanotróficas cuentan con la enzima MMOp, aunque existen excepciones donde se cuenta con ambas formas de la enzima o bien, se limita a la MMOs, siendo mediada la regulación de la actividad enzimática por la disponibilidad de cobre en el medio.



**Figura 1.5** A) Estructura de la MMOs (Modificado de Protein Data Bank PDB, código de acceso 1MMO). B) Estructura de la MMOp (Modificado de Protein Data Bank PDB, código de acceso 1YEW).

Las bacterias metanotróficas emplean dos rutas metabólicas diferentes para la generación de biomasa, clasificándolas en los filos *proteobacteria* y *verrucomicrobia*. El filo *proteobacteria* cuenta con las clases *Gammaproteobacteria*, que utiliza la ruta de monofosfato de ribulosa para asimilación de formaldehído y *Alphaproteobacteria* que utiliza la vía de la serina. En contraste el filo *Verrucomicrobia* posee algunos genes de la ruta de la serina, sin embargo, emplea la ruta Calvin-Benson-Bassam para fijación de CO<sub>2</sub> y son encontrados en ecosistemas geotérmicos teniendo la capacidad de crecer a altas temperaturas y pH ácidos (Schmitz *et al.*, 2021).

Existen casos particulares como el género *Candidatus Methylomirabilis oxyfera*, considerada como la única bacteria metanotrófica anaerobia conocida incluida al filo NC10 que utilizan la ruta metabólica de Calvin Benson-Bassham (CBB), además de acoplar la oxidación de CH<sub>4</sub> con la reducción de nitrito (Schmitz *et al.*, 2021 ; AlSayed *et al.*, 2018).

En la Tabla 1.2 se enlistan las principales características de las bacterias metanotróficas de acuerdo con su clasificación.

**Tabla 1.2** Características de las bacterias metanotróficas de acuerdo con su clasificación (AlSayed *et al.*, 2018; Schmitz *et al.*, 2021; Semrau *et al.*, 2011).

Características	Gammaproteobacteria	Alphaproteobacteria	Verrucomicrobia
Principales familias	<i>Methylococcaceae</i> <i>Methylothermaceae</i>	<i>Beijerinckiaceae</i> <i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylacidiphilaceae</i>
Principales géneros	<i>Methylomonas</i> <i>Methylobacter</i> <i>Methylomicrobium</i> <i>Methylococcus</i> <i>Methylomagnum</i> <i>Methylosphaera</i> <i>Methylocaldum</i> <i>Methyloglobus</i> <i>Methylosarcina</i> <i>Methyloprofundus</i> <i>Methylothermus</i> <i>Methylohalobius</i> <i>Methylogaea</i> <i>Methylosoma</i> <i>Methylomarinum</i> <i>Methylovulum</i> <i>Methylomarinovum</i> <i>Methyloparacoccus</i>	<i>Methylosinus</i> <i>Methylocystis</i> <i>Methylocapsa</i> <i>Methylocella</i> <i>Methyloferula</i>	<i>Methylacidiphilum</i> <i>Methylacidimicrobium</i>
Ácidos grasos	16 C	18 C	Saturados
Formación intracitoplasmática	Discos vesiculares	A lo largo de la periferia celular	Carente de membrana
Tamaño del genoma (Mpb)	3.3-5.1	3.3-5.1	2.2-2.5
Ruta metabólica para asimilación de biomasa	Monofosfato de ribulosa	Serina	Calvin Benson-Bassham (CBB)
Tasas de crecimiento (h <sup>-1</sup> )	0.3 - 0.2	0.18 – 0.15	0.013 – 0.07
pMMO	+	+	+
sMMO	Varía entre especies	Varía entre especies	-
pH	Básico	Básico	Ácido
Crecimiento con metano	+	+	+

Crecimiento con metanol	+	+	+
Oxidación de metano	Baja	Alta	N. I
Clasificación de acuerdo con la temperatura	Mesófilos Psicrófilos	Mesófilos	Hipertermófilos
Lugar natural de crecimiento	Agua dulce Aguas termales Vertederos Minas de carbón	Agua dulce Campos de arroz Vertederos Humedales	Volcanes

+: afirmativo, -: negativo, N.I: no identificado

### 1.2.1 Metanótrofos facultativos

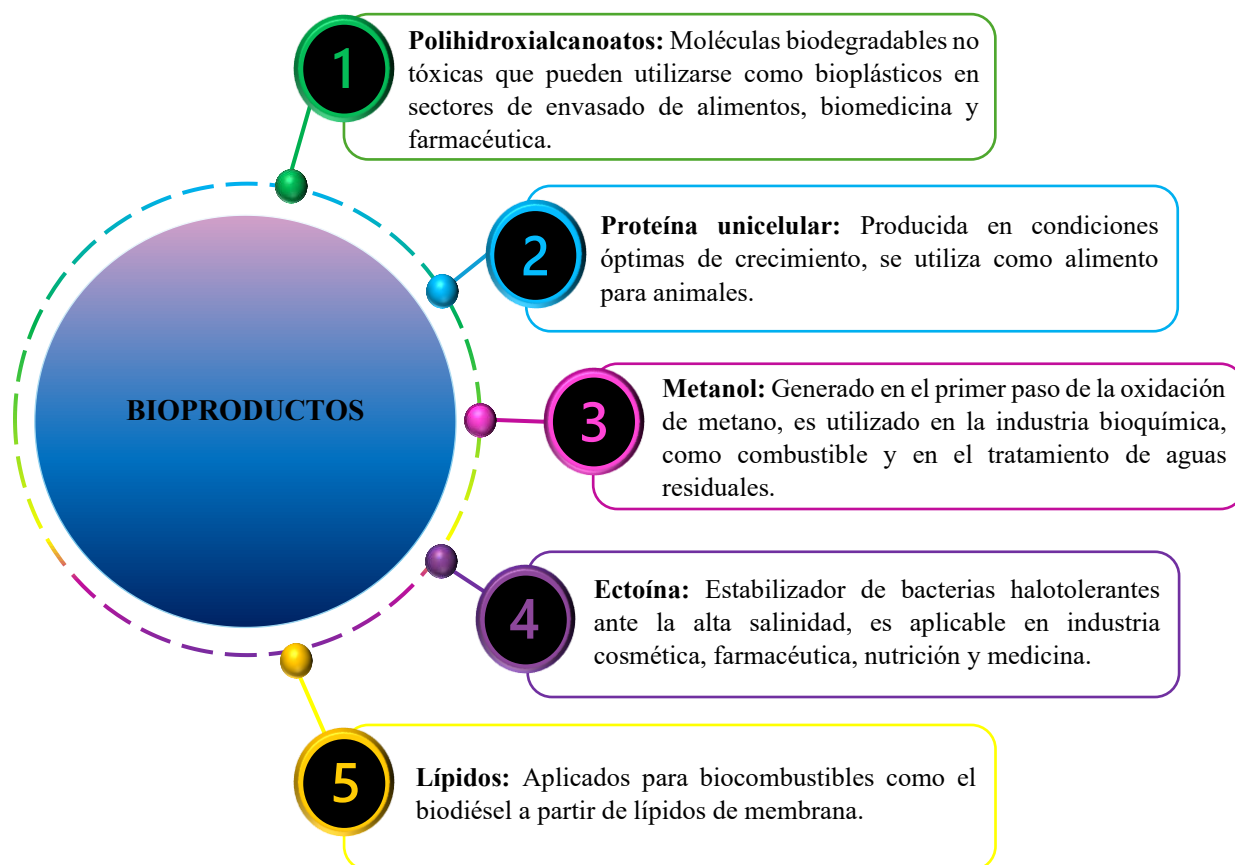
Los metanótrofos facultativos tienen capacidad de asimilación de compuestos multicarbonados (enlace C-C) para su crecimiento, como azúcares, cas-aminoácidos, ácidos orgánicos, entre otros. Aquellas cepas que han mantenido la capacidad de oxidación y crecimiento en acetato se han centrado en el género *Alphaproteobacteria*, gracias a su asimilación de carbono a biomasa por la ruta de la serina, que posee intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Para metanótrofos *Gammaproteobacteria* que utilizan la ruta de monofosfato de ribulosa, no se han identificado especies facultativas. Del mismo modo, cepas como *Methylobacterium organophilum* que ha perdido la capacidad de oxidar CH<sub>4</sub> después de ser crecida continuamente en glucosa, son consideradas metanótrofos no facultativos (Semrau *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Productos de valor agregado

Las bacterias metanotróficas, son catalizadores naturales que producen biomasa y productos de valor agregado, sin necesidad de inversión de alta energía como ocurre en los procesos industriales. Algunos bioproductos generados por metanótrofos aerobios son los biopolímeros como PHB, acumulados en respuesta a la limitación de nutrientes y suficiencia de carbono; especies como *Methylocystis parvus* presentan la capacidad de acumular PHB en un 50-70% y *Methylocystis hirsuta* en un 45% en peso (Gęsicka *et al.*, 2021; Wendlandt *et al.*, 2010). La proteína unicelular de metanótrofos, presenta mayores porcentajes de acumulación comparado con levaduras y hongos; por ende, para esta finalidad se prefiere de bacterias con alta tasa de crecimiento como *Methylococcus capsulatus* que acumula proteínas

en un 70% en peso seco. El metanol generado durante la oxidación de CH<sub>4</sub> también es un producto de interés industrial, sin embargo, requiere inhibidores para su acumulación como NaCl y EDTA (Gęsicka *et al.*, 2021; Guerrero-Cruz *et al.*, 2021). La ectoína considerada un osmoprotector de bacterias para mantener el equilibrio osmótico, puede ser acumulada por metanótrofos halotolerantes en un 12-20% y finalmente la acumulación de lípidos de metanótrofos aplicados a la generación de biocombustibles pueden ser acumulados en un 20% (Jawaharraj *et al.*, 2020; Khmelenina *et al.*, 2015).

Algunas de las aplicaciones industriales de los bioproductos anteriormente mencionados, se muestran en la Figura 1.6.

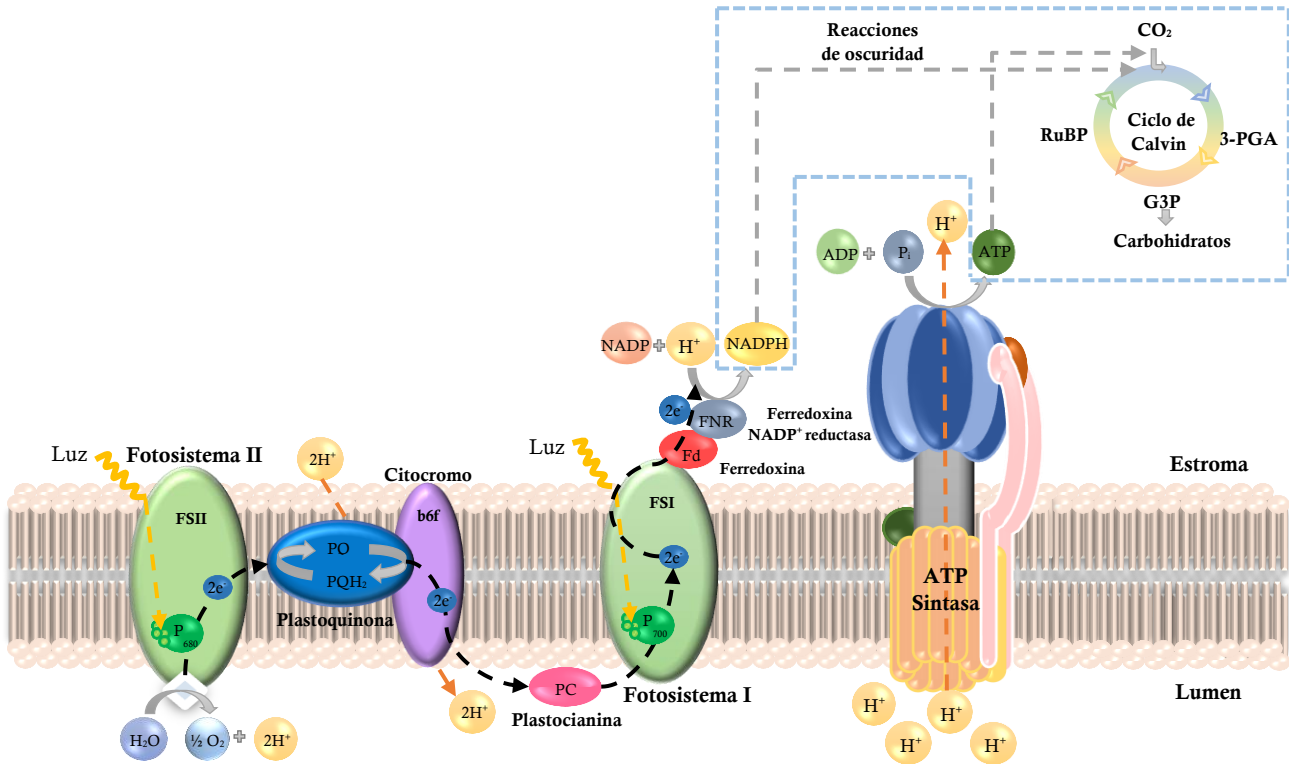


**Figura 1.6** Productos de valor agregado por bacterias metanotróficas.

### 1.3 Microorganismos fotosintéticos

Los microorganismos fotosintéticos cuentan con estructura unicelular y pluricelular, pueden vivir en diferentes ambientes y mediante el proceso fotosintético fijan el  $\text{CO}_2$  atmosférico a la vez que generan  $\text{O}_2$ , ATP y NADPH en presencia de luz (Figura 1.7). Bajo condiciones de oscuridad consumen ATP y NADPH para la conversión de carbono inorgánico en carbohidratos.

Su aplicación biotecnológica ante emisiones de GEI, considera características como: especie, intensidad de luz, fuente de suministro de  $\text{CO}_2$ , temperatura, tipo de biorreactor y posibles contaminaciones (Morales *et al.*, 2018).



**Figura 1.7** Proceso de fotosíntesis oxigénica. Los acrónimos mostrados son: clorofila Abs680 (P680), clorofila Abs700 (P700), plastoquinona (PQ), plastoquinol ( $\text{PQH}_2$ ), complejo citocromo (b6f), dinucleótido nicotinamida adenina (NADP), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), adenosín difosfato (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), ácido 3-fosfoglicerido (3-PGA), gliceraldehído 3-fosfato (G3P), ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP), (Elaboración propia).

### **1.3.1 Clasificación de microorganismos fotosintéticos**

Los microorganismos fotosintéticos, son un grupo de organismos clasificados en: *Chlorophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Pyrrophyta*, *Chrysophyta*, *Heterokontophyta*, *Dinophyta* y *Bacillariophyta* (Graham, 2009; Maghzian *et al.*, 2024). Cuentan con diferentes mecanismos de división: fisión binaria, fisión múltiple y mezcla de fisiones, pueden crecer de 10 a 50 veces más rápido que las plantas terrestres mediante agua dulce, salada o residual, son aplicados en diferentes procesos biotecnológico y dada su organización celular, se clasifican en cianobacterias procariontas y microalgas eucariotas (Graham, 2009).

#### **Microalgas**

Actualmente se han reportado más de 200 000 tipos de microalgas de las cuales, se ha identificado que pueden presentar tres formas de metabolismo: 1) autótrofo en donde se obtiene la energía a partir de luz solar y su fuente inorgánica de carbono es el CO<sub>2</sub> o bicarbonatos, 2) heterótrofo donde se benefician de materia y carbono orgánicos, 3) mixótrofo que involucra una combinación de los dos metabolismos anteriores (Singh & Saxena, 2015).

Dentro de las ventajas que se pueden obtener mediante el uso de microalgas se encuentra la generación de biomasa, biorremediación de aguas residuales, captura de CO<sub>2</sub> y producción de bioenergía, sin embargo, factores como el exceso de luz pueden causar fotoinhibición, es decir daño en el fotosistema II, algunas especies presentan baja tolerancia al CO<sub>2</sub> lo que puede provocar muerte celular y los cambios en factores ambientales alteran el crecimiento (Calijuri *et al.*, 2022; Maghzian *et al.*, 2024).

#### **Cianobacterias**

Las cianobacterias son microorganismos procariontes Gram negativos conocidas anteriormente como bacterias verde-azules (*Cyanophyta*), poseen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, la cual es similar a las microalgas con la diferencia de poseer un complejo proteico denominado ficobilisoma que es el encargado de captar luz, esta variabilidad se debe a la ausencia de clorofila b, por tanto, dependen únicamente de la clorofila a (García-Pichel, 2009).



Cuentan con tamaños que varían entre 1-100  $\mu\text{m}$ , presentan morfología variada (esférica, varilla y espiral), pueden ser unicelulares, coloniales o filamentosas y se encuentran presentes en diferentes ambientes desde agua dulce y salada, hasta hábitats extremos (Dvorák *et al.*, 2017; Singh & Montgomery, 2011). Dentro de sus principales características se encuentra su alta tolerancia a diferentes pH, su capacidad de producción de toxinas, antibióticos y hormonas, son claves en el proceso de fijación de nitrógeno y pueden producir carotenoides, antioxidantes, vitaminas, polímeros, entre otros.

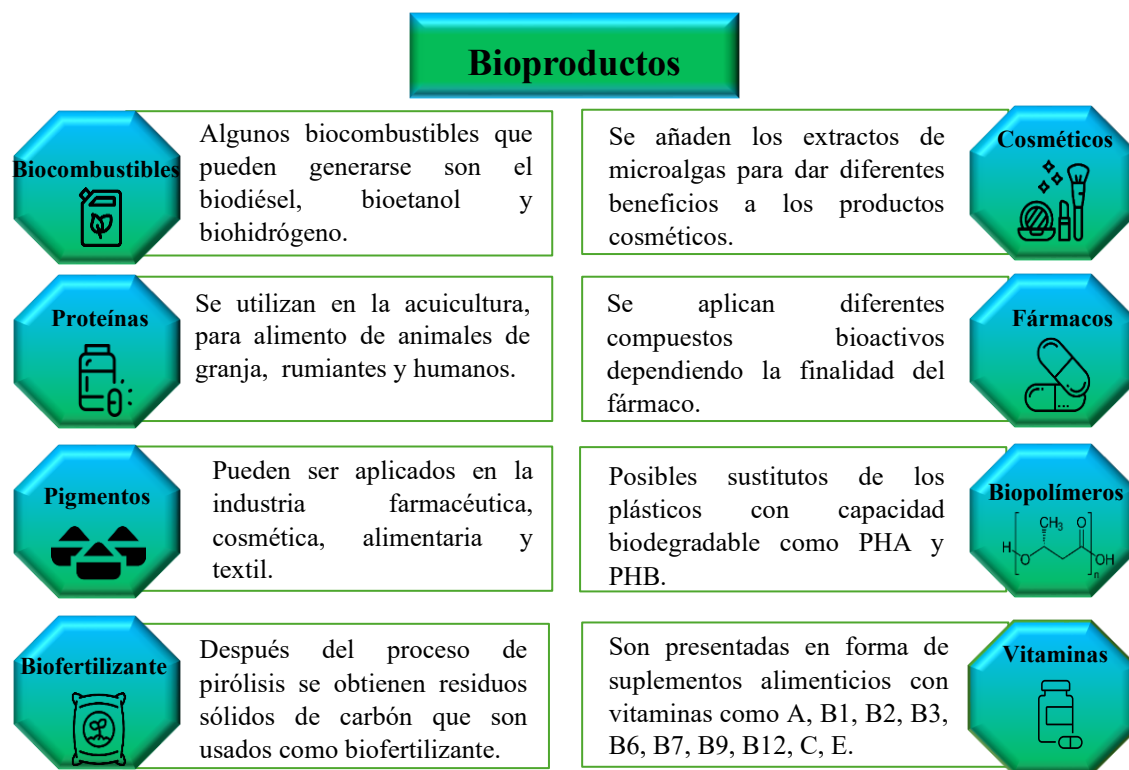
La cianobacteria *Synechococcus* es considerada el microorganismo más abundante y antiguo en el planeta con una morfología que puede ser unicelular o filamentosa, dentro de su clasificación se encuentran especies como *Synechococcus elongatus* PCC 6803, PCC 7942 y PCC 7002, cianobacterias de agua dulce que han sido consideradas microorganismos modelo para el estudio de otras especies (Dvorák *et al.*, 2017).

### **1.3.2 Productos de valor agregado**

Las microalgas y cianobacterias tienen la capacidad de generar metabolitos primarios (esenciales para el microorganismo) y secundarios (compuestos funcionales) con potencial de aplicación en la industria (Figura 1.8). Entre los metabolitos primarios se encuentran las proteínas acumuladas en 5-74% las cuales pueden ser adicionadas a los alimentos; los lípidos que se acumulan entre 7-65%, y pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles de tercera generación como el biodiésel; los carbohidratos que se acumulan de 3-69% con especial interés para la producción de biohidrógeno como combustible y las vitaminas acumuladas de 1-14% que presentan beneficios para la salud humana (Calijuri *et al.*, 2022).

Para los metabolitos secundarios se encuentra la producción de biofertilizantes, a partir de los compuestos de carbono orgánico excretados por las cianobacterias, diferentes pigmentos como los carotenoides ( $\beta$ -caroteno y astaxantina) que se utilizan como antioxidantes o para prevención del daño oxidativo de los alimentos y las ficobilinas, que se encuentran en el estroma del cloroplasto y se usan en la industria como colorantes y marcadores fluorescentes de biología molecular (Mobin *et al.*, 2019; Ramanan *et al.*, 2016).

De igual manera, para aplicaciones en cosmética se adicionan extractos de microalgas a diferentes productos como limpiadores, cicatrizantes y antimicrobianos, mientras que, para fármacos se pueden aplicar los compuestos bioactivos como vitamina E, ácido oleico y ácido palmitoleico. Finalmente, los biopolímeros acumulados principalmente por cianobacterias son una alternativa ecológica ante los plásticos derivados del petróleo (de Souza *et al.*, 2019; Mobin *et al.*, 2019).



**Figura 1.8** Productos de valor agregado de microalgas.

#### 1.4 Aplicación de co-cultivos

La simbiosis de microorganismos es común en la naturaleza, lo que da paso a interacciones que pueden favorecer o disminuir el crecimiento de las especies. Cuando el crecimiento se ve favorecido, se dice que existen interacciones sinérgicas como el mutualismo en donde los microorganismos se sustentan por la actividad del otro. Un ejemplo es la liberación de moléculas orgánicas por los microorganismos fotosintéticos que a su vez son utilizados para el crecimiento bacteriano o bien el suministro de vitamina B12 para el crecimiento de

microalgas/cianobacterias, a cambio de carbono orgánico (Ramanan *et al.*, 2016; Subashchandrabose *et al.*, 2011). Por otro lado, cuando los microorganismos no se benefician ni se perjudican, se habla de neutralismo y cuando solo uno se ve beneficiado mientras el otro está en desventaja, será considerado parasitismo o depredador-presa (Zuñiga *et al.*, 2017).

Esta diversidad de interacciones ha permitido el estudio de co-cultivos que involucran dos o más microorganismos y los cuales cuentan con objetivos variados como generación de proteína unicelular, acumulación de biopolímeros y captura simultánea de GEI. Además de utilizar diferentes medios de crecimiento o fuentes de nutrientes, como aguas residuales, sales de nitrato y sales de amonio.

Dentro de las investigaciones más prometedoras para la aplicación ambiental, se encuentra la captura de GEI mediante un cultivo de bacterias metanotróficas con capacidad de degradación de CH<sub>4</sub>, acoplado con un cultivo fotoautótrofo que realiza fotosíntesis oxigénica para la captura de CO<sub>2</sub>, dando como resultado una disminución en el porcentaje de emisiones de GEI, a la par que permiten la generación de bioproductos de interés industrial. Estos co-cultivos pueden ser evaluados en diferentes sistemas, ya sea en un sistema integrado que permite crecimiento rápido de ambos cultivos, mayor producción de O<sub>2</sub> y reducción de costos del sistema, o bien, sistemas de cultivos individuales o secuenciales donde las tasas de crecimiento varían de acuerdo con cada especie y no se llevan a cabo procesos acoplados (Badr *et al.*, 2019).

En la Tabla 1.3 se muestra una recopilación bibliográfica sobre co-cultivos bacteria metanotrófica-microalga y bacteria metanotrófica-cianobacteria, reportados en la última década, indicando las condiciones de operación, los microorganismos utilizados y los resultados obtenidos. Sin embargo, estas investigaciones se ven limitadas a 11 trabajos, lo que señala poca investigación en el tema y la posibilidad de desarrollar nuevos proyectos de co-cultivos que permitan entender mejor el comportamiento entre microorganismos metanotróficos y fotosintéticos.

De igual manera, dentro de los trabajos referenciados existen varias características en común, una de ellas es la operación a pequeña escala en un rango de 125-600 mL. Actualmente, son

pocos los autores que se han aventurado a la evaluación en reactores con volúmenes mayores a 1L para el estudio de co-cultivos, entre ellos se encuentran Ruiz-Ruiz *et al.*, (2024) para la evaluación de corrientes diluidas de CH<sub>4</sub> y un control fotónico de pH; el reactor implementado fue de 3L con una durabilidad de 36 días. Zhang *et al.*, (2023) evaluaron el papel del hierro y nitrógeno en un reactor de 2L a partir de varios ciclos con duración de 7 días. Safitri *et al.*, (2021) diseñaron comunidades de fotogránulos para eliminación de CH<sub>4</sub> disuelto en un reactor de 1.8L durante 2 meses y Hill *et al.*, (2017) quienes utilizaron simultáneamente CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> para la producción de biomasa microbiana en un reactor de 5.5L por 96 horas.

Otra característica, es la restringida durabilidad de los experimentos que va de 20 a 200 horas, sin embargo, únicamente Ruiz-Ruiz *et al.*, (2024) y Safitri *et al.*, (2021) comparten el haber operado por un periodo mayor a 30 días. Del mismo modo, la mayoría de estos estudios indican como resultados finales una mejora en los rendimientos de biomasa y consumo de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> cuando los microorganismos se encuentran en co-cultivo comparado con cultivos individuales, lo que sugiere relaciones sinérgicas entre especies. El único caso que ha sido reportado, en donde el microorganismo fotosintético creció mejor de manera individual y restringió su crecimiento en co-cultivo, ha sido Rasouli *et al.*, (2018), pero años más tarde Roberts *et al.*, (2020) haciendo uso de los mismos microorganismos, varió el porcentaje de gases alimentados obteniendo un sistema exitoso.

Todas estas investigaciones han arrojado resultados prometedores sobre la aplicabilidad de co-cultivos bacterias metanotróficas-microorganismos fotosintéticos, aunque aún se encuentra limitada su aplicación, es decir, se necesitan sistemas sostenidos que permitan evaluar las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo, con una evaluación por periodos prolongados de al menos 2 meses y con un volumen mayor a 1L, a la par de permitir la oxidación de GEI y la generación de productos de valor agregado o biomasa microbiana con aplicabilidad industrial.

**Tabla 1.3** Estudios de co-cultivos bacteria metanotrófica-microorganismo fotosintético reportados en la bibliografía en la última década.

Referencia	Objetivo	Microorganismo	Condiciones de operación	Volumen de reactor	Tiempo de operación	Gas alimentado	Resultado de la investigación
(Yun <i>et al.</i> , 2024)	Demostrar el acoplamiento metabólico en un co-cultivo de cepas halotolerantes con diferentes proporciones de inóculo.	Microalga: <i>Chlorella sp. HS2</i>	Temperatura: 30°C Iluminación: 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 8.6	Botellas de suero de 170 mL	14 días	Diferentes proporciones de CH <sub>4</sub> : 5.3 % 9.95 % 18.4% 24.2 % 32.5 %	Se presentó un aumento de biomasa en ambos microorganismos con concentraciones crecientes de CH <sub>4</sub> , sin embargo, se requiere mayor investigación en cepas halotolerantes.
		Metanótrofo: <i>Methyloicribium alcaliphilum 20Z</i>	Salinidad: 3.02% Agitación: 200 rpm Medio: DSMZ 1180 y BG11				
(Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2024)	Evaluar el crecimiento sintrófico de un co-cultivo con tres fuentes de nitrógeno y regular el pH mediante regulación fotónica.	Microalga: <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Temperatura: 28°C Iluminación: 150 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Agitación: 500 rpm pH: 9.5	Fotobiorreactor de 3L	36 días	3-8% CH <sub>4</sub>	Se logró una operación durante largos periodos, el nitrato favoreció la sintrofia del co-cultivo y el control fotónico mantuvo la actividad de los microorganismos.
		Metanótrofo: <i>Consortio alcalófilo</i>	Medio: Sales de nitrato y BG11				
(Zhang <i>et al.</i> , 2023)	Papel de la disponibilidad de hierro y nitrógeno en la regulación de crecimiento y composición de biomasa.	Microalga: <i>Chlorella sp.</i>	Temperatura: 27°C pH: 6.5 y 7.5 Agitación 200 rpm	Reactor de 2L	Diferentes ciclos de 7 días	60% CH <sub>4</sub> 40% CO <sub>2</sub>	El hierro mejoró la tasa de asimilación de carbono, el rendimiento de biomasa y la tasa de crecimiento. Además, el amonio es necesario para regular el contenido de proteínas.
		Metanótrofo: <i>Methylococcus/ Methylosinus Methylocystis</i>	Medio: Sales de amonio				

(Wang <i>et al.</i> , 2022)	Recuperación de proteína unicelular con biogás.	Microalga: <i>Chlorella vulgaris</i>	Temperatura: 25 °C Iluminación: 55 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Agitación: 150 rpm Medio: Sales de nitrato y BG11	Botella serológica de 300 mL	5 días	40% CO <sub>2</sub> 60% CH <sub>4</sub>  40% O <sub>2</sub> 60%CH <sub>4</sub>	El co-cultivo presentó mayores rendimientos de proteína comparados con el crecimiento individual de cada microorganismo, a la par que elimina el biogás alimentado.
		Metanótrofo: <i>Methylophilus Methylomonas</i>					
(Li <i>et al.</i> , 2022)	Conversión de biogás en biodiésel a partir de un cultivo mixotrófico.	Microalga: <i>Scenedesmus obliquus</i>	Temperatura: 25 °C Iluminación: 30-130 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 6.2 Medio: Sales de nitrato	Botella serológica de 600 mL	200 horas	60% CH <sub>4</sub> 20% CO <sub>2</sub> 20% N <sub>2</sub> Composición variable	La proporción de ácido oleico es mayor en co-cultivo que, en cultivo único, sin embargo, debe estudiarse más a fondo el papel del H <sub>2</sub> S en el biogás.
		Metanótrofo: <i>Methylocystis bryophila</i>					
(Badr <i>et al.</i> , 2022)	Aplicación de un protocolo experimental-computacional para caracterización de un co-cultivo bacteria-cianobacteria.	Cianobacteria: <i>Arthrospira platensis</i>	Temperatura: 30 °C Iluminación: 60-180 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Agitación: 200 rpm pH: 8.8-9.0 Medio: Sales de nitrato y Zarrouk	Frascos de suero de 250 mL	96 horas	70% CH <sub>4</sub> 30% CO <sub>2</sub>	Se presentó el primer modelo cinético para un co-cultivo, con modelado de intercambio O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> y el cual puede predecir la dinámica de crecimiento del cultivo.
		Metanótrofo: <i>Methylomicrobium buryatense</i>					
(Safitri <i>et al.</i> , 2021)	Eliminación de CH <sub>4</sub> disuelto con fotogranulos oxigénicos.	Cianobacteria: <i>Consorcio de cianobacterias</i>	Temperatura: 23 °C Iluminación: 45 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 7.0 Agitación: 100-128 rpm Medio: Sales de amonio	Fotobiorreactor de 1.8 L	2 meses	Gas biogénico purificado 35 mg <sub>CH4</sub> /L día	Existió una posible alimentación cruzada entre fotogranulos, a la par que aumentó la biomasa y se eliminó el CH <sub>4</sub> disuelto.
		Metanótrofo: <i>Consorcio de lodos activados</i>					

(Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2020)	Evaluación de diferentes concentraciones de biomasa inicial de un co-cultivo bacteria-microalga	Microalga: <i>Scenedesmus obtusiusculus</i>	Temperatura: 28 °C Iluminación: 115 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 9.15	Botellas serológicas de 125 mL	>20 horas	4% CH <sub>4</sub> 96% O <sub>2</sub>  8% CH <sub>4</sub> 92% O <sub>2</sub>	La proporción de biomasa inicial 3:1 para el co-cultivo bacteria-microalga fue más eficiente, además de que se logró el secuestro simultáneo de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .
(Roberts <i>et al.</i> , 2020)	Conversión de biogás en proteína microbiana usando un co-cultivo bacteria-microalga	Microalga: <i>Chlorella sorokiniana</i>	Temperatura: 37 °C Iluminación: 200 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Agitación: 200 rpm	Frascos de suero de 250 mL	72 horas	70% CH <sub>4</sub> 30% CO <sub>2</sub>	El co-cultivo creció bien en efluentes de digestión anaeróbica sedimentados gravitacionalmente y logró una conversión del 100% de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en biomasa, con suministro limitado de nutrientes.
(Rasouli <i>et al.</i> , 2018)	Producción de proteínas para su uso como ingrediente alimentario a partir de aguas residuales.	Microalga: <i>Chlorella sorokiniana</i>	Temperatura: 37 °C Iluminación: 2700 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 7.0	Botellas de 600 mL	20 horas	60% CH <sub>4</sub> 40% CO <sub>2</sub>  60% CH <sub>4</sub> 30% O <sub>2</sub> 10% CO <sub>2</sub>	La composición de biomasa del co-cultivo es similar a proteínas convencionales, por lo que se puede usar como ingrediente alimentario animal.
(Hill <i>et al.</i> , 2017)	Producción de biomasa microbiana a partir de la conversión de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> .	Cianobacteria: <i>Synechococcus PCC 7002</i>	Iluminación: 250/10 $\mu\text{mol}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH: 8.0	Tanque agitado de 5.5 L	96 horas	80% CH <sub>4</sub> 17% N <sub>2</sub> 3% CO <sub>2</sub>  58% CH <sub>4</sub> 0.3% H <sub>2</sub> S 42% CO <sub>2</sub>	Una concentración variable de biogás puede afectar el crecimiento del co-cultivo, sin embargo, se produce la conversión simultánea de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> a la par que se genera biomasa microbiana.
		Metanótrofo: <i>Consortio alcalófilo</i>	Medio: Sales de nitrato y BG11				
		Metanótrofo: <i>Methylococcus capsulatus</i>	Medio: Sales de amonio				
		Metanótrofo: <i>Methylococcus capsulatus</i>	Medio: aguas residuales industriales				
		Metanótrofo: <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i>	Medio: Sales mínimas y A-Plus				

## 1.5 Antecedentes directos UAM

Las investigaciones realizadas para captura y mitigación de GEI (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) han sido variadas dentro del grupo de trabajo UAM (Iztapalapa-Cuajimalpa). Inicialmente para estudios con CH<sub>4</sub> Rocha-Ríos *et al.*, (2009) investigó la biodegradación de CH<sub>4</sub> en biorreactores de partición de dos fases en tanques agitados y de lecho percolador en estado estacionario, los cuales contenían un consorcio metanotrófico obtenido de lodos activados de una PTAR. Posteriormente, en el 2010 realizó la investigación en un reactor airlift con un circuito interno de partición de dos fases y recirculación de gas bajo condiciones bióticas y abióticas, así como, el efecto del aceite de silicona y la velocidad de agitación.

En el 2011 Zúñiga *et al.*, estudiaron la degradación de CH<sub>4</sub> y acumulación de Polihidroxibutirato (PHB) a partir del consorcio aislado por Rocha, (2009) y de la cepa *Methylobacterium organophilum* en un biorreactor de partición de dos fases en estado discontinuo. En el 2013 el estudio se dirigió a la acumulación de PHAs usando citrato y propionato como sustratos, dando paso a que García-Pérez *et al.*, (2018) continuaran las investigaciones de consumo de CH<sub>4</sub> y acumulación de PHB, con el metanótrofo *Methylocystis hirsuta* en un reactor de burbujeo con recirculación de gas.

Finalmente, Saldivar-García, (2021) estudió el ensamble de una comunidad microbiana con actividad metanotrófica a partir de estudios bioinformáticos para identificación de poblaciones microbianas, en específico un consorcio nombrado CIR\_19 y Avila-Nuñez, (2022) estudió la producción de metanol en la bacteria metanotrófica *Methylomonas methanica*.

Por su parte, para el caso de las microalgas y dada la variabilidad de cepas disponibles, algunas de las investigaciones se han enfocado al uso de *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM aislada de Cuatro Ciénegas, Coahuila, la cual fue totalmente caracterizada para determinar su capacidad de acumulación de lípidos, crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno y su cultivo en condiciones controladas y a la intemperie.

A partir de lo anterior, Ruiz-Ruiz *et al.*, (2020), (2023) conjunta las dos líneas de investigación y propone un estudio en donde se evaluó un co-cultivo de un consorcio metanotrófico alcalófilo y la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM, con el



objetivo de determinar la mejor relación de biomasa de cada cultivo, y su crecimiento en un fotobiorreactor de tanque agitado para la mitigación simultánea de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

Todas estas investigaciones permitieron un avance en la mitigación de GEI, pero aún existen diferentes oportunidades de estudio, especialmente en co-cultivos bacteria-microorganismos fotosintéticos que han sido poco estudiados, permiten la mitigación y captura de gases, así como la generación de productos de valor agregado.

## CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 2.1 Justificación

Las emisiones de GEI se han visto incrementadas por las actividades antropogénicas incentivando a la necesidad de mitigación. Dentro de los principales GEI se encuentran el CO<sub>2</sub> considerado el gas mayormente emitido a la atmosfera terrestre y el CH<sub>4</sub> por tener un potencial de calentamiento global 27-34 veces mayor que el CO<sub>2</sub> (Guerrero-Cruz *et al.*, 2021; IEA, 2023). Para contribuir a su mitigación, han sido diseñadas tecnologías fisicoquímicas y biológicas, sin embargo, estas alternativas se han centrado mayormente en el CO<sub>2</sub>.

El CH<sub>4</sub>, al contar con limitadas aplicaciones biotecnológicas que favorezcan a su captura, hace que sean necesarias nuevas alternativas para disminuir sus niveles de emisión y a su vez, generar un beneficio a la sociedad, así como productos de valor agregado que pueden ser implementados como sustitutos en diferentes industrias.

Una propuesta novedosa, es la aplicación de co-cultivos bacterias metanotróficas-microorganismos fotosintéticos, en donde, los metanótrofos poseen la capacidad de oxidación de CH<sub>4</sub>, mientras los microorganismos fotosintéticos haciendo uso de fotosíntesis oxigénica, capturan el CO<sub>2</sub> generando O<sub>2</sub> como subproducto. Estos sistemas han sido poco estudiados en la última década (11 trabajos), pero se ha determinado que pueden ser autosuficientes y estables, de manera que no sea requerido un suministro externo de O<sub>2</sub> lo que reduce los costos de operación; siempre y cuando se cuente con las condiciones necesarias para el crecimiento de los microorganismos, sean sistemas robustos que no presenten fugas de carbono, y permitan en un futuro ser implementados a escalas mayores.

A raíz de esto, para este proyecto de investigación, se eligió la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 la cual, fue caracterizada fisiológica y morfológicamente por González-Reséndiz *et al.*, (2021), en donde se determinó que tiene la capacidad de acumulación de PHB, actividad en rangos de pH de 7 a 12, no ha sido evaluada su compatibilidad con bacterias y su crecimiento unicelular permite mantener un monitoreo de su crecimiento mediante conteo celular. Por otro lado, el consorcio metanotrófico alcalófilo

estudiado anteriormente por Ruiz-Ruiz *et al.*, (2020), tiene la capacidad para crecer en condiciones alcalinas, temperaturas ambientales y ya ha sido evaluado su crecimiento en co-cultivo con la microalga *Scenedesmus obtusiusculus* en donde se obtuvo un sistema exitoso y robusto. Además, posee una amplia abundancia de filos microbianos que crecen un rango de pH de 7-9 pero no se ha determinado el pH óptimo de crecimiento del consorcio en donde se mantengan altas tasas de consumo de CH<sub>4</sub>.

En este sentido y dado a que existe una limitada investigación bibliográfica que cuente con operación en biorreactores por periodos mayores a 30 días y volúmenes de más de 1L, la combinación del consorcio metanotrófico alcalófilo con la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 puede ser probada en un fotobiorreactor de tanque agitado, en donde se puedan determinar los puntos clave para su crecimiento y se mantenga una captura simultánea de GEI, a la par que se pueda obtener un acercamiento hacia las moléculas de valor, generadas por los microorganismos tanto de manera individual como en co-cultivo.

## **2.2 Hipótesis**

Un consorcio metanotrófico alcalófilo en co-cultivo con la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM–C/S03 a pH alcalino, permitirá la captura simultánea y estable de GEI.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo general**

- Evaluar los parámetros de operación de un co-cultivo bacteria metanotrófica–cianobacteria para mantener un sistema capaz de capturar GEI.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

- Enriquecer y caracterizar un cultivo bacteriano metanotrófico.
- Determinar el pH de crecimiento del cultivo metanotrófico alcalófilo, que presente mayores tasas de biodegradación de CH<sub>4</sub>.
- Operar un sistema integrado con un co-cultivo bacteria metanotrófica-cianobacteria, con concentraciones de CH<sub>4</sub> por debajo del límite de explosividad.

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1 Microorganismos utilizados

#### 3.1.1 Consorcio metanotrófico alcalófilo

El consorcio metanotrófico alcalófilo (CMA-A) obtenido del antiguo lago de Texcoco, Ciudad de México, previamente estudiado por Ruiz-Ruiz, *et al.*, (2020) (2023), se creció en botellas serológicas de 125 mL con 5 mL del cultivo CMA-A y 20 mL de Medio de Sales Minerales (MSM) ajustado a pH 9.4 (Tabla 3.1). Las botellas se cerraron con septos de caucho de butilo y parafilm. Se retiraron 15 mL de aire en el espacio de cabeza y se adicionaron 15 mL de CH<sub>4</sub> al 99.8% de pureza para una concentración del 15% v/v. La renovación de la fase gaseosa se realizó tres veces por semana con incubación a 28 ± 0.2 °C y 150 rpm.

**Tabla 3.1** Composición del medio de cultivo MSM (Aaronson, 1970).

Reactivo	g/L	Micronutrientes	g/L
NaNO <sub>3</sub>	2.0	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.0025
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.2	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.035
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.001	NaMoO <sub>4</sub>	0.0085
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.005
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.09	MnSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.005
KCl	0.04	CoCl <sub>2</sub>	0.05
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.015		

#### 3.1.2 Cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03

La cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 aislada de un estanque en Hermosillo, Sonora, se mantuvo en crecimiento con 50 mL de medio BG11 modificado (Tabla 3.2) en matraz Erlenmeyer de 250 mL, a una temperatura de 28 ± 2°C. La irradiancia suministrada fue ~100 µmol/ (m<sup>2</sup> s), con resiembra cada tres semanas, previo a su crecimiento en columna de burbujeo.

**Tabla 3.2.** Composición del medio de cultivo modificado BG11 (Rippka *et al.*, 1979).

Reactivo	g/L	Metales traza	g/L
NaNO <sub>3</sub>	1.5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.04	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1.81
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.075	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.222

EDTA	0.001	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.39
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.036	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.079
Ácido cítrico	0.006	Co (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.049
Citrato de amonio férrico	0.006		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02		

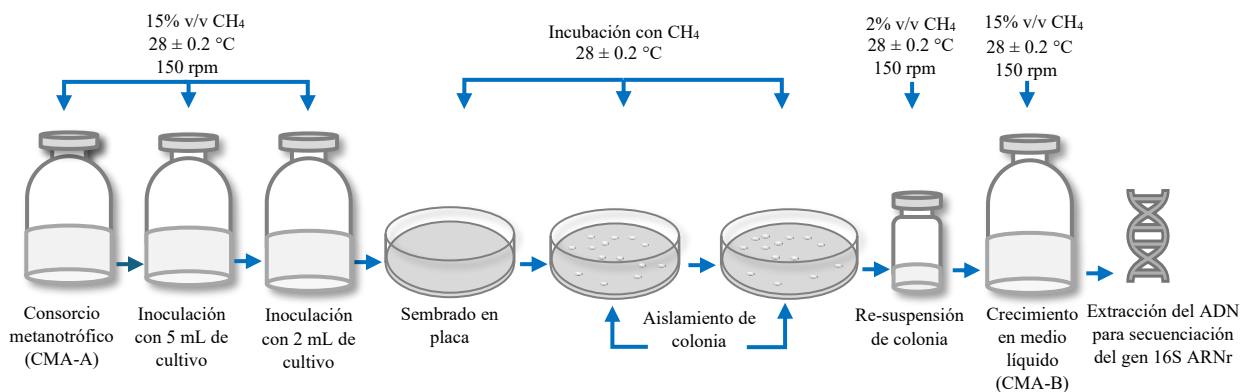
### 3.2 Enriquecimiento de la población

El CMA-A fue sembrado en placa con agar noble (15 g/L) e incubación en un recipiente hermético a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  con suministro de CH<sub>4</sub> a partir de una bolsa Tedlar. Una vez que se presentó crecimiento de colonias, se tomó una de ellas para un nuevo sembrado en placa. Posteriormente, en una botella serológica de 10 mL con 2 mL de medio MSM a pH 9.4, se re-suspendió una colonia y se creció bajo las condiciones descritas anteriormente. Transcurridos 15 días, el cultivo se pasó a una botella serológica de 125 mL con 23 mL de MSM (Figura 3.1). Este nuevo cultivo fue nombrado CMA-B para su diferenciación con el consorcio inicial.

#### Caracterización del cultivo

La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> Kit siguiendo los pasos del fabricante, la medición de las condiciones del extracto de ADN fue una concentración de 185.9 ng/μL y absorbancias 260/280, 260/230 de 1.92 y 2.06 respectivamente, obtenidas mediante un NanoDrop 2000 (ThermoScientific, EE. UU.). Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se adicionó un cóctel con la enzima Taq Polimerasa, Buffer de reacción y dNTPS. Los cebadores utilizados fueron Bac8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Las muestras fueron amplificadas en termociclador ARTIK (ThermoScientific) y la purificación del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit (QUIAGEN) siguiendo los pasos del fabricante.

Finalmente, la muestra fue enviada a la empresa mexicana Secoya Labs para su análisis por tecnología Oxford de Nanopore. Los resultados de secuenciación reportados fueron a partir del análisis previo desarrollado por la empresa, que tomó como parámetros de análisis de secuencias un Q score mínimo de 10, longitud de lectura mínimo de 200, velocidad de Basecalling de 400 bps y una profundidad de 30X.



**Figura 3.1** Metodología para enriquecimiento de la población bacteriana.

### 3.3 Cinéticas en microcosmos a diferentes pH

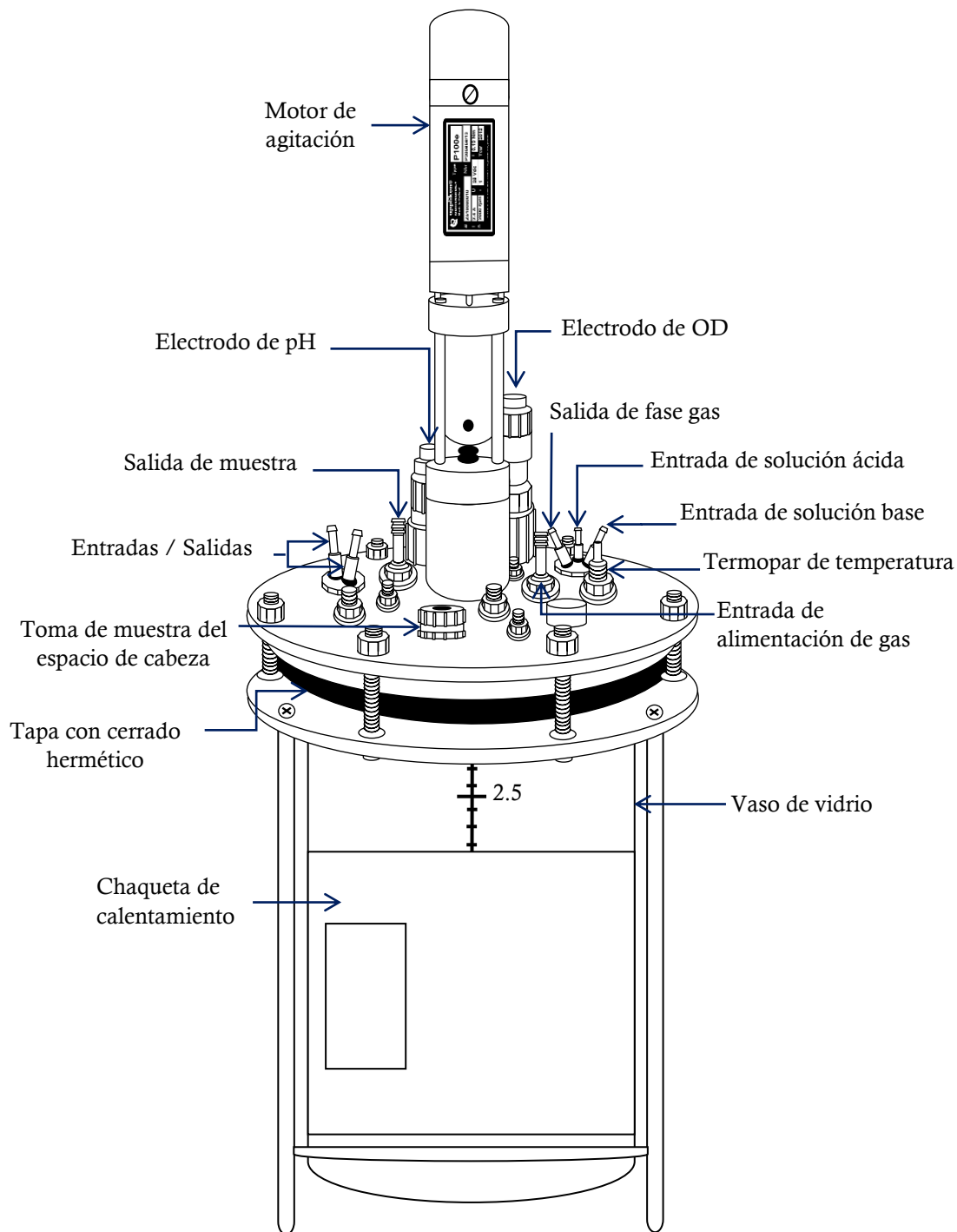
En botellas serológicas de 125 mL se creció el CMA-B durante 15 días para poder hacer uso de la biomasa generada. Posteriormente, en botellas serológicas del mismo volumen, se colocó 20 mL de medio MSM ajustado a pH 8, 9 y 10 cada uno por duplicado. En la campana de flujo laminar, se recolectó la biomasa bacteriana y una vez homogeneizada, se inoculó cada botella con 5 mL de cultivo, los cuales contenían una masa de 0.006 g, se tapó con septos de caucho de butilo y Parafilm.

Para comenzar el primer ciclo en lote alimentado, se ajustó el espacio de cabeza con una concentración de  $14.77 \pm 0.6\%$  de  $\text{CH}_4$  con medición durante las primeras 7 horas en un cromatógrafo de gases GOW-MAC (CG-DCT) y así obtener las cinéticas de consumo de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$  y generación de  $\text{CO}_2$ , posteriormente se mantuvo alimentación sin medición del espacio de cabeza y al séptimo ciclo de lote alimentado, partiendo con una concentración del  $14.05 \pm 0.51\%$   $\text{CH}_4$  se volvió a medir durante 4 horas. Al finalizar cada cinética se midió el peso seco y pH.

### 3.4 Reactor de tanque agitado

Los experimentos se realizaron en un reactor de tanque agitado Applikon con un volumen total de 3L (Figura 3.2) equipado con un electrodo electroquímico de pH (AppliSens) y un electrodo polarográfico de oxígeno disuelto (AppliSens), con entradas para soluciones ácido/base, motor de agitación, chaqueta de calentamiento, termopar para temperatura, entrada de alimentación de gas, zona de toma de muestra y septo para medición de espacio

de cabeza. Posteriormente, fue acoplado a un módulo de control Biotekno (Figura 3.3) para establecer parámetros de velocidad de agitación, temperatura de operación, lectura de pH y oxígeno disuelto, suministro de ácido y base, así como puertos para enviar el registro de datos a una computadora.



**Figura 3.2** Esquema del reactor de tanque agitado (Elaboración propia).



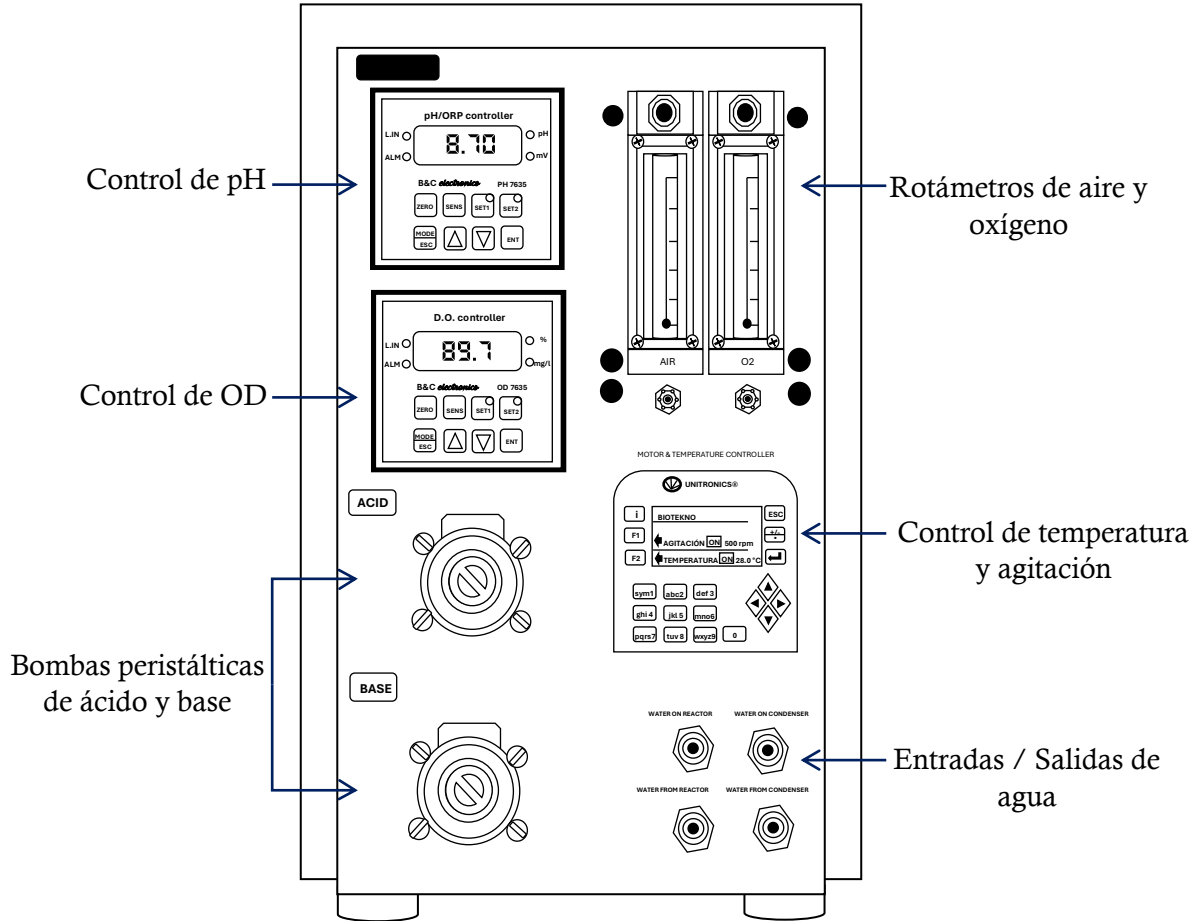


Figura 3.3 Esquema del módulo de control (Elaboración propia).

### Cinéticas a diferentes pH

El reactor de tanque agitado con 950 mL de medio MSM fue inoculado con 50 mL de cultivo CMA-B para un volumen final de operación a 1L y concentración de biomasa inicial de 0.02 g/L, se fijó como pH inicial 8.0 mediante la adición de solución básica de NaOH 0.1M, la temperatura se mantuvo en  $28 \pm 0.2$  °C y 500 rpm de agitación, los ciclos de alimentación en lote alimentado con 5% v/v de CH<sub>4</sub> en aire, se suministrado durante 5 minutos cada 10 horas y se dio un periodo de adaptación al cultivo de 5 días previos a la primera cinética.

A partir del ciclo 13 se realizó la cinética de consumo de CH<sub>4</sub> y generación de CO<sub>2</sub> a pH 8.0 con medición en un cromatógrafo de gases Agilent (6890N), al finalizar se cambió el pH de operación a 8.7 para tener un periodo de adaptación de ~16 horas previo a la cinética dos; el

procedimiento fue repetido para pH 9.4 y 10.0. Al finalizar cada cinética se determinó el peso seco, tasas específicas de consumo de CH<sub>4</sub> y el filtrado de la muestra del cultivo fue utilizado para determinación de carbono inorgánico (CI), carbono total (CT) y nitrógeno total (NT).

El pH con el mejor desempeño fue elegido para un nuevo experimento con duración de 27 días, en los cuales, se creció bajo las condiciones previamente mencionadas y no fue suministrado medio fresco para propiciar la limitación de nitrógeno. Se tomaron muestras para peso seco, nitratos y perfil bioquímico de proteínas, carbohidratos y productos intracelulares de reserva (Anexo 1). El experimento fue repetido, manteniendo las mismas condiciones de operación por 21 días, realizando cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub>.

### 3.5 Crecimiento en columna de burbujeo y conteo celular

En una columna de vidrio de 3L se colocó 1L de medio BG11 previamente esterilizado, se inoculó con 50 mL de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 (SE) y se pasó aire con flujo de 10 mL/min mediante un filtro de vidrio poroso para generar efecto de burbujeo. La temperatura de crecimiento fue  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  con una intensidad de luz de  $133 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (Figura 3.4). Para graficar el crecimiento de la cianobacteria con respecto al tiempo, se realizó conteo celular mediante la cámara de conteo Improved Neubauer con observación en un microscopio óptico OLYMPUS CX43.



**Figura 3.4** Columna utilizada para crecimiento de la cianobacteria SE.

### 3.6 Co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria en reactor de tanque agitado

Para el co-cultivo CMAB-SE, el cultivo CMA-B se creció durante 25 días en reactor de tanque agitado Applikon (sección 3.4), manteniendo las condiciones anteriormente mencionadas para crecimiento a pH 8.7; por su parte, la cianobacteria SE, fue crecida durante 15 días en columna de vidrio. Trascurridos los días establecidos se realizó peso seco y se eligió una proporción 3:1 bacteria-cianobacteria de acuerdo con los estudios realizados por Ruiz-Ruiz *et al.*, (2020), para inoculación en un volumen de operación de 1L. La biomasa fue centrifugada y re-suspendida en medio fresco MSM para el consorcio y BG11 para la cianobacteria. Posteriormente, los cultivos fueron mezclados en el reactor de tanque agitado y se tomó muestra para determinar la concentración de biomasa inicial la cual mantenía una concentración de 0.42 g/L.

Las condiciones de operación para el cocultivo fueron  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 500 rpm de agitación, pH 8.7 regulado mediante NaOH 0.5M y HCl 0.5M, así como alimentación de 4% v/v de  $\text{CH}_4$  en aire durante 3 minutos cada 6 horas. Para el registro del pH y OD se utilizaron los sensores AppliSens. La señal de salida de los controladores se conectó en serie a una resistencia de 250  $\Omega$  y el voltaje a través de la resistencia se adquirió con un convertidor de analógico a digital MCP3208 (12 bits) interconectado con un Arduino nano®, para registro de datos cada segundo. La salida de modulación de ancho de pulso (8 bits) del Arduino nano® se utilizó para controlar el voltaje suministrado a la tira de LED, la cual mantuvo una intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2*\text{s})$ .

Una vez montado el sistema (Figura 3.5) se realizaron cinéticas de consumo de  $\text{CH}_4$  y generación de  $\text{CO}_2$  con medición del espacio de cabeza en un cromatógrafo de gases Agilent (6890N), se tomaron muestras de cultivo para determinación de peso seco, nitratos y perfil bioquímico, además se mantuvo monitoreo mediante observación en microscopio óptico y conteo celular. El sistema fue operado durante 63 días en los cuales, se variaron las condiciones de alimentación de 3 minutos cada 6 horas, 1 minuto cada 6 horas y 1 minuto cada 10 horas, así como la agitación de 500-700 rpm.



**Figura 3.5** Sistema utilizado para el co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria.

### **3.7 Crecimiento del co-cultivo en microcosmos**

Para determinar la causa de limitación de oxígeno en el sistema y observar si existía actividad por parte de la cianobacteria, se partió de la última muestra del co-cultivo en el fotobiorreactor de tanque agitado, se centrifugó la biomasa y la pastilla celular fue re-suspendida en 300 mL de medio fresco MSM+BG11 (7:1). En botellas serológicas de 125 mL se colocaron 25 mL de cultivo con una concentración de biomasa inicial de 0.44 g/L y se cerraron con tapón de caucho de butilo y Parafilm.

Las condiciones de operación fueron bajo luz y oscuridad; la intensidad de luz fue  $160 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ , agitación 200 rpm, temperatura  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  y ajuste de fase gaseosas con  $\sim 0, 10$  y  $17\%$  de  $\text{CH}_4$  v/v en aire para ambas condiciones. La medición del espacio de cabeza fue mediante el cromatógrafo GOW-MAC (CG-DCT) para medición de consumo de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  a las 24 y 28 horas. Al finalizar el experimento se determinó el pH y peso seco de cada muestra.

### **3.8 Métodos analíticos**

#### **Cromatografía de gases**

La medición de la fase gaseosa con CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> se realizó en un cromatógrafo de gases GOW-MAC (GOW-MAC Series 580, USA) con columna CTR1 (Altech, USA) y detector de conductividad térmica (DCT), se utilizó He como gas acarreador a un flujo de 95 mL/min, el volumen de inyección fue 200 µL, el voltaje del detector se mantuvo a 120 mV, la temperatura de la columna fue ajustada a 40°C, mientras que el inyector y detector se mantuvieron a 50 y 115 °C, respectivamente.

En el cromatógrafo gases Agilent (6890N) se determinó la concentración de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. El equipo contaba con una columna Porapak Q (Altech, USA) y detector de conductividad térmica, se utilizó He como gas acarreador a 5 mL/min, la columna operó a temperatura de 50°C mientras que el inyector y el detector mantuvieron 110 y 200 °C respectivamente. El volumen de inyección fue 500 µL.

#### **Peso seco y pH**

El peso seco se determinó mediante filtración por vacío de muestras líquidas a través de una membrana de acetato de celulosa con tamaño de poro de 0.2 µm para bacterias, 0.8 µm para cianobacterias y 0.2 µm para el co-cultivo. La membrana fue secada a 60°C durante 24 horas, posteriormente fue colocada en un desecador por 1 hora y finalmente pesada. El valor de peso seco se obtuvo mediante la diferencia de pesos final e inicial.

Para la medición de pH se realizó de manera manual con un electrodo S200C.

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

Las muestras líquidas obtenidas de la filtración en membrana se procesaron por un analizador TOC-L (Shimadzu) equipado con un sistema infrarrojo a través del método de combustión catalítica a 680 °C. Así mismo, el sistema estuvo acoplado a un módulo de quimioluminiscencia TNM-L para la detección de nitrógeno total.

### **Perfil bioquímico y nitratos**

El perfil bioquímico de las muestras fue realizado mediante diferentes metodologías. Para proteínas se determinó por el método modificado de Lowry, carbohidratos totales mediante el método modificado de ácido sulfúrico-fenol (Dubois) y los productos intracelulares de reserva mediante el método de sulfo-fosfo-vainillina (SPV). Mientras que, para nitratos se utilizó el método de espectrofotometría UV y se realizó la conversión a mgN/L. Las metodologías detalladas se muestran en el Anexo 1.

### **Tasas de consumo de CH<sub>4</sub> y tasas volumétricas**

Las tasas de consumo de CH<sub>4</sub> fueron expresadas en mg<sub>CH<sub>4</sub></sub>/(g<sub>biomasa</sub>\*h) a partir de los datos obtenidos por cromatografía. Las tasas volumétricas fueron expresadas en mg<sub>CH<sub>4</sub></sub>/(L\*h).

### **Adición de NaOH y HCl**

El volumen total adicionado de solución básica de NaOH y solución ácida de HCl al sistema fue medido mediante una probeta graduada de 100 mL. El cálculo se obtuvo mediante la diferencia del volumen inicial y volumen final.

### **Biomasa producida acumulada y nitrógeno adicionado acumulado**

Para el cálculo de biomasa producida acumulada en el reactor de tanque agitado, se determinaron las concentraciones de biomasa en g/L antes y después de toma de muestra. Este cálculo toma en consideración el factor de dilución por la adición de medio fresco y se realiza una corrección de volumen.

Para el nitrógeno adicionado acumulado, se tomó en consideración la concentración de nitrógeno en el reactor y el volumen de medio fresco adicionado al sistema en cada muestreo.

### **Análisis estadístico**

Las muestras del experimento de cinéticas en microcosmos, perfil bioquímico y medición de nitrógeno en el medio fueron procesadas por duplicado y se presentan como promedio ± desviación. Para experimentos en reactor realizados en tiempo real no se contó con duplicados.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1 Identificación del cultivo bacteriano

A partir del cultivo metanotrófico alcalófilo (CMA-B) crecido en medio líquido y secuenciado mediante el gen 16S ARNr, se identificó la siguiente composición (Tabla 4.1, Anexo 2). El cultivo presenta una abundancia de cuatro filos, entre ellos: Proteobacteria (84.12%), Bacteroidota (13.41%), Acidobacteria (0.22%) y Actinobacteria (0.01%)

La mayor proporción corresponde al filo proteobacteria que involucra la clase Alphaproteobacteria considerada como la única con la capacidad de acumular polihidroxialcanoatos como PHB en un 60% en peso seco, como respuesta a la limitación de nitrógeno o fósforo del medio; esto debido que posee la ruta metabólica de la serina que puede entrar en el ciclo del TCA (AlSayed *et al.*, 2018). En esta clase, el género *Methylocystis* se encuentra en un 26.05% de abundancia, el cual es considerado metanótrofo facultativo al contar con ambas formas de la enzima MMO, crecer en metano y metanol, ser mesófilo y mantener un crecimiento entre 25-35 °C y pH de 5.5-9.0 (Bowman, 2006; Dedysh & Dunfield, 2011).

Especies como *Methylocystis hirsuta* con abundancia de 5.38%, es una bacteria con un tamaño de ~0.3 µm, puede crecer en compuestos multicarbonados como ácido acético, propiónico y butírico. Se ha visto que la coloración de colonias es blanca y llega a acumular entre 40-50% de PHB a partir de corrientes diluidas de CH<sub>4</sub> y limitación de nutrientes, su pH óptimo de crecimiento es 7.0. *Methylocystis parvus* (1.18%) posee altas tasas de degradación de CH<sub>4</sub>, crecimiento a pH 6-8 y se ha estudiado su crecimiento en metanol (Bordel *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020). *Methylocystis rosea* (1.18%) crece a pH 5.5-9, mientras que especies como *Methylocystis echinoides* (10.96%) ha sido aislado de aguas residuales y sedimentos de agua dulce, con crecimiento a pH 5.5-8.5 y *Methylocystis silviterrae* (6.26%) crece en pH de 4.5-7.5 y han sido estudiado para acumulación de PHB (Kalyuzhnaya *et al.*, 2015).

El género *Hyphomicrobium* (12.41%) presenta hifas y su división es por gemación. Está presente en aguas residuales por su capacidad de desnitrificación, así como en una amplia

variedad de ambientes y es considerado como metilótrofo facultativo con capacidad de crecer en compuestos de un solo carbono como metanol y metilamina. Mientras que la clase *betaproteobacteria* que involucra la familia *Burkholderiaceae* con el género *Ralstonia* (5.01%) pueden crecer en medio de peptona. *Ralstonia pickettii* es una especie que se encuentra presente en agua y suelo, crece en bajas concentraciones de nutrientes, así como en un rango de temperaturas de 15-42 °C y se ha identificado que posee capacidad biodegradativa de compuestos aromáticos como es el benceno, fenol y tolueno (Nabilah *et al.*, 2023).

**Tabla 4.1** Abundancia de microorganismos encontrados en el cultivo CMA-B.

Género	Especie	pH de crecimiento*
<i>Ralstonia</i> (5.01%)	<i>Ralstonia pickettii</i> (4.07%)	5.5-8.5
<i>Hydrogenophaga</i> (2.70%)	<i>Hydrogenophaga palleronii</i> (1.74%)	7.0-8.0
<i>Methylocystis</i> (26.05%)	<i>Methylocystis hirsuta</i> (5.38%)	5.0-8.0
	<i>Methylocystis parvus</i> (1.18%)	6.0-8.0
	<i>Methylocystis echinoides</i> (10.96%)	5.5-8.5
	<i>Methylocystis silviterrae</i> (6.26%)	4.5-7.5
	<i>Methylocystis rosea</i> (1.18%)	5.5-9.0
<i>Hyphomicrobium</i> (12.41%)	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> (2.16%)	6.5-7.5
	<i>Hyphomicrobium hollandicum</i> (1.67%)	>7.5
	<i>Hyphomicrobium facile</i> (3.51%)	6.5-7.5
	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (2.74%)	6.5-7.5
<i>Sphingopyxis</i> (1.17%)	-	6.5-8.8
<i>Pseudoxanthomonas</i> (32.24%)	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> (30.14%)	5.0-9.0
	<i>Pseudoxanthomonas japonensi</i> (1.18%)	6.0-9.0
<i>Flavobacterium</i> (1.07%)	-	6.0-8.0
<i>Chryseobacterium</i> (10.87%)	<i>Chryseobacterium koreense</i> (10.66%)	6.0-8.0

\*Los valores de pH son los reportados en la literatura

Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de abundancia.



Para la clase gammaproteobacteria se identificó que el género *Pseudoxanthomonas* posee una abundancia de 32.24%. Estas bacterias son mesófilas y se han identificado en digestores de aguas residuales, biofiltros y suelos contaminados, tienen capacidad de biodegradación de xenobióticos, producción de surfactantes y reducción química (Selvaraj *et al.*, 2022). *Pseudoxanthomonas mexicana* (30.14%) fue aislada en México de un reactor anaeróbico de aguas residuales de queso, puede crecer en yacimientos de gas natural, tiene capacidad de reducción de nitrito, utiliza citrato, glucosa, xilosa, galactosa y arabinosa y, según Kong *et al.*, (2013), puede crecer solo con CH<sub>4</sub>. Tiene pH de crecimiento de 5-9 con un óptimo de 7-8 y temperatura de 30-37 °C comparado con *Pseudoxanthomonas japonensis* (1.18%) que crece en pH de 6 a 9, y óptimo de 8 (Thierry *et al.*, 2004).

El filo *Bacteroidota* que es el segundo más abundante con 13.41%, es un facilitador del crecimiento de algas al adherirse a desechos orgánicos y pueden degradar carbohidratos por su capacidad de secretar enzimas (Kim & Kwon, 2010). El género *Chryseobacterium* se encuentra presente en aguas residuales y suelo, caracterizado por colonias de coloración amarilla debió a la presencia de flexirrubina. *Chryseobacterium koreense* una especie poco estudiada se encuentra en el cultivo CMA-B con una abundancia del 10.66%.

A partir de estos resultados y haciendo una comparativa directa con la composición del consorcio reportado por Ruiz-Ruiz *et al.*, (2020) en donde se identificó la presencia de ocho filos diferentes, se mantiene una similitud con tres de ellos: Proteobacteria, Bacteroidota y Actinobacteria. Para el caso del filo proteobacteria, característico de los microorganismos metilotróficos, la proporción obtenida fue de 79.54 y 56.46% en el CMA-A mientras que, en el CMA-B esta proporción se vio incrementada a 84.12% como parte del proceso de enriquecimiento de la población. Dentro de este filo, los géneros que se mantuvieron en ambos cultivos fueron *Methylocystis* e *Hyphomicrobium* y la familia *Xanthomonadacea*, con proporciones en el CMA-B de 26.05%, 12.41% y 33.19% respectivamente. Sin embargo, cepas como *Methylomicrobium* un metanótrofo gammaproteobacteria no fue identificado en el CMA-B, ya que su pH de crecimiento es más alcalino (9-10) y dado que el nuevo consorcio se mantuvo a pH 7-8 su abundancia se vio restringida (Kalyuzhnaya *et al.*, 2013).

De acuerdo con Kwon *et al.*, (2019) y Dedysh & Dunfield, (2011) la mayoría de las técnicas utilizadas para aislamiento y enriquecimiento de cultivos metanotróficos se centra en el

crecimiento con CH<sub>4</sub> y sembrados repetidos en placa, una metodología que se aplicó para el enriquecimiento del consorcio metanotrófico CMA-B. Además AlSayed *et al.*, (2018), menciona que existen diferentes parámetros que delimitan la proporción de especies metanotróficas, entre ellas el pH ya que la mayoría de las especies crece bien en un rango de 7-9, la temperatura es preferible de 20-35°C por ser especies en su mayoría mesófilas y las concentraciones de CH<sub>4</sub> y O<sub>2</sub>, puesto que, los metanótrofos alphaproteobacteria se ven favorecidos por concentraciones altas de CH<sub>4</sub> y bajas de O<sub>2</sub> también influyen directamente en las proporciones. Así como, otros factores más generales relacionados con la concentración de cobre, la fuente de nitrógeno y los sustratos.

La aplicación de una técnica de enriquecimiento ligada a un crecimiento a pH cercano a 7, permitió obtener una diferencia en las proporciones de las especies de ambos cultivos, a la par que se eliminaron/disminuyeron las poblaciones de microorganismos no metanotróficos. Sin embargo, aún se deben determinar diferentes parámetros que permitan un crecimiento óptimo del cultivo y su perfil bioquímico para identificar si se cuenta con una aplicación de manera individual y en co-cultivo con microorganismos fotosintéticos, sin que se produzca competencia por medio o por generación de productos inhibitorios.

#### **4.2 Cinéticas de consumo y generación a diferentes pH**

Los resultados obtenidos a partir de las cinéticas realizadas en microcosmos a diferentes pH se muestran en la Figura 4.1, donde se grafica el consumo de CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> y generación de CO<sub>2</sub> con respecto al tiempo.

Para el primer ciclo con lote alimentado, la concentración consumida de CH<sub>4</sub> fue  $39.3 \pm 0.67\%$ , para O<sub>2</sub> del  $34 \pm 5.01\%$  y para CO<sub>2</sub> el porcentaje generado fue  $2.3 \pm 0.58\%$ . A comparación del séptimo ciclo con una duración cerca de la mitad del tiempo, en donde estos porcentajes aumentaron en 1.78%, 9.13% y 79.9% respectivamente. Cabe señalar, que las cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> y generación de CO<sub>2</sub> realizadas durante el primer ciclo a pH 10 presentan desviaciones mayores debido a una concentración de biomasa posiblemente diferente a su duplicado, sin embargo, el consumo de CH<sub>4</sub> se mantuvo progresivo a lo largo del tiempo.

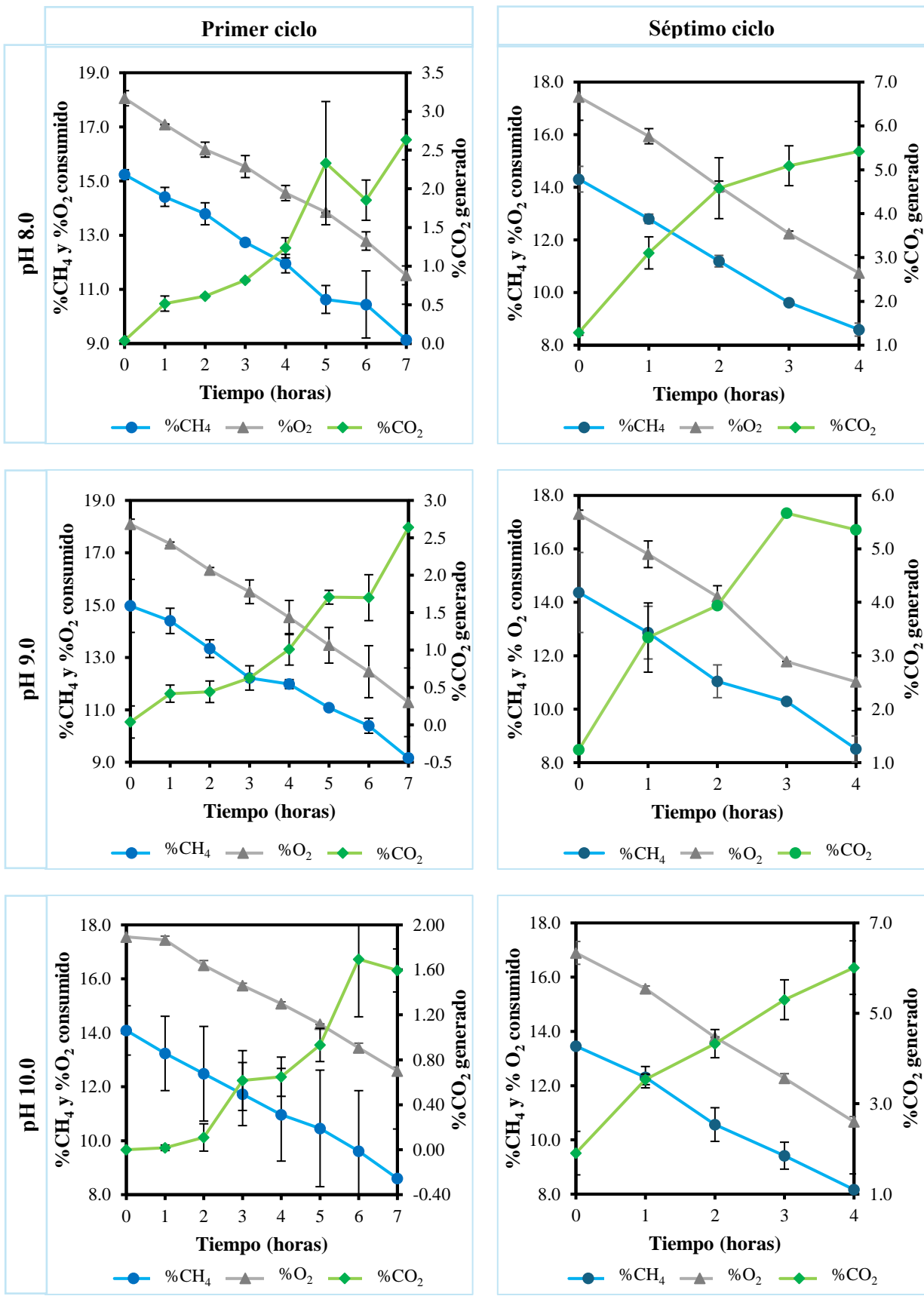
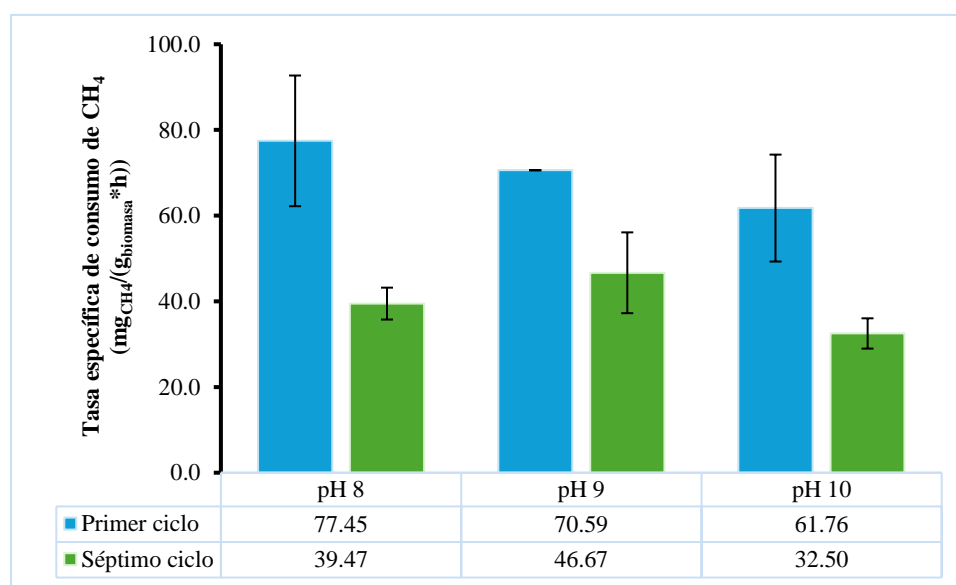


Figura 4.1 Cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub> y generación de CO<sub>2</sub> el primer y séptimo ciclo.

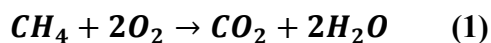
Las tasas específicas de consumo de CH<sub>4</sub> para el primer y séptimo ciclo, se muestran en la Figura 4.2. Para el primer ciclo, la tasa de consumo de CH<sub>4</sub> más alta fue a pH 8.0 con  $77.45 \pm 15.25 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  considerando una biomasa de 0.006 g. Mientras que, en cinéticas de consumo al séptimo ciclo el valor más alto reportado fue a pH 9.0 con  $46.67 \pm 9.43 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  y la biomasa final aumentó hasta un promedio de  $0.018 \pm 0.03 \text{ g}$ .



**Figura 4.2** Tasas específicas de consumo de CH<sub>4</sub> al primer y séptimo ciclo, en microcosmos.

De acuerdo con la literatura, bacterias metanotróficas crecidas en microcosmos como *Methylosinus trichosporium* OB3b con una alimentación del 10% CH<sub>4</sub> en aire, presentan tasas de consumo de CH<sub>4</sub> de  $77.8 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  (Zúñiga *et al.*, 2011), mientras que, el consorcio metanotrófico CMA-A con alimentación del 15% CH<sub>4</sub> y pH 9.15 mantiene una tasa de biodegradación de  $24.20 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020). Comparado los valores reportados por los autores mencionados, con los obtenidos con CMA-B bajo diferentes condiciones evaluadas, se puede identificar que son comparables con las tasas de mayor consumo ( $77.8 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$ ) para las cinéticas del primer ciclo, mientras que, para las cinéticas del séptimo ciclo los valores se encuentran dentro de los promedios reportados.

Para la determinación de los rendimientos molares presentados en la Tabla 4.2, se hace una relación con la ecuación de oxidación de CH<sub>4</sub> (Ec.1), en donde, se requiere 1 mol de CH<sub>4</sub> más 2 moles de O<sub>2</sub> para generar a 1 mol de CO<sub>2</sub> y dos moles de H<sub>2</sub>O.



En el rendimiento CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> los valores son bajos para el primer ciclo, ya que, de acuerdo con la ecuación (1) en donde la proporción es 1 mol de CH<sub>4</sub> para generar 1 mol de CO<sub>2</sub>, valores de 0.19 - 0.29 están por debajo de la mitad, es decir, no todo el CH<sub>4</sub> alimentado fue oxidado a CO<sub>2</sub>; esto puede ser verificado retomando la información de las cinéticas (Figura 4.1) en donde el consumo de CH<sub>4</sub> promedio fue de 39.3 ± 0.67%. Por otra parte, para el séptimo ciclo los rendimientos se vieron incrementados cerca de dos veces, a excepción del pH 10.0 en donde el rendimiento incremento hasta cinco veces su valor (0.73 ± 0.02), debido al cambio en la concentración de biomasa (0.020 g) y por consiguiente consumo de CH<sub>4</sub>, lo que da como resultado una mayor generación de CO<sub>2</sub>.

Para el coeficiente respiratorio CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, donde teóricamente el valor máximo es 0.5 e indica cuanto O<sub>2</sub> está reaccionando con el CH<sub>4</sub> para generar CO<sub>2</sub> (Salehi & Chaiprapat, 2022); en cinéticas del primer ciclo se presentó un valor máximo a pH 8.0 con 0.23 ± 0.01, lo que concuerda con el rendimiento máximo de CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> que presentaba un valor de 0.29 ± 0.01 al mismo pH. Sin embargo, para el séptimo ciclo, estos valores cambiaron a pH 10.0 y la conversión de O<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub> presentó un valor de 0.28 ± 0.03.

Un aspecto importante de los experimentos realizados es que el pH no muestra un efecto en la tasa de consumo de CH<sub>4</sub>. Si bien, al inicio de cada experimento este parámetro fue ajustado a valores alcalinos de 8, 9 y 10, cuando se finalizan las cinéticas se obtuvieron valores neutros sin importar el pH inicial (Tabla 4.2), lo cual pudo haber ocurrido desde las primeras horas del experimento, ocasionando que los valores obtenidos en las cinéticas no tuvieran efecto directo con el pH. Por ello, es necesario que durante cinéticas de consumo esté valor se encuentre monitoreado para verificar si presenta un efecto directo, ya que, al ser un cultivo que cuenta en su mayoría con bacterias del género *Methylocystis* (Sección 4.1), los pH más recomendables para el crecimiento y oxidación son cercanos a la neutralidad (Bowman, 2006).

**Tabla 4.2** Valores de pH, biomasa y rendimientos molares del primer y séptimo ciclo de alimentación.

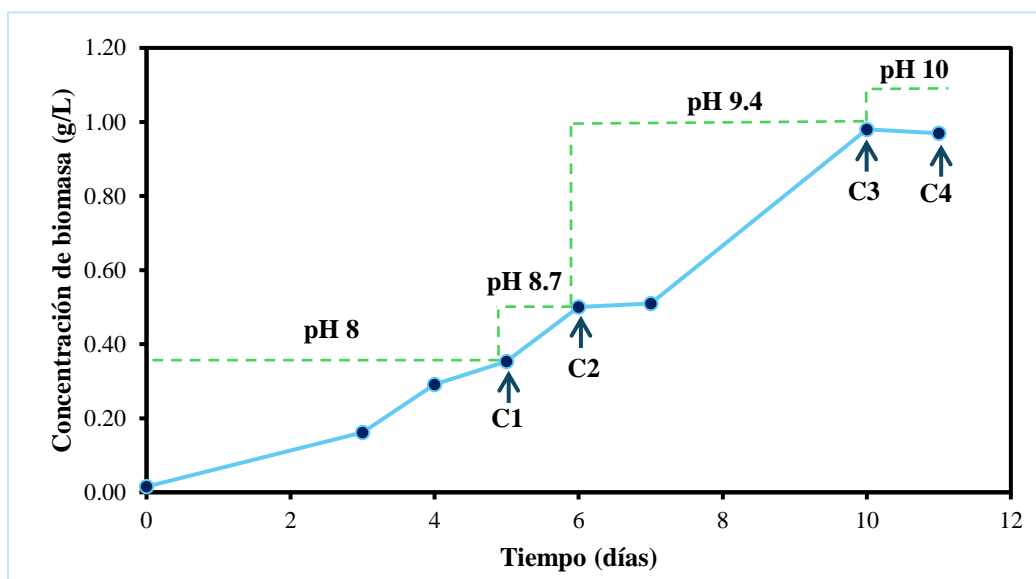
pH		Biomasa (g)	Y molar	
Inicial	Final		CO <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>
<b>Primer ciclo de alimentación</b>				
8.0	7.45	0.006	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.01
9.0	7.52	0.006	0.27 ± 0.00	0.16 ± 0.06
10.0	7.68	0.006	0.19 ± 0.02	0.06 ± 0.01
<b>Séptimo ciclo de alimentación</b>				
8.0	7.85	0.019	0.63 ± 0.09	0.21 ± 0.02
9.0	7.89	0.015	0.63 ± 0.03	0.24 ± 0.02
10.0	7.94	0.020	0.73 ± 0.02	0.28 ± 0.03

pH inicial ajustado previo a las cinéticas.  
pH final medido al término de cada cinética

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub> y generación de CO<sub>2</sub> a diferentes pH, se concluye que las tasas específicas de consumo se encuentran dentro de los promedios reportados en la literatura para diferentes especies metanotróficas y que a pesar de que, durante el primer ciclo a pH 8 se presentó mayor rendimiento en el proceso oxidativo, esto cambió al séptimo ciclo para pH 10. Sin embargo, como los valores de pH finales se encontraban dentro de la neutralidad, no se puede asegurar que las diferentes tasas de consumo de CH<sub>4</sub> estuvieran relacionadas con este parámetro, por ende, es necesario un sistema que permita controlar los parámetros durante las diferentes cinéticas para obtener un resultado más detallado y asegurar o descartar su efecto en la actividad del cultivo metanotrófico.

### 4.3 Cinéticas de consumo a diferentes pH en reactor de tanque agitado

Para determinar de una mejor manera el efecto del pH, se optó por mantener un crecimiento en reactor de tanque agitando con regulación de pH mediante la adición de solución básica NaOH 0.1M. Los tiempos de adaptación, así como el momento en el cual se realizaron las diferentes cinéticas se presentan en la Figura 4.3.

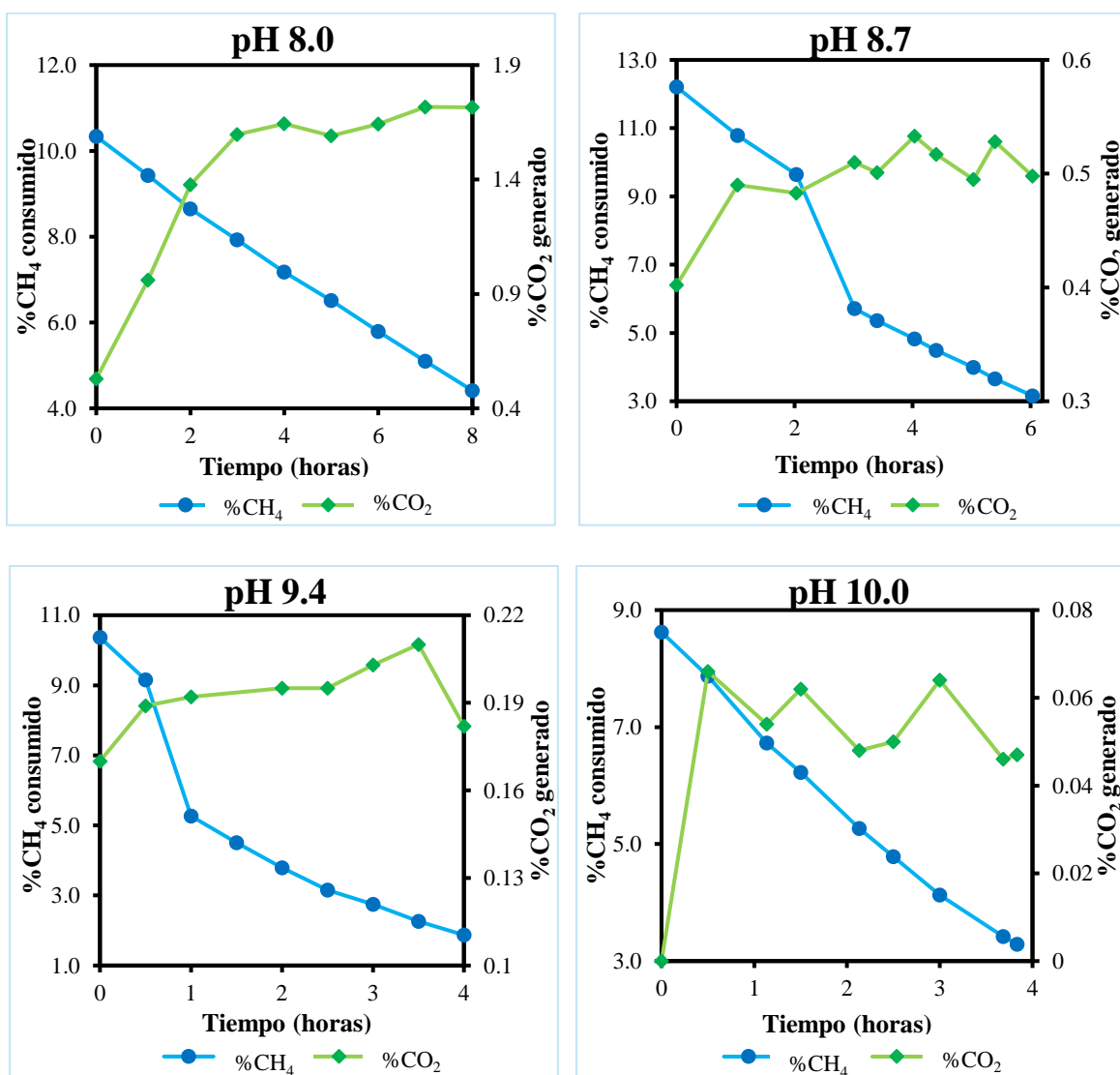


**Figura 4.3** Crecimiento del cultivo CMA-B. C1-C4 indica el punto en donde fueron realizadas las cinéticas de consumo, la línea punteada indica el periodo de adaptación a diferentes pH.

Las cinéticas de consumo de  $\text{CH}_4$  y generación de  $\text{CO}_2$ , se muestran en la Figura 4.4, en donde, se aprecia que a pH 8.7 y 9.4 existió un periodo en donde la concentración de  $\text{CH}_4$  tiende a disminuir abruptamente durante las primeras horas de la cinética, mientras que para pH 8 y 10 el consumo fue progresivo a lo largo del tiempo.

Para el caso del  $\text{CO}_2$  el comportamiento registrado fue diferente, en ciertos puntos el valor tiende a disminuir y en otros aumenta; esto es debido a la cantidad de  $\text{CO}_2$  generado y los cambios en el pH del cultivo por la adición de solución básica. A medida que el pH se encuentre más alcalino se contará con menor porcentaje de  $\text{CO}_2$  en el espacio de cabeza, puesto que, este queda retenido en el medio en forma de carbono inorgánico (carbonatos y bicarbonatos) y conforme se acidifique el medio, el  $\text{CO}_2$  será liberado en el espacio de cabeza

del reactor (Anexo 3). En ese sentido a pH 8 se contó con generación de 1.7% de CO<sub>2</sub> comparado con pH 10 donde se registró como valor máximo 0.06%.

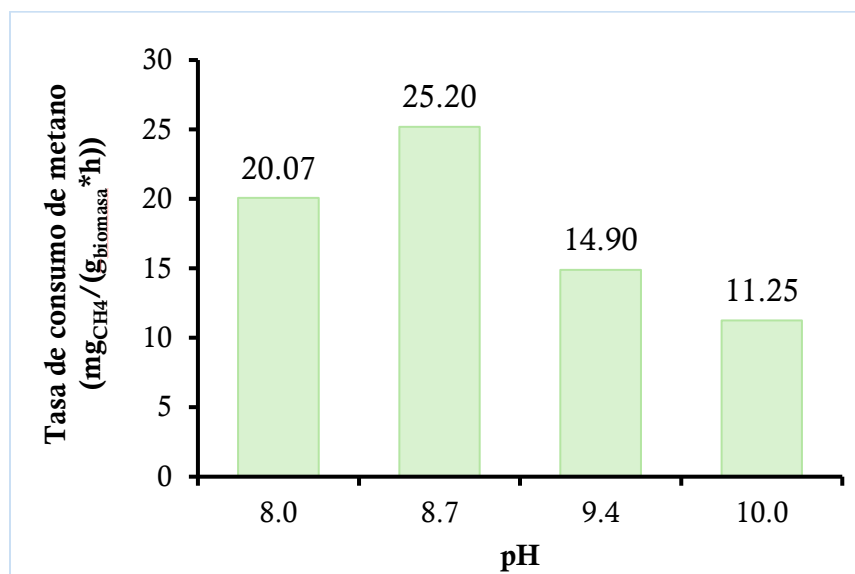


**Figura 4.4** Cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub> y generación de CO<sub>2</sub> a diferentes pH en reactor de tanque agitado.

Las tasas de consumo de CH<sub>4</sub> a diferentes pH se muestran en la Figura 4.5. El valor más alto fue a pH 8.7 con 25.20 mg<sub>CH4</sub>/(g<sub>biomasa</sub>\*h) comparado con pH 10 donde la tasa se ve reducida a más de la mitad con 11.25 mg<sub>CH4</sub>/(g<sub>biomasa</sub>\*h). Si se compara con el CMA-A crecido a pH 9.4 en el mismo reactor durante una operación de 4.5 horas que presenta tasas de biodegradación de 226 mg<sub>CH4</sub>/(g<sub>biomasa</sub>\*día) (equivalente a 9.41 mg<sub>CH4</sub>/(g<sub>biomasa</sub>\*h)) (Ruiz-



Ruiz, 2023), se puede identificar que el cultivo CMA-B se ha adaptado a nuevos pH para su crecimiento a la par que mantiene su capacidad de biodegradación de CH<sub>4</sub>.



**Figura 4.5** Tasas de consumo de CH<sub>4</sub> a diferentes pH en el reactor de tanque agitado.

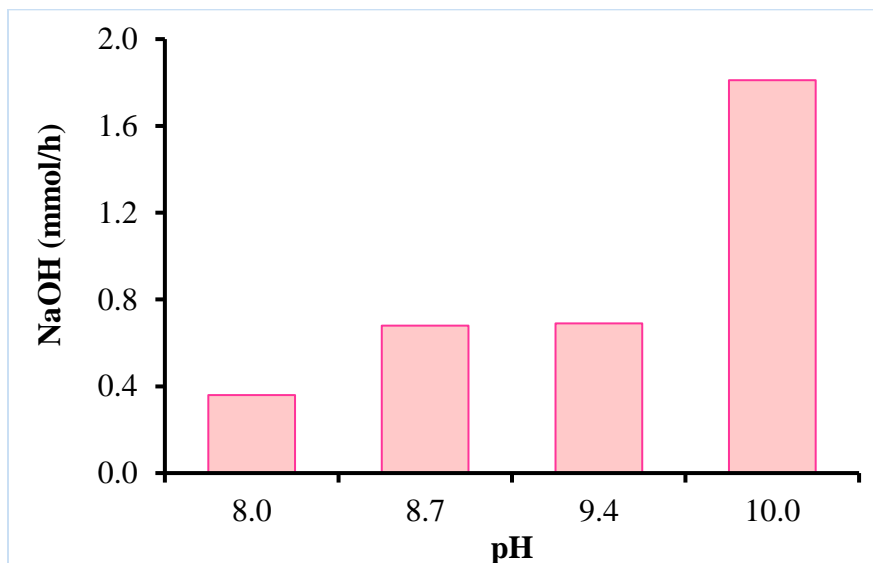
Por otro lado, factores como el pH son importantes en reactores ya que la tasa de biodegradación se ve influenciada por este parámetro, al igual que mantiene un efecto directo sobre la solubilidad del CO<sub>2</sub> (1.48 mg/mL) y se puede afectar tanto el desempeño como crecimiento de los microorganismos (Guerrero-Cruz *et al.*, 2021; Samanta & Sani, 2023). Así mismo, se debe considerar la cantidad de solución básica adicionada al sistema durante las cinéticas, ya que, la adición en exceso de NaOH puede ocasionar una alta alcalinidad en el medio (superior a 10) e incremento de la salinidad, ocasionando una limitación del crecimiento en el cultivo considerando que la mayoría de los metanótrofos crecen en rango de 5.5-9, además, la adición de soluciones básicas puede incrementar costos de operación de este tipo de sistemas (AlSayed *et al.*, 2018).

Como se mencionaba anteriormente el pH está relacionado con la forma de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub> disuelto, ácido carbónico, bicarbonato y carbonato) (Anexo3) y la alcalinización, en donde una retención del carbono en el medio provoca acidificación a causa de la generación de ácido carbónico y conforme el pH se vuelve básico se produce carbonato, sin embargo, estas reacciones son reversibles tal como se muestra en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3** Reacciones de equilibrio de carbonatos y bicarbonatos en el medio (Retomado de Ruiz-Ruiz *et al.*, (2020).

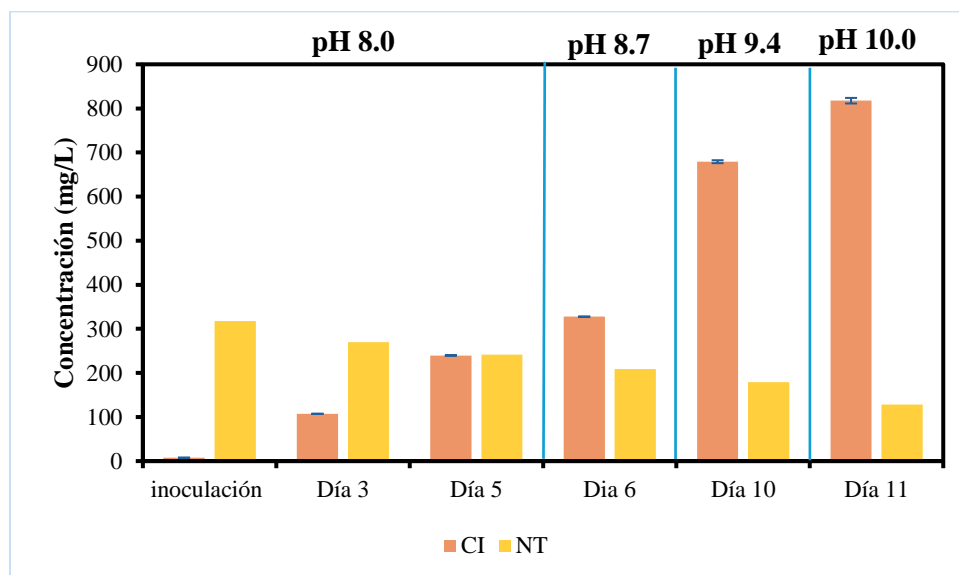
Descripción	Reacción
El CO <sub>2</sub> se disuelve en H <sub>2</sub> O	$CO_{2(g)} \rightleftharpoons CO_{2(aq)}$
El CO <sub>2</sub> (aq) reacciona con el H <sub>2</sub> O para formar ácido carbónico	$CO_{2(aq)} + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$
El ácido carbónico reacciona con H <sub>2</sub> O para formar bicarbonato y iones H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	$H_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+$
El bicarbonato reacciona con el H <sub>2</sub> O para formar carbonato y H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	$HCO_3^- + H_2O \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_3O^+$

Por lo que, en este cultivo metanotrófico que incluye la generación de CO<sub>2</sub> como parte del proceso de oxidación del CH<sub>4</sub>, mientras el cultivo se establezca a un mayor pH más solución básica será requerida para el control de este (Figura 4.6). Por ende, a pH 8 será necesario 0.4 mmol/h de NaOH porque la mayor parte del carbono se encuentra en el espacio de cabeza y otro porcentaje estará retenido en forma de bicarbonatos, mientras que a pH 10 será necesario 1.8 mmol/h de NaOH porque el carbono será retenido en la fase líquida en forma de carbonato.



**Figura 4.6** Cantidad de NaOH adicionado de acuerdo con el pH del cultivo en mmol/h.

Para determinar la concentración de carbono inorgánico en el medio y el consumo de nitrógeno en el reactor de tanque agitado durante 11 días, se procesaron las muestras mediante un analizador TOC-L obteniendo los resultados mostrados en la Figura 4.7. Las primeras tres muestras presentan valores de  $4.5 \pm 0.35$  mg/L de carbono orgánico total los cuales son imperceptibles en la gráfica, posterior a ello no se registra presencia de carbono orgánico. En el caso del carbono inorgánico existe un incremento a medida que la muestra se vuelve más alcalina, partiendo de  $7.6 \pm 0.02$  mg/L al momento de la inoculación del reactor hasta  $817.6 \pm 6.29$  mg/L a pH 10, lo indica un incremento de 107.6 veces en donde, el carbono inorgánico se encuentra en forma de carbonatos. De igual manera, el nitrógeno total disminuye en un 59.7% por el crecimiento de biomasa de 317.4 mgN/L a 128 mgN/L al día 11 con pH 10.



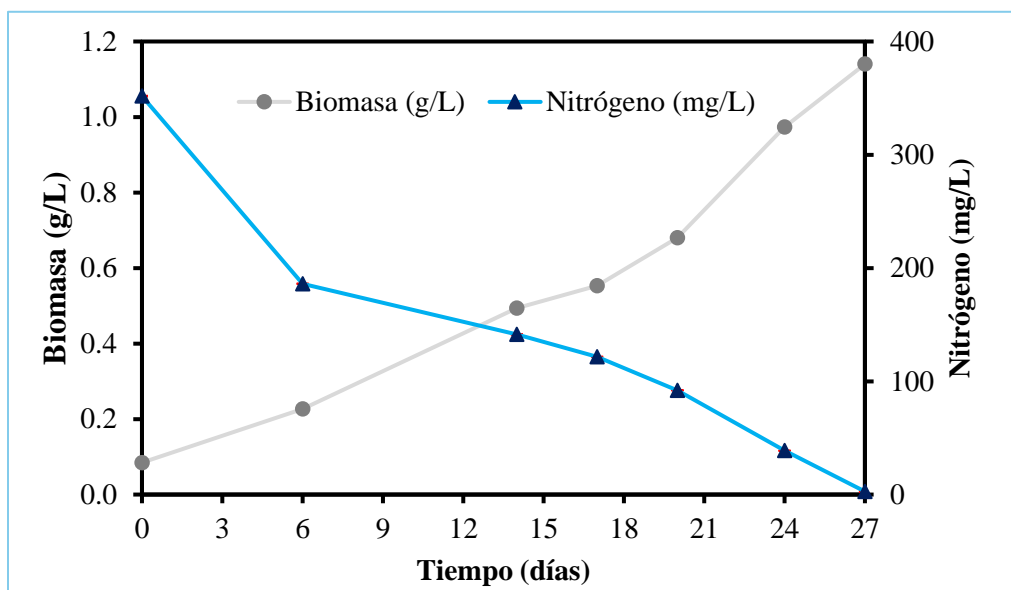
**Figura 4.7** Concentración de CI y NT en muestras obtenidas en los días de adaptación del cultivo CMA-B y en las cinéticas a diferentes pH en el reactor de tanque agitado.

A partir de los resultados obtenidos de las cinéticas de consumo y considerando el efecto que tiene el pH, aunado a la adición de solución básica de NaOH al cultivo, se determinó que el pH que presentó mejor desempeño es 8.7, ya que se encuentra en condiciones cercanas a la neutralidad que es un parámetro importante para las especies metanotróficas que conforman el cultivo CMA-B, por lo cual fue elegido para continuar el trabajo experimental.

#### 4.4 Crecimiento a pH 8.7

El crecimiento en el reactor de tanque agitado a pH 8.7 se realizó por duplicado, la primera corrida tuvo una duración de 27 días en donde el objetivo fue el crecimiento de biomasa y favorecer una limitación de nitrógeno para determinar por perfil bioquímico su capacidad de acumulación de moléculas; mientras que, la repetición del experimento fue por 21 días en donde, se realizaron cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub> para determinar su capacidad de oxidación y se repitió perfil bioquímico.

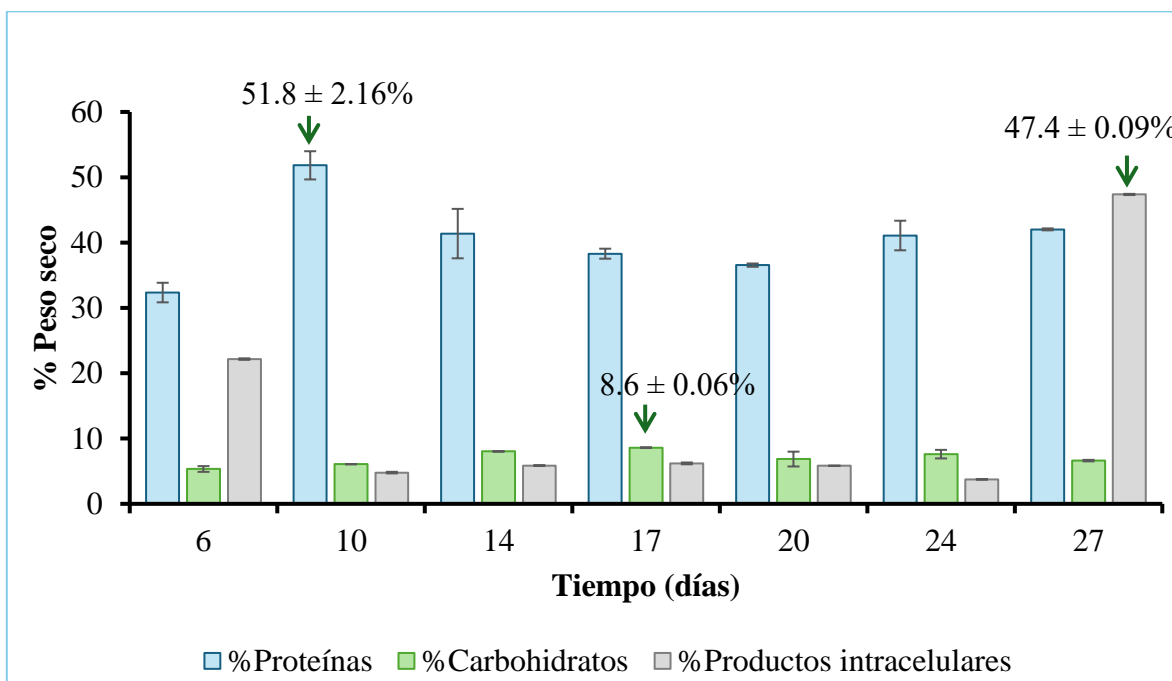
En el primer experimento el crecimiento de biomasa se mantuvo constante hasta alcanzar una concentración máxima de 1.14 g/L en 27 días. El nitrógeno al momento de la inoculación inició con 351.75 mgN/L concluyendo con una concentración de 2.72 mgN/L al día 27 (Figura 4.8) lo que indicó que a partir de ese momento el cultivo había consumido el 99% del nitrógeno total, induciéndolo a un estado de estrés por limitación.



**Figura 4.8** Concentración de biomasa y consumo de nitrógeno durante 27 días de cultivo.

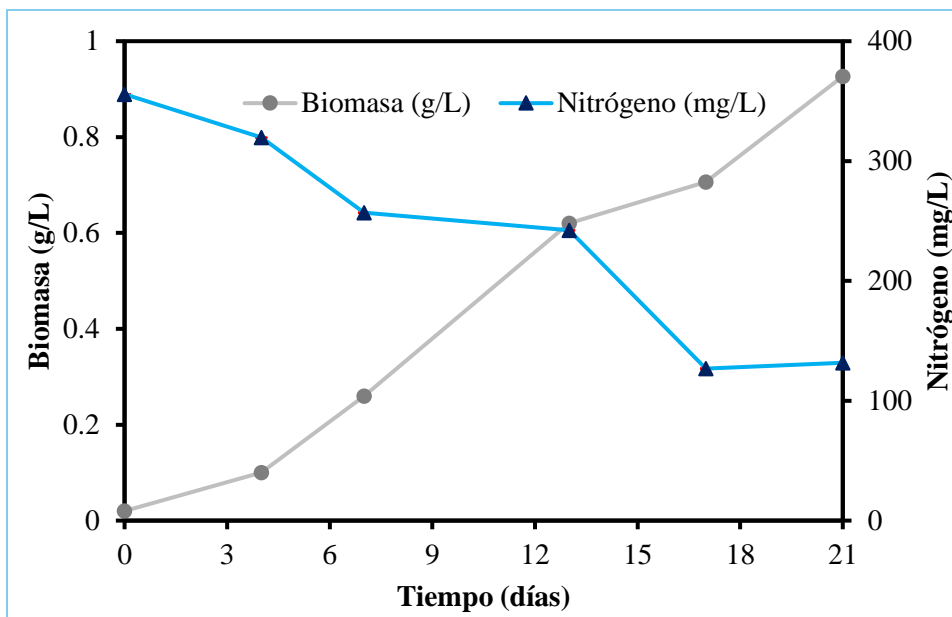
El perfil bioquímico de la biomasa (Figura 4.9) tuvo un contenido máximo de proteínas para el día 10 con  $51.8 \pm 2.16$  %, al día 17 para carbohidratos con  $8.6 \pm 0.06$  % y al día 27 con  $47.4 \pm 0.09$  % de productos intracelulares de reserva.

Esta concentración de productos intracelulares entra dentro del rango reportado en la literatura para metanótrofos de especies como *Methylocystis parvus* y *Methylocystis hirsuta* que presentan la capacidad de acumular PHB en un 50-70% y 45% en peso respectivamente (Gęsicka *et al.*, 2021; Wendlandt *et al.*, 2010). Además, considerando que el CMA-B cuenta con una abundancia del 42.57% de la clase Alphaproteobacteria característica por acumular PHB, el 47.4% obtenido de productos intracelulares de reserva es resultado de la limitación de nitrógeno en el medio, que puede tratarse tanto de lípidos, PHAs o algún otro producto intracelular, ya que, el método de sulfo-fosfo-vainillina (SPV) es utilizado para cuantificación de lípidos neutros, sin embargo, para corroborar este dato es necesario técnicas cualitativas y cuantitativas para descartar el error experimental que produce la técnica (AlSayed *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2014).



**Figura 4.9** Perfil bioquímico de cultivo CMA-B con crecimiento a pH 8.7 durante 27 días.

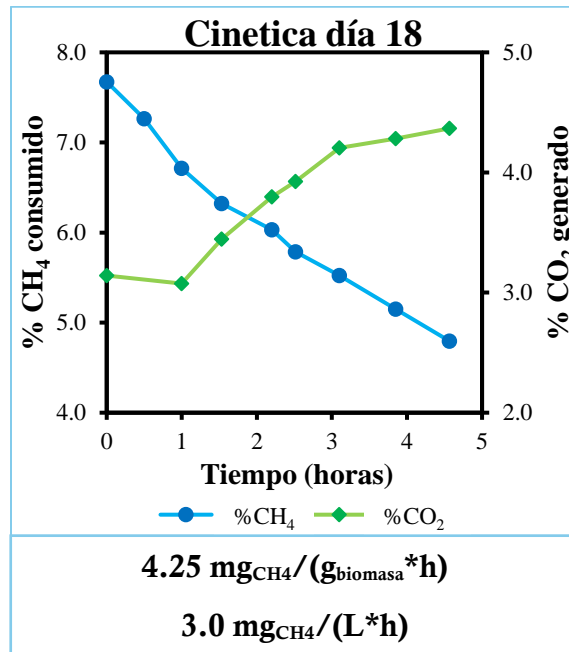
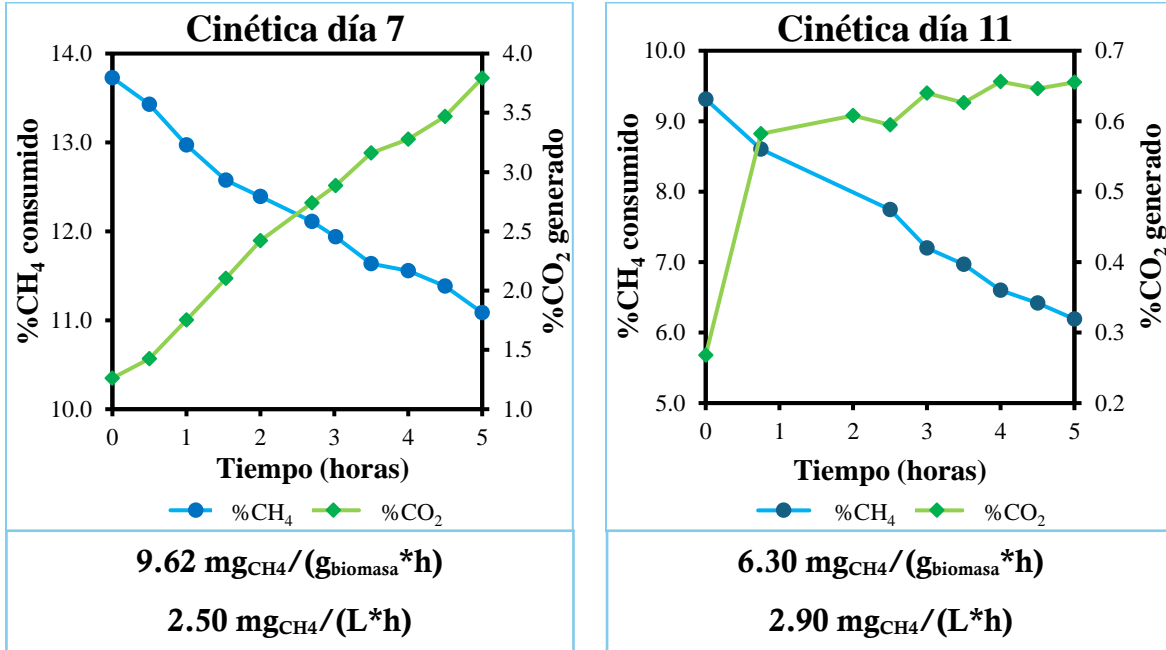
Para el duplicado del experimento se mantuvo un crecimiento de biomasa progresivo hasta llegar a 0.93 g/L en el día 21 (Figura 4.10). Respecto al nitrógeno, la concentración inicial fue 355.76 mgN/L y para el día 21 contaba con 131.76 mgN/L, es decir, se consumió 62.96% de nitrógeno total.



**Figura 4.10** Concentración de biomasa y consumo de nitrógeno durante 21 días de cultivo.

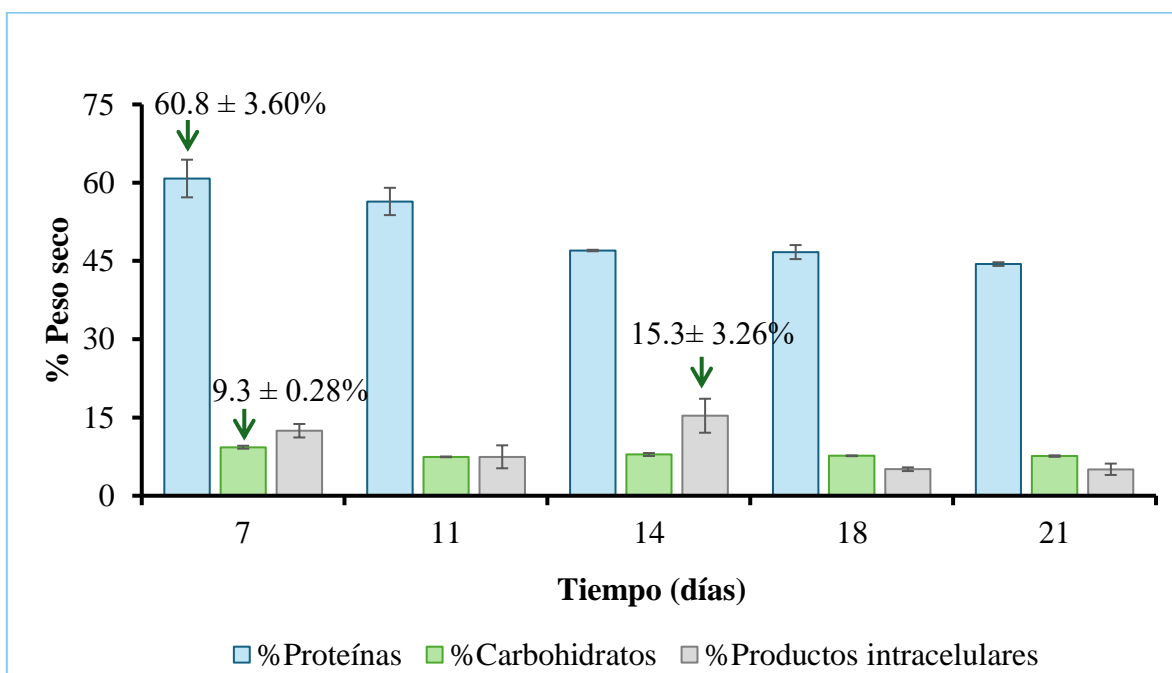
Las cinéticas de consumo realizadas a lo largo del experimento se muestran en la Figura 4.11, con un consumo progresivo de  $\text{CH}_4$  a lo largo del tiempo, sin embargo, la generación de  $\text{CO}_2$  fue mayor al día 7 y 18. En el séptimo día las tasas específicas de consumo de  $\text{CH}_4$  presentaron valores de  $9.62 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  disminuyendo a  $4.25 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  para el día 18, esto se debe posiblemente a un aumento de biomasa, o bien podría tratarse de una baja solubilidad del  $\text{CH}_4$  que de acuerdo con Safitri *et al.*, (2021) puede ser solucionado mediante efectos de mezclado en el reactor para favorecer a la interfaz gas-líquido.

Para las tasas volumétricas, los valores aumentaron con el transcurso del tiempo, con  $2.50 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{L} \cdot \text{h})$  al día 7,  $2.90 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{L} \cdot \text{h})$  al día 11 y  $3.0 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{L} \cdot \text{h})$  al día 18, como parte del incremento de biomasa y consumo de  $\text{CH}_4$  a lo largo de los días por litro de volumen.



**Figura 4.11** Cinéticas de consumo de CH<sub>4</sub> y generación de CO<sub>2</sub> a pH 8.7. En el recuadro inferior de cada figura se presentan las tasas específicas de consumo de CH<sub>4</sub> y tasas volumétricas.

Los valores del perfil bioquímico en este experimento (Figura 4.12), mostraron como valor máximo de proteínas  $60.8 \pm 3.60\%$  y  $9.3 \pm 0.28\%$  para carbohidratos, ambos en el día 7. Estos valores son superiores en un 17% y 8% respectivamente en comparación con los reportados en el experimento anterior, pero manteniendo la característica de una acumulación máxima durante los primeros días de la fase de crecimiento. Para productos intracelulares de reserva, la concentración fue un 68% menor de lo acumulado anteriormente con  $15.3 \pm 3.26\%$  al día 13, ya que no se contaba con limitación de nitrógeno en el medio de cultivo.



**Figura 4.12** Perfil bioquímico de cultivo CMA-B con crecimiento a pH 8.7 durante 21 días.

A partir de estos dos experimentos con crecimiento a pH 8.7 se pudo identificar un crecimiento progresivo del consorcio alcalófilo, lo que indicó una buena adaptación al nuevo pH de crecimiento, en donde, se mantuvo la capacidad de oxidación de  $\text{CH}_4$ . Además, mediante el perfil bioquímico se identificó una acumulación de 50-60% de proteínas y hasta 47% de productos intracelulares de reserva ante la limitación de nitrógeno, convirtiéndolo en un cultivo interesante para la generación de productos de valor agregado.



#### 4.5 Crecimiento en columna de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03

Para la segunda parte del trabajo experimental, se eligió la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 (SE) la cual fue crecida en columna de burbujeo para generación de biomasa, la cual presentaba una tasa específica de crecimiento de  $0.22 \text{ d}^{-1}$ . A la par, se obtuvo una curva de conteo celular vs biomasa (Anexo 4) mediante el recuento celular con la cámara Improve Neubauer: esta gráfica fue de utilidad para experimentos posteriores.

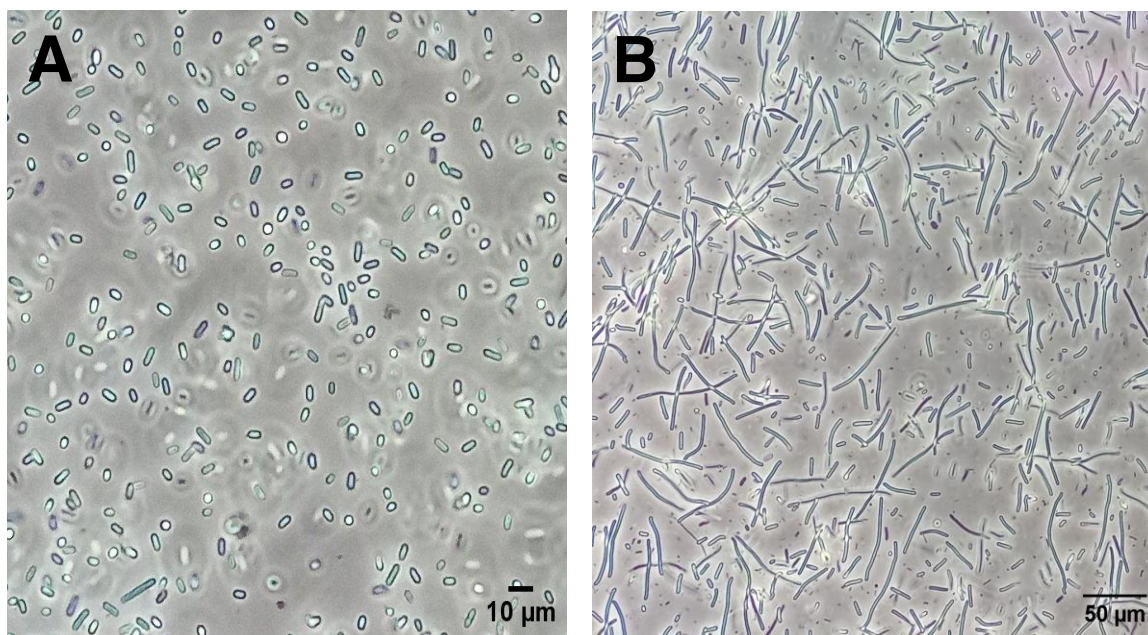
Mediante el monitoreo del crecimiento con observación en microscopio óptico, se identificó la diferencia morfológica de la cianobacteria durante 40 días. La figura 4.13 muestra una fotografía al 40X con filtro de contraste de fases, correspondiente al segundo día de crecimiento de la cianobacteria SE, presentando una morfología de bacilos y una longitud  $\sim 4 \mu\text{m}$ . En círculos negros se resaltan las células que se encontraban en proceso de división por fisión binaria.



**Figura 4.13** Fotografía de la cianobacteria SE a dos días de crecimiento en columna de burbujeo, con filtro de contraste de fases al 40X. En círculos negros se encuentran las células en proceso de duplicación por fisión binaria.

El crecimiento de la cianobacteria después de siete días (Figura 4.14A) mostró un aumento celular que mantuvo forma bacilar con longitudes de  $5\text{-}8 \mu\text{m}$ .

Finalmente, cuando el cultivo ha estado en crecimiento por más de 40 días (Figura 4.14B), la célula se alarga teniendo una morfología filamentosa alcanzando longitudes de hasta 50-60  $\mu\text{m}$ , esto como parte de la acumulación de PHB, un producto de reserva en respuesta a la limitación de nutrientes (González-Resendiz *et al.*, 2021).

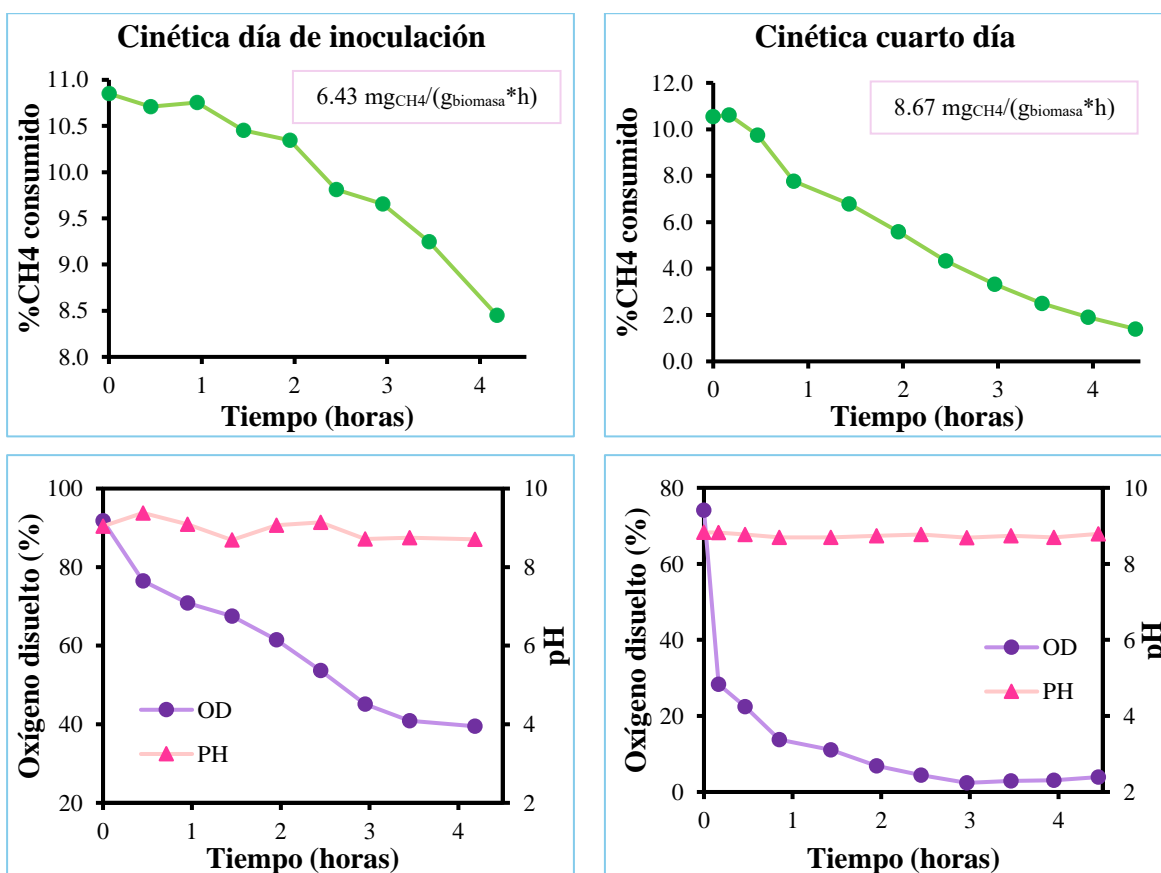


**Figura 4.14** Cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM–C/S03, observación a 40X por contraste de fases. A) Crecimiento a 7 días. B) Crecimiento a 40 días.

#### 4.6 Co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria en fotobiorreactor de tanque agitado

El experimento de co-cultivo consorcio metanotrófico- *Synechococcus elongatus* UAM–C/S03, tuvo una duración de 63 días, durante ese período se realizaron dos cinéticas de consumo: el día de inoculación y el cuarto día de crecimiento. En la Figura 4.15 se encuentra la gráfica de consumo de  $\text{CH}_4$  y generación de  $\text{CO}_2$ , este último no encontrado en el espacio de cabeza del reactor durante las mediciones por CG porque la cianobacteria fijó el gas como parte del proceso fotosintético (Safitri *et al.*, 2021). La primera cinética (día de inoculación) finalizó con una tasa de consumo de  $\text{CH}_4$  de  $6.43 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$  ( $154 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{día})$ ) después de un tiempo de 4.1 horas, el cual fue el mismo valor de tasa de consumo que el reportado por Ruiz-Ruiz, (2023) en un co-cultivo bacteria-microalga (consorcio

metanotrófico alcalófilo-microalga *Scenedesmus obtusiusculus*). Para la segunda cinética realizada en el cuarto día de crecimiento la tasa de consumo incrementó a  $8.67 \text{ mg}_{\text{CH}_4}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \cdot \text{h})$ , la diferencia en esta cinética es que el co-cultivo ya se encontraba adaptado por lo cual, el consumo de  $\text{CH}_4$  se mantenía constante y el  $\text{CO}_2$  seguía sin ser percibido en el espacio de cabeza del reactor; mientras que el pH para este punto, ya se encontraba dentro del rango establecido para el crecimiento (8.6-8.8). Posterior a estas cinéticas, no se sabe con certeza si durante los 59 días restantes el co-cultivo mantuvo alta oxidación de  $\text{CH}_4$  y si el  $\text{CO}_2$  fue liberado en algún momento al espacio de cabeza, a pesar de ello, se pudo continuar monitoreando el crecimiento mediante peso seco y conteo celular, así como el comportamiento del pH y OD a partir del sistema Arduino.



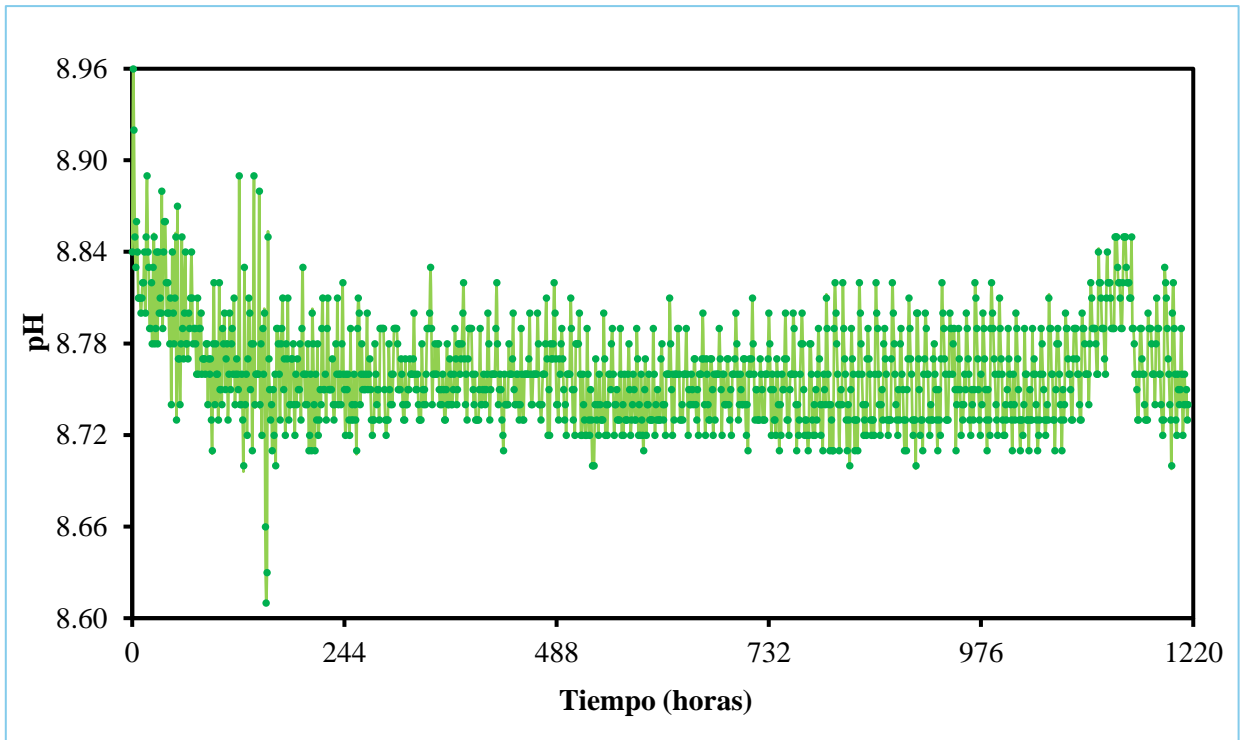
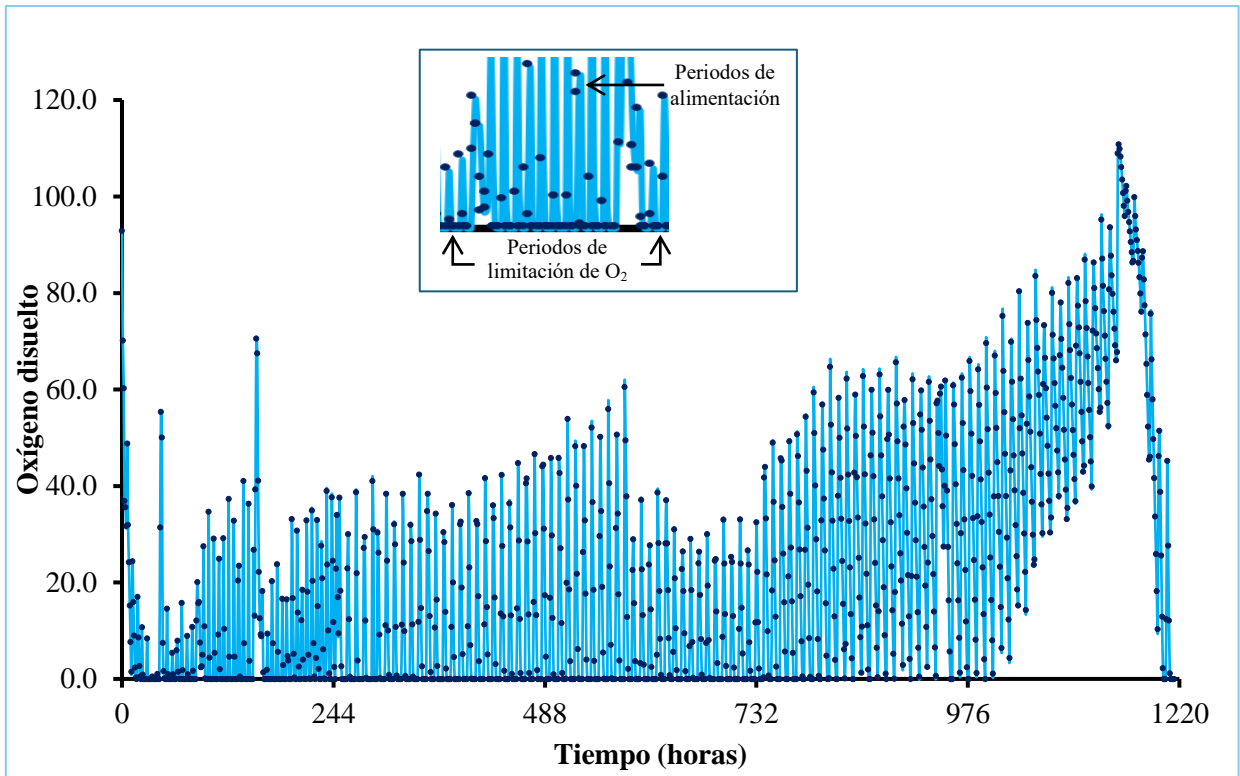
**Figura 4.15** Gráficas de cinéticas de consumo el día de inoculación y cuarto día de crecimiento. Se presenta el % de consumo de  $\text{CH}_4$  (círculo verde), el consumo de oxígeno disuelto (círculo morado) y valores de pH (triángulo rosa) en el co-cultivo CMAB-SE.

En la Figura 4.16 se muestran los valores registrados cada 1.1 segundos en el sistema Arduino durante 50 días para el oxígeno disuelto y el pH del co-cultivo. La primera gráfica corresponde al OD en donde cada incremento indica un periodo de alimentación el cual pasó de una alimentación por 3 minutos cada 6 horas al momento de inoculación, a una alimentación por 1 minuto cada 6 horas el séptimo día y finalmente 1 minuto cada 10 horas los días restantes.

Transcurridos los periodos referidos se apreció los momentos bajo limitación de oxígeno en el sistema, ya que el variar la velocidad de agitación de 500 rpm el día de inoculación, 600 rpm al día 32 y 700 rpm el día 53, no ayudó a generar oxígeno suficiente en el cultivo, aunque existieron instantes en donde la cianobacteria pudo generar  $O_2$  *in situ* como parte de su actividad fotosintética, este efecto tuvo un máximo de duración  $\leq 2$  minutos, por ende, fue imperceptible al momento de graficar y durante el monitoreo del sistema. Para el caso de la intensidad de luz, este parámetro se colocó en el valor máximo permitido en el sistema Arduino, por ende, no pudo ser incrementado para probar con otros valores de iluminación.

En el día 42 el OD ya no se ve limitado, pero una vez que se alimentó medio fresco cinco veces más concentrado (5X) en el día 50 el OD presentó un comportamiento similar a días anteriores, en donde existió nuevamente limitación de oxígeno varias horas previo a la siguiente alimentación.

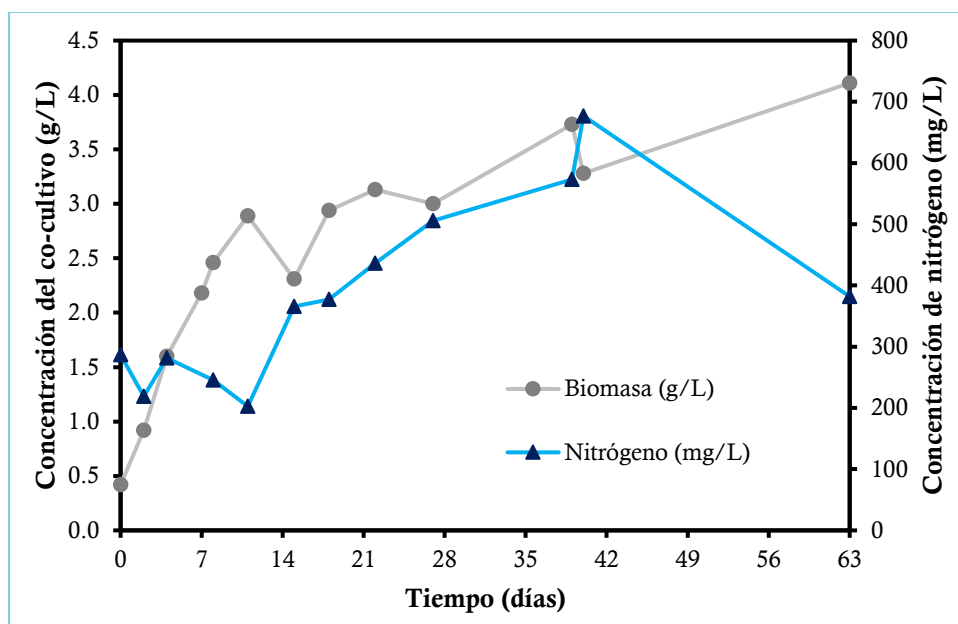
En el caso del pH, los valores se mantuvieron en un rango de 8.6-8.8. Este parámetro se mantuvo regulado mediante un control fotónico para que la misma cianobacteria mediante la generación de  $O_2$  en tiempos de luz y oscuridad ayudara a mantener el valor de pH establecido, sin embargo, este control no fue suficiente, por ende, el pH se reguló mediante la adición de soluciones básicas y ácidas terminando con la adición de 604 mL de NaOH 0.5M y 62 mL de HCl 0.5M después de 63 días de operación. Esto puede resultar en un problema si se toman en cuenta los costos económicos que involucra el control de pH mediante soluciones, además, puede afectar el crecimiento de los microorganismos cuando se adiciona en altas concentraciones.



**Figura 4.16** Datos de OD y pH obtenidos por el sistema Arduino, durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.

Por otro lado, la biomasa generada y la concentración nitrógeno se muestran en la Figura 4.17. En este caso, la biomasa incrementa de 0.42 g/L hasta 4.11 g/L al día 63, manteniendo un crecimiento exponencial hasta el día 11, pero el día 15 presenta una disminución como un posible efecto de dilución al agregar medio fresco al sistema, mientras que, el nitrógeno aumenta hasta una concentración de 676.94 mgN/L al día 40 y posteriormente disminuye a una concentración de 382.12 mgN/L al final del experimento.

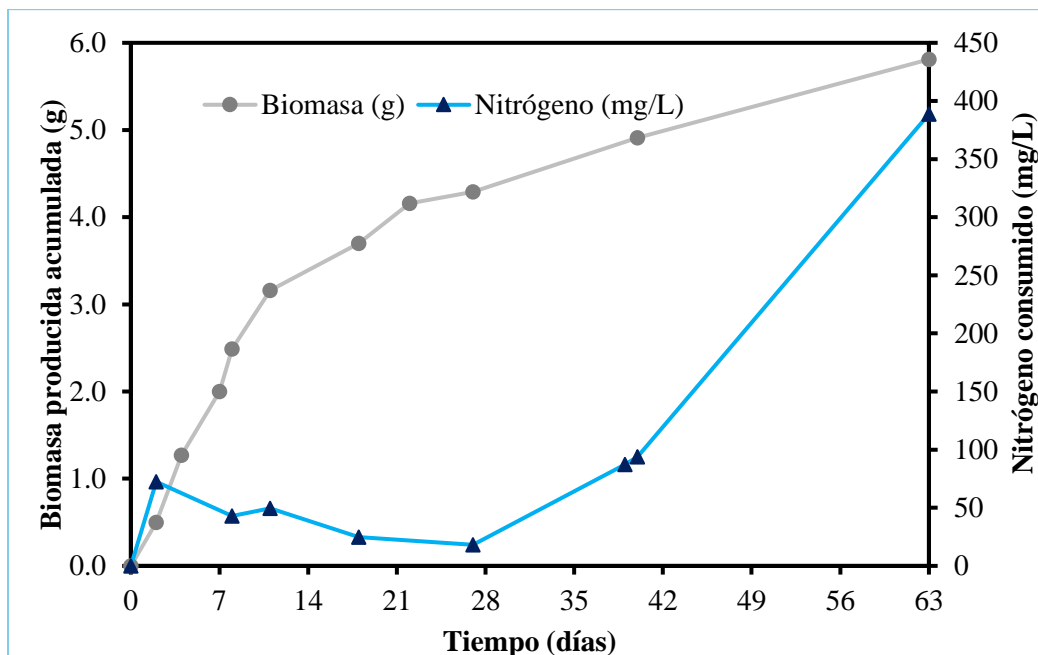
Comparando el co-cultivo CMAB-SE con las concentraciones reportadas por Li *et al.*, (2022) con 0.8 g/L, Rasouli *et al.*, (2018) con 1.48 g/L y Hill *et al.*, (2017) con 0.68 g/L los cuales son estudios en donde la mayoría utilizaron botella serológica para crecimiento, aguas residuales y cortos periodos (máximo de 200 horas, se puede concluir que la concentración del co-cultivo CMAB-SE fue tres veces mayor (4.11 g/L) con crecimiento en fotobiorreactor de tanque agitado.



**Figura 4.17** Concentración de biomasa y nitratos durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.

En la Figura 4.18, se muestra la biomasa total producida acumulada que toma en consideración la concentración de biomasa contenida en el reactor y de la muestra tomada, así como, los nitratos consumidos a partir de la adición de medio fresco posterior a la toma de muestra para reestablecer el volumen. En este caso, la biomasa acumulada presentó un

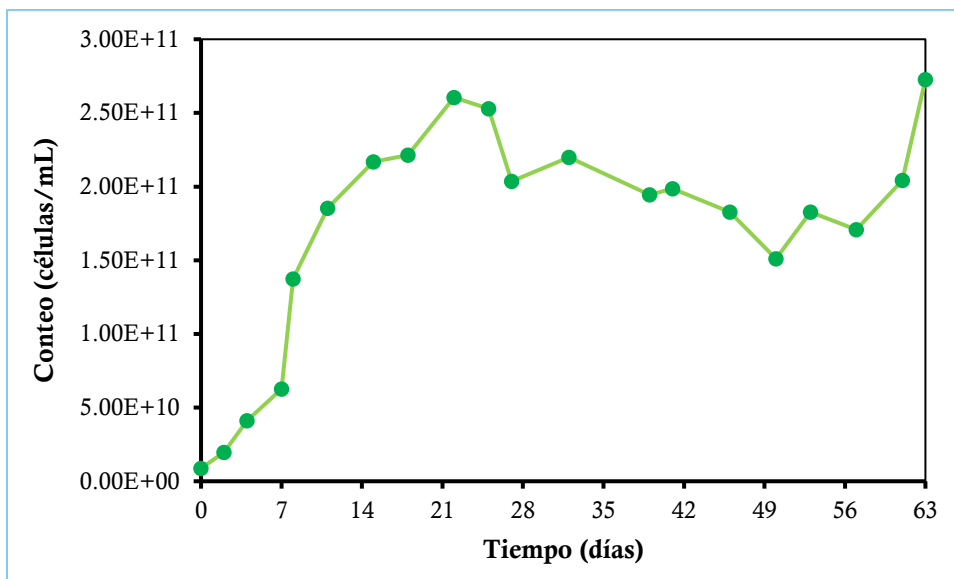
valor máximo de 5.81 g, mientras que para nitrógeno se consumió 388.71 mg/L durante la fase final del experimento.



**Figura 4.18** Biomasa producida acumulada y nitrógeno consumido durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.

El conteo celular realizado para determinar la proporción de cianobacterias en el co-cultivo se muestra en la Figura 4.19; teniendo como resultado un crecimiento constante de SE hasta el día 22, posterior a ello la cantidad de células comienza a disminuir, pero al observarlas en el microscopio óptico su tamaño se vio incrementado, lo cual podría deberse a la posible acumulación de PHB al interior de la célula (González-Resendiz *et al.*, (2021).

Una vez llegado el día 50 en donde se adicionó medio fresco 5 veces más concentrado, se presentó un nuevo incremento celular terminando con un máximo de  $2.73 \times 10^{11}$  células/mL.



**Figura 4.19** Conteo celular de *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 en el co-cultivo.

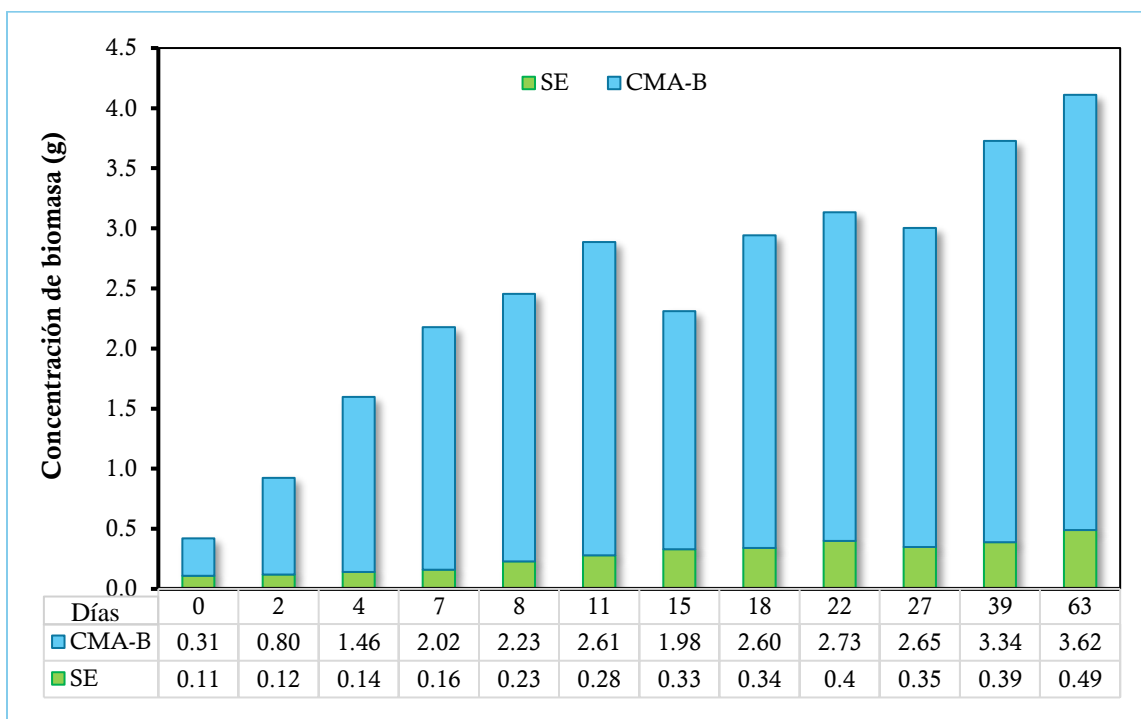
A partir de las dos graficas obtenidas, tanto de conteo celular como biomasa generada, se determinó la concentración de cada microorganismo en el co-cultivo, en donde la concentración de cianobacterias era determinada por la curva de calibración y la concentración del cultivo CMA-B por diferencia de biomasa.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.20, donde se apreció una mayor proporción de bacterias con masa final de 3.62 g, mientras que, la cantidad de las cianobacterias solo alcanzó una masa de 0.49 g; esto pudo ocasionarse tal como lo menciona Rasouli *et al.*, (2018) por la ausencia de carbono orgánico en el medio, que limita el crecimiento del microorganismo fotosintético, o bien, porque los microorganismos al estar en un sistema integrado compiten por nutrientes como el cobre, ocasionando un crecimiento excesivo de las bacterias y por ende un efecto de sombreado en el medio es decir, la cianobacteria no recibió la luz necesaria limitando su crecimiento y por consiguiente la fijación de carbono se vio disminuida (Biddanda *et al.*, 2015; Ray *et al.*, 2022).

Como alternativas ante las limitaciones presentadas para la cianobacteria, se puede realizar una optimización del reactor para obtener un aumento en la intensidad de luz, ya que, de acuerdo con la literatura algunas especies del género *Synechococcus* pueden soportar



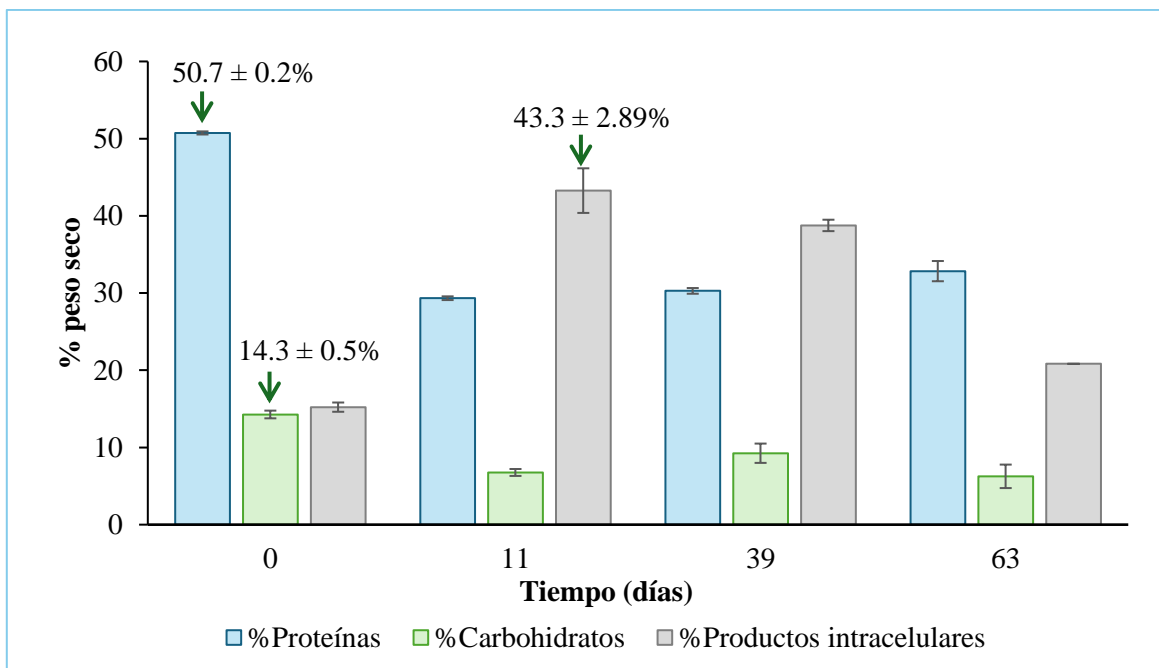
irradiancias de 500-1500  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  con crecimiento en reactores, sin que se produzcan efectos de fotoinhibición (Ungerer *et al.*, 2018).



**Figura 4.20** Concentración en gramos de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03 y el cultivo CMA-B en el co-cultivo a lo largo del tiempo.

Adicional a esto, se determinó el perfil bioquímico de las diferentes muestras tomadas (Figura 4.21), en donde se identificó un máximo de proteína del  $50.7 \pm 0.2\%$  y  $14.3 \pm 0.5\%$  de carbohidratos, ambos el día de la inoculación, debido a que la cianobacteria y el cultivo CMA-B ya habían estado en crecimiento previo en columna de burbujeo y en reactor respectivamente.

Por otra parte, para productos intracelulares de reserva, se presentó una acumulación de  $43.3 \pm 2.89\%$  al día 11, esto resulta de una disminución en los nitratos del medio tal como se observa en la Figura 4.17. Mientras que al día 39 se presenta el segundo valor más alto para productos intracelulares con  $38.8 \pm 0.74\%$ .



**Figura 4.21** Perfil bioquímico del co-cultivo CMAB-SE.

A raíz del crecimiento del co-cultivo CMAB-SE en un fotobiorreactor de tanque agitado y la limitación prolongada de oxígeno entre alimentaciones, era recomendable realizar un experimento simulando las condiciones de operación, pero a pequeña escala, para obtener resultados más concluyentes.

#### 4.7 Crecimiento en microcosmos en condiciones de luz y oscuridad

Para corroborar los datos obtenidos del co-cultivo y la limitación de oxígeno, se realizaron cinéticas en microcosmos bajo condiciones de luz y oscuridad, tomando como inóculo inicial la biomasa obtenida el día 63 del crecimiento en el fotobiorreactor de tanque agitado, en donde, la proporción ya se encontraba en 7:1 (bacteria:cianobacteria). A partir de las mediciones realizadas a las 24 y 28 horas se obtuvo lo siguiente.

El valor de pH inicial fue 7.38 el cual no fue ajustado a las condiciones anteriores, pero fue nuevamente medido transcurridas 28 horas obteniendo los datos de la Tabla 4.4. En este caso, para aquellas botellas con alimentación del 10 y 17% de CH<sub>4</sub> para ambas condiciones, se

presentó una disminución de pH a causa de la generación de CO<sub>2</sub> como parte del proceso de oxidación del consorcio, sin embargo, se esperaba que bajo condiciones de luz este parámetro incrementara o se mantuviera debido al consumo de CO<sub>2</sub> por parte de la cianobacteria, sin embargo, no fue así y se mantuvo cercano a los valores en condiciones de oscuridad (*Ray et al.*, 2022).

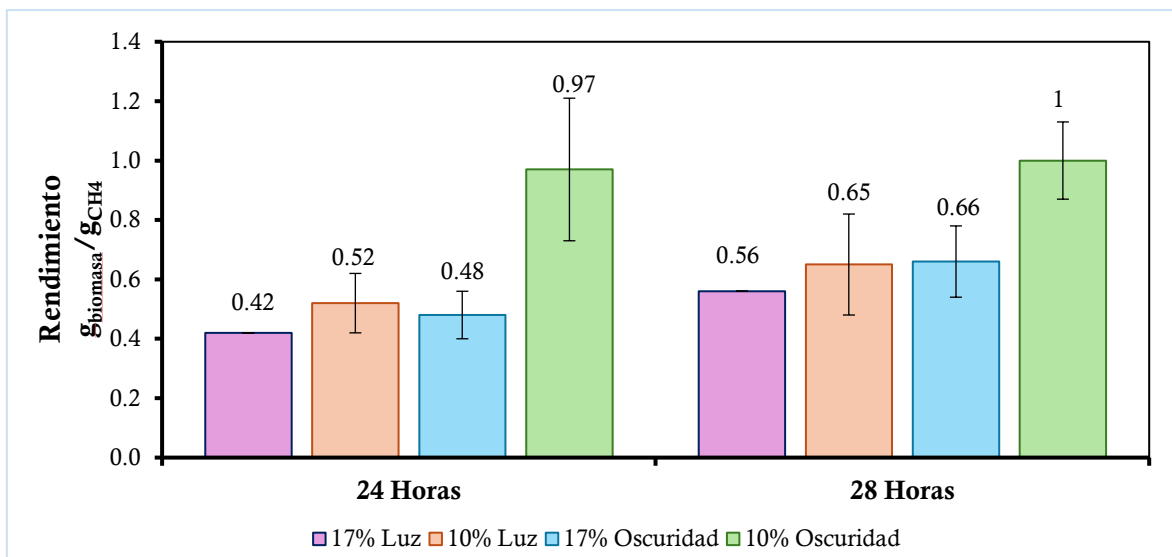
**Tabla 4.4** Valores de pH del co-cultivo en microcosmos después de 28 horas bajo condiciones de luz y oscuridad.

Luz		Oscuridad	
CH <sub>4</sub> (%)	pH final	CH <sub>4</sub> (%)	pH final
17	6.72	18	6.88
10	6.71	9	6.87
0	7.29	0	7.98

Para comprender mejor el comportamiento del co-cultivo, a partir de los valores medidos por CG-TCD en el espacio de cabeza se determinaron los rendimientos de  $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$  a concentraciones de 10 y 17% de CH<sub>4</sub>. Este valor nos permite medir cuanto CH<sub>4</sub> fue consumido en relación con la biomasa generada; mientras más alto sea el valor mayor porcentaje de CH<sub>4</sub> habrá sido consumido, es decir, es un parámetro que indica una conversión de CH<sub>4</sub> en biomasa. En la Figura 4.22 se presentan los rendimientos obtenidos para 24 y 28 horas.

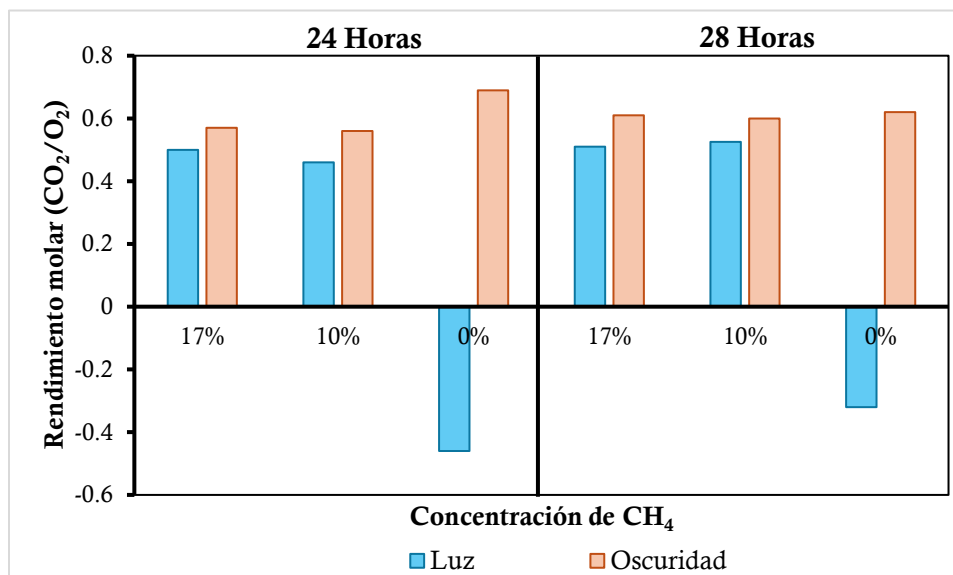
En el caso de las 24 horas se presenta mayor rendimiento a una concentración inicial de 10% de CH<sub>4</sub> en el espacio de cabeza con  $0.97 g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$  en condiciones de oscuridad; llegadas las 28 horas se presentan rendimientos de  $1.0 g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$  bajo la misma condición, esto nos indica que el cultivo metanotrófico oxida CH<sub>4</sub> en mayor proporción con una concentración inicial del 10%. Sin embargo, en condiciones de luz los rendimientos se ven reducidos a casi la mitad con  $0.52 g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$  a las 24 horas y  $0.65 g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$  a las 28 horas. Recordando las rutas metabólicas en donde la bacteria oxida CH<sub>4</sub> para generación de CO<sub>2</sub> y la cianobacteria capta CO<sub>2</sub> y por proceso fotosintético genera O<sub>2</sub>, en el co-cultivo la generación de O<sub>2</sub> es insuficiente y el poco que se llegue a generar *in situ* es posiblemente captado al instante por las bacterias.

Se esperaba que los rendimientos en condiciones de luz presentaran valores más altos debido a la generación de  $O_2$  por la cianobacteria, lo cual resultaría en un aumento de biomasa de ambos microorganismos, sin embargo, las condiciones de oscuridad presentan mayores rendimientos, porque la bacteria continúa consumiendo  $CH_4$  haciendo uso del  $O_2$  atmosférico contenido en el espacio de cabeza, mientras que, la cianobacteria no genera  $O_2$  porque las reacciones de oscuridad dirigen el carbono inorgánico a carbohidratos.



**Figura 4.22** Rendimientos de  $g_{biomasa}/g_{CH_4}$  en condiciones de luz y oscuridad a 10 y 17% de  $CH_4$ .

Ahora bien, en los rendimientos molares del coeficiente respiratorio  $CO_2/O_2$  a 24 y 28 horas (Figura 4.23), no se aprecia diferencia entre rendimientos, sin embargo, bajo concentraciones de 0% de  $CH_4$  hay valores negativos que indican generación de oxígeno por parte de la cianobacteria, lo cual ocurre en condiciones de luz por el proceso fotosintético y al no estar presente el  $CH_4$  la cianobacteria tiene el tiempo suficiente para la generación de  $O_2$  haciendo uso del  $CO_2$  atmosférico que pudo estar presente en el espacio de cabeza, además, los rendimientos presentan valores mayores en condiciones de oscuridad, ya que los metanótrofos no se ven afectados por la falta de luz (Miroshnikov *et al.*, 2019).



**Figura 4.23** Rendimientos molares de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> en condiciones luz y oscuridad con proporciones de CH<sub>4</sub> del 0, 10 y 17%.

Para los rendimientos molares O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> en donde teóricamente los valores máximos son 2 y 1, respectivamente (Ecuación 1), se obtuvo lo siguiente. En la Figura 4.24 se muestran del lado izquierdo los rendimientos molares de O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> que especifica cuanto CH<sub>4</sub> se está consumiendo de acuerdo con la proporción de O<sub>2</sub> presente en el espacio de cabeza.

Los valores máximos se presentaron bajo una concentración de 17% de CH<sub>4</sub> en condiciones de luz con valores de 1.19 y en condiciones de oscuridad con 10% de CH<sub>4</sub> con un valor de 1.26, a pesar de ello bajo las dos condiciones los rendimientos presentaron valores cercanos entre sí, ya que las bacterias ocupaban el O<sub>2</sub> presente en el espacio de cabeza el cual mantenía proporciones del 17-18%. Mientras que, en los rendimientos CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> que relaciona el CH<sub>4</sub> consumido y el CO<sub>2</sub> generado en el proceso oxidativo por bacterias, donde el valor máximo teórico es 1, bajo condiciones de 10% de CH<sub>4</sub> en oscuridad se presentaron rendimientos de 0.71-0.76 indicando una alta oxidación de CH<sub>4</sub> a la par que se libera CO<sub>2</sub> al espacio de cabeza que podría ser utilizado por la cianobacteria para reacciones fotosintéticas de oscuridad.

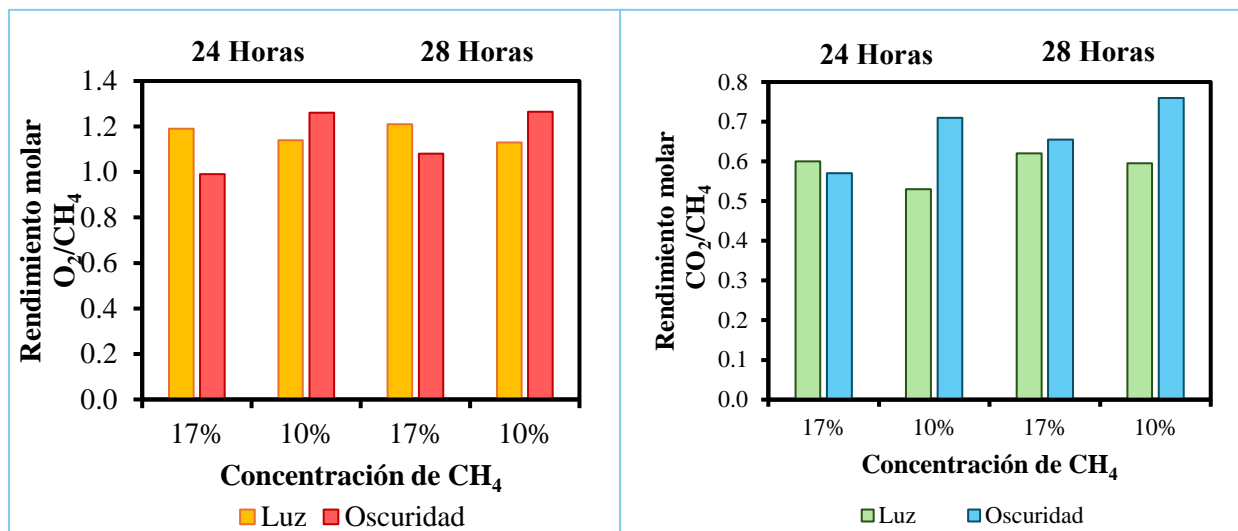


Figura 4.24 Rendimientos molares O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> en condiciones de luz y oscuridad.

A partir de estos resultados, se pudo suponer que cuando el co-cultivo fue crecido en el fotobiorreactor se encontraba limitado de oxígeno después de unas horas de haber sido alimentado, ya que al tener una proporción siete veces menor de cianobacterias, pero no indica que el microorganismo fotosintético se encuentre sin actividad, ya que en condiciones de 0% de CH<sub>4</sub> es capaz de generar O<sub>2</sub>, además, durante el co-cultivo también existe la presencia de O<sub>2</sub> pero el poco porcentaje que puede ser generado *in situ* resulta imperceptible en las mediciones al ser atrapado al instante por los microorganismos metanotróficos para el proceso de oxidación.

Pero para corroborar los resultados obtenidos, es preferible realizar un nuevo experimento en microcosmos y probar nuevas proporciones de los microorganismos, para evitar competencia y limitación de nutrientes, así como, evitar la limitación de O<sub>2</sub> y mantener altas velocidades de crecimiento (Ray *et al.*, 2022).

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Los objetivos propuestos para este proyecto de investigación fueron cumplidos. Se enriqueció y caracterizó un consorcio metanotrófico alcalófilo, que conservó los filos *Methylocystis* e *Hyphomicrobium* y la familia *Xanthomonadaceae*.

Mediante experimentos a diferentes pH en microcosmos y reactor de tanque agitado, se identificó que el cultivo CMA-B mantiene tasas específicas de biodegradación de CH<sub>4</sub> más altas a pH 8.7 y con una caracterización por perfil bioquímico se identificó que puede acumular una cantidad considerable de proteínas y productos intracelulares de reserva, como productos de interés con aplicación industrial.

La operación de un sistema integrado con un co-cultivo consorcio metanotrófico alcalófilo-cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03, con alimentación de CH<sub>4</sub> y una proporción 3:1 (bacteria:cianobacteria), se mantuvo durante 63 días resultando en una concentración de biomasa siete veces mayor para el consorcio metanotrófico, lo que ocasionó limitación de oxígeno en el sistema durante largos periodos, sin embargo, logró acumular un alto porcentaje de proteínas.

Los microcosmos bajo condiciones de luz y oscuridad con diferente concentración de CH<sub>4</sub>, permitieron suponer que la causa de la limitación de O<sub>2</sub> en el sistema, podría estar relacionada con una inadecuada proporción de microorganismos en el co-cultivo, pero para corroborar esta información se requieren más experimentos.

Así mismo, se pudieron identificar los parámetros que pueden encaminar a una operación sostenida de biorreactores, los cuales no se presentan en artículos u otras investigaciones y son necesarias para contar con un sistema robusto y exitoso. Dentro de estos parámetros se encuentra la intensidad de luz suministrada al microorganismo fotosintético la cual es necesaria para su crecimiento y evitar efectos de sombreado en el sistema, cuidando que no se produzcan fotoinhibición. Las proporciones de cada microorganismo deben ser determinadas previo a la evaluación de un co-cultivo y son cruciales para determinar si los microorganismos pueden presentar interacciones sinérgicas como mutualismo para su crecimiento y evitar limitación de oxígeno en el sistema antes de ser implementado en escalas

mayores y el pH y la temperatura óptima permiten que el sistema mejore las condiciones de crecimiento y puedan mantenerse por largos periodos.

A manera de perspectivas y recomendaciones se propone:

- Probar otras proporciones bacteria-cianobacteria para reducir la limitación de oxígeno.
- Favorecer la transferencia de CH<sub>4</sub> mediante un proceso de recirculación o aumento de la agitación.
- Incluir un condensador previo a la toma de muestra para eliminación de humedad.
- Instalar un sistema Arduino que permita la captura de datos en un intervalo más amplio de tiempo.
- Probar un co-cultivo con otros microorganismos que permitan la captura y mitigación de GEI.
- Probar biogás para un acercamiento a las aplicaciones de valorización de residuos.
- Estudiar la población heterótrofa del cultivo como *Pseudoxanthomonas*.
- Hacer repeticiones de los experimentos en reactor, para corroborar los resultados obtenidos.



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

<b>Figura 1.1</b> Ciclo biogeoquímico del carbono.....	14
<b>Figura 1.2</b> Ciclo biogeoquímico del metano.....	15
<b>Figura 1.3</b> Tipos de reactores utilizados para captura y mitigación de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> . A) Tanque agitado, B) Columna de burbujeo, C) Lecho fluidizado, D) Airlift, E) Lecho empacado, F) Membrana, G) Placas planas, H) Tanque Raceway, I) Tubular.....	17
<b>Figura 1.4</b> Vía de oxidación de metano en bacterias metanotróficas.....	18
<b>Figura 1.5</b> A) Estructura de la MMOs. B) Estructura de la MMOp.....	19
<b>Figura 1.6</b> Productos de valor agregado por bacterias metanotróficas.....	22
<b>Figura 1.7</b> Proceso de fotosíntesis oxigénica.....	23
<b>Figura 1.8</b> Productos de valor agregado de microalgas.....	26
<b>Figura 3.1</b> Metodología para enriquecimiento de la población bacteriana.....	39
<b>Figura 3.2</b> Esquema del reactor de tanque agitado.....	40
<b>Figura 3.3</b> Esquema del módulo de control.....	41
<b>Figura 3.4</b> Columna utilizada para crecimiento de la cianobacteria SE.....	42
<b>Figura 3.5</b> Sistema utilizado para el co-cultivo consorcio metanotrófico-cianobacteria.....	44
<b>Figura 4.1</b> Cinéticas de consumo de CH <sub>4</sub> y generación de CO <sub>2</sub> el primer y séptimo ciclo.....	51
<b>Figura 4.2</b> Tasas específicas de consumo de CH <sub>4</sub> al primer y séptimo ciclo, en microcosmos.....	52
<b>Figura 4.3</b> Crecimiento del cultivo CMA-B.....	55
<b>Figura 4.4</b> Cinéticas de consumo de CH <sub>4</sub> y generación de CO <sub>2</sub> a diferentes pH en reactor de tanque agitado.....	56
<b>Figura 4.5</b> Tasas de consumo de CH <sub>4</sub> a diferentes pH en el reactor de tanque agitado.....	57
<b>Figura 4.6</b> Cantidad de NaOH adicionado de acuerdo con el pH del cultivo en mmol/h.....	58
<b>Figura 4.7</b> Concentración de CI y NT en muestras obtenidas en los días de adaptación del cultivo CMA-B y en las cinéticas a diferentes pH en el reactor de tanque agitado.....	59
<b>Figura 4.8</b> Concentración de biomasa y consumo de nitrógeno durante 27 días de cultivo.....	60
<b>Figura 4.9</b> Perfil bioquímico de cultivo CMA-B con crecimiento a pH 8.7 durante 27 días.....	61
<b>Figura 4.10</b> Concentración de biomasa y consumo de nitrógeno durante 21 días de cultivo.....	62
<b>Figura 4.11</b> Cinéticas de consumo de CH <sub>4</sub> y generación de CO <sub>2</sub> a pH 8.7. En el recuadro inferior de cada figura se presentan las tasas específicas de consumo de CH <sub>4</sub> y tasas volumétricas.....	63
<b>Figura 4.12</b> Perfil bioquímico de cultivo CMA-B con crecimiento a pH 8.7 durante 21 días.....	64
<b>Figura 4.13</b> Fotografía de la cianobacteria SE a dos días de crecimiento en columna de burbujeo, con filtro de contraste de fases al 40X.....	65
<b>Figura 4.14</b> Cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> UAM-C/S03, observación a 40X por contraste de fases. A) Crecimiento a 7 días. B) Crecimiento a 40 días.....	66
<b>Figura 4.15</b> Gráficas de cinéticas de consumo el día de inoculación y cuarto día de crecimiento en el co-cultivo CMAB-SE.....	67
<b>Figura 4.16</b> Datos de OD y pH obtenidos por el sistema Arduino, durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.....	69
<b>Figura 4.17</b> Concentración de biomasa y nitratos durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.....	70
<b>Figura 4.18</b> Biomasa producida acumulada y nitrógeno consumido durante la operación del co-cultivo CMAB-SE.....	71

<b>Figura 4.19</b> Conteo celular de <i>Synechococcus elongatus</i> UAM–C/S03 en el co-cultivo. ....	72
<b>Figura 4.20</b> Concentración en gramos de la cianobacteria <i>Synechococcus elongatus</i> UAM–C/S03 y el cultivo CMA-B en el co-cultivo a lo largo del tiempo. ....	73
<b>Figura 4.21</b> Perfil bioquímico del co-cultivo CMAB-SE.....	74
<b>Figura 4.22</b> Rendimientos de $g_{\text{biomasa}}/g_{\text{CH}_4}$ en condiciones de luz y oscuridad a 10 y 17% de $\text{CH}_4$ . 76	
<b>Figura 4.23</b> Rendimientos molares de $\text{CO}_2/\text{O}_2$ en condiciones luz y oscuridad con proporciones de $\text{CH}_4$ del 0, 10 y 17%. ....	77
<b>Figura 4.24</b> Rendimientos molares $\text{O}_2/\text{CH}_4$ y $\text{CO}_2/\text{CH}_4$ en condiciones de luz y oscuridad. ....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.1</b> Tecnologías de captura y mitigación de $\text{CH}_4$ y $\text{CO}_2$ por procesos fisicoquímicos y biológicos.....	16
<b>Tabla 1.2</b> Características de las bacterias metanotróficas de acuerdo con su clasificación. ....	20
<b>Tabla 1.3</b> Estudios de co-cultivos bacteria metanotrófica-microorganismo fotosintético reportados en la bibliografía en la última década. ....	29
<b>Tabla 3.1</b> Composición del medio de cultivo MSM.....	37
<b>Tabla 3.2.</b> Composición del medio de cultivo modificado BG11.....	37
<b>Tabla 4.1</b> Abundancia de microorganismos encontrados en el cultivo CMA-B. ....	48
<b>Tabla 4.2</b> Valores de pH, biomasa y rendimientos molares del primer y séptimo ciclo de alimentación. ....	54
<b>Tabla 4.3</b> Reacciones de equilibrio de carbonatos y bicarbonatos en el medio ....	58
<b>Tabla 4.4</b> Valores de pH del co-cultivo en microcosmos después de 28 horas bajo condiciones de luz y oscuridad.....	75

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CH <sub>4</sub>	Metano
CI	Carbono inorgánico
CMA-A	Consorcio Metanotrófico Alcalófilo A
CMA-B	Consorcio Metanotrófico Alcalófilo B
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COT	Carbono orgánico total
DO	Densidad óptica
CMAB-SE	Co-cultivo Consorcio Metanotrófico Alcalófilo B- <i>Synechococcus elongatus</i> UAM-C/S03
ER	Eficiencia de remoción
GEI	Gases de efecto invernadero
HCl	Ácido clorhídrico
MMO	Metanomonooxigenasa
MMOp	Metanomonooxigenasa particulada
MMOs	Metanomonooxigenasa soluble
MSM	Medio de sales mínimas
NaOH	Hidróxido de sodio
NT	Nitrógeno total
OD	Oxígeno disuelto
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxitirato
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
rpm	Revoluciones por minuto
SE	<i>Synechococcus elongatus</i> UAM-C/S03

## REFERENCIAS

---

- Aaronson S. (1970). *Experimental Microbial Ecology* (1st edition). Academic Press, New York.
- AlSayed, A., Fergala, A., & Eldyasti, A. (2018). Sustainable biogas mitigation and value-added resources recovery using methanotrophs intergrated into wastewater treatment plants. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 351–393). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9464-3>
- AlSayed, A., Fergala, A., & Eldyasti, A. (2019). Enhancement of the cultivation process conditions of mixed culture methanotrophic Proteobacteria phylum enriched from waste activated sludge as the first step for value added recovery process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(5), 602–608. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.018>
- Avila Nuñez Geovanni. (2022). *Comunidades metanotróficas: excreción de metanol por Methylomonas methanica* [Proyecto terminal]. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Badr, K., He, Q. P., & Wang, J. (2022). Identifying interspecies interactions within a model methanotroph-photoautotroph coculture using semi-structured and structured modeling. *IFAC-PapersOnLine*, 55(7), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2022.07.429>
- 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. *IFAC-PapersOnLine*, 52(1), 916–921. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.179>
- Biddanda, B. A., McMillan, A. C., Long, S. A., Snider, M. J., & Weinke, A. D. (2015). Seeking sunlight: Rapid phototactic motility of filamentous mat-forming cyanobacteria optimize photosynthesis and enhance carbon burial in Lake Huron's submerged sinkholes. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00930>
- Bordel, S., Rojas, A., & Muñoz, R. (2019). Reconstruction of a Genome Scale Metabolic Model of the polyhydroxybutyrate producing methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1154-5>
- Bowman, J. (2006). The Methanotrophs — The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 266–289). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_15](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_15)
- Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, & Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. In *Chemosphere* (Vol. 305). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135508>

- Crippa M., Guizzardi D., Banja M., Solazzo E., Muntean M., Schaaf E., Pagani F., Monforti-Ferrario F., Olivier, J. G. J. , Quadrelli, R. , Risquez Martin, A. , Taghavi-Moharamli, P. , Grassi, G. , Rossi, S. , Oom, D. , Branco, A. , San-Miguel, J. , & Vignati, E. (2022). CO2 emissions of all world countries. *JRC/IEA/PBL 2022 Report, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2022*. <https://doi.org/10.2760/07904>, JRC130363
- de Souza, M. P., Hoeltz, M., Gressler, P. D., Benitez, L. B., & Schneider, R. C. S. (2019). Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges. In *Waste and Biomass Valorization* (Vol. 10, Issue 8, pp. 2139–2156). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0253-6>
- Dedysh, S. N., & Dunfield, P. F. (2011). Facultative and obligate methanotrophs: How to identify and differentiate Them. In *Methods in Enzymology* (Vol. 495, pp. 31–44). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386905-0.00003-6>
- Dodds, W. K. (2002). Carbon. *Freshwater Ecology*, 229–244. <https://doi.org/10.1016/B978-012219135-0/50013-1>
- Dvorák, P., Casamatta, D. A., Hašler, P., Jahodářová, E., Norwich, A. R., & Poulícková, A. (2017). Diversity of the cyanobacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes: Environmental and Applied Aspects* (pp. 3–46). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5_1)
- EPA. (2021). *Importance of Methane | United States Environmental Protection Agency US EPA*. <https://www.epa.gov/gmi/importance-methane>
- 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>
- Garcia-Pichel F. (2009). Cyanobacteria. In *Encyclopedia of Microbiology, Elsevier* (Third Edition, pp. 107–124).
- Geşicka, A., Oleskowicz-Popiel, P., & Łężyk, M. (2021). Recent trends in methane to bioproduct conversion by methanotrophs. In *Biotechnology Advances* (Vol. 53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107861>
- González-Resendiz, L., Sánchez-García, L., Hernández-Martínez, I., Viguera-Ramírez, G., Jiménez-García, L. F., Lara-Martínez, R., & Morales-Ibarria, M. (2021). Photoautotrophic poly(3-hydroxybutyrate) production by a wild-type *Synechococcus elongatus* isolated from an extreme environment. *Bioresource Technology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125508>
- Graham, J. E. ; W. L. W. ; G. L. E. (2009). Chapter 1. Introduction to the algae: occurrence, relationships, nutrition, definition, general features. In *Algae* (Second Edition, pp. 1–29).

- Guerrero-Cruz, S., Vaksmaa, A., Horn, M. A., Niemann, H., Pijuan, M., & Ho, A. (2021). Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678057>
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic Bacteria. In *MICROBIOLOGICAL REVIEWS* (Vol. 60, Issue 2). <https://journals.asm.org/journal/mr>
- 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. *Bioresource Technology*, 228, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.111>
- IEA. (2023). *CO2 Emissions in 2023. A new record high, but is there light at the end of the tunnel?* [www.iea.org](http://www.iea.org)
- IPCC. (2007). *Climate change 2007 : the physical science basis : contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Jawaharraj, K., Shrestha, N., Chilkoor, G., Dhiman, S. S., Islam, J., & Gadhamshetty, V. (2020). Valorization of methane from environmental engineering applications: A critical review. In *Water Research* (Vol. 187). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116400>
- Kalyuzhnaya, M. G., Puri, A. W., & Lidstrom, M. E. (2015). Metabolic engineering in methanotrophic bacteria. *Metabolic Engineering*, 29, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.010>
- 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. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3785>
- 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). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 150–158. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020088>
- Kim, S.-J., & Kwon, K. K. (2010). Bacteroidetes. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1813–1817). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_132](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_132)
- Kong, S., She, Y., Jia, C., Wang, C., & Roxaua Vauesa, C. C. (2013). Physiological characteristics and primary identification of a methane-fed bacterium from a natural gasfield in China. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76, 67–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.006>

- Kwon, M., Ho, A., & Yoon, S. (2019). Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with biotechnological potentials: recent achievements and perspectives. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1>
- 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. *Environmental Science and Technology*, 56(6), 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. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Issue 6, pp. 2277–2303). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- Maghzian, A., Aslani, A., & Zahedi, R. (2024). A comprehensive review on effective parameters on microalgae productivity and carbon capture rate. *Journal of Environmental Management*, 355. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120539>
- Miroshnikov, K. K., Belova, S. E., & Dedysh, S. N. (2019). Genomic Determinants of Phototrophy in Methanotrophic Alphaproteobacteria. *Microbiology (Russian Federation)*, 88(5), 548–555. <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. *Bioresource Technology*, 155, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mitra, P., Ahmed, S. M. M., Mahmud, D. M., & Zeyad, M. (2022). An Overview of the Progress of CO<sub>2</sub>Capture Technologies. *2022 11th International Conference on Power Science and Engineering, ICPSE 2022*, 142–147. <https://doi.org/10.1109/ICPSE56329.2022.9935495>
- Mobin, S. M. A., Chowdhury, H., & Alam, F. (2019). Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*, 160, 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2019.02.183>
- Morales, M., Sánchez, L., & Revah, S. (2018). The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 365(3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx262>
- Mühlemeier, I. M., Speight, R., & Strong, P. J. (2018). Biogas, bioreactors and bacterial methane oxidation. In *Methane Biocatalysis: Paving the Way to Sustainability* (pp. 213–235). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74866-5_14)
- Nabilah, B., Purnomo, A. S., Prasetyoko, D., & Rohmah, A. A. (2023). Methylene Blue biodecolorization and biodegradation by immobilized mixed cultures of *Trichoderma viride* and *Ralstonia pickettii* into SA-PVA-Bentonite matrix. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(8). <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104940>

- NOAA. (2023a). *Trends in Atmospheric Carbon Dioxide*. Global Monthly Mean CO<sub>2</sub>. <https://gml.noaa.gov/ccgg/trends/global.html>
- NOAA. (2023b). *Trends in Atmospheric Methane*. Global CH<sub>4</sub> Monthly Means. [https://gml.noaa.gov/ccgg/trends\\_ch4/](https://gml.noaa.gov/ccgg/trends_ch4/)
- ONU. (2021a). *Global methane assessment: Benefits and Costs of Mitigating Methane Emissions* (United Nations Environment Programme and Climate and Clean Air Coalition, Ed.).
- ONU. (2021b). *La ONU lanza un Observatorio para ayudar a reducir las emisiones de metano a la atmósfera* | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2021/10/1499232>
- Ramanan, R., Kim, B. H., Cho, D. H., Oh, H. M., & Kim, H. S. (2016). Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 34, Issue 1, pp. 14–29). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>
- 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. *Biochemical Engineering Journal*, 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. In *Science of the Total Environment* (Vol. 802). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149765>
- Rippka, E., Deruelles, J., & Waterbury, N. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 111).
- 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. *Frontiers in Energy Research*, 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(1), 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.028>
- Rocha-Rios, J., Quijano, G., Thalasso, F., Revah, S., & Muñoz, R. (2010). Methane biodegradation in a two-phase partition internal loop airlift reactor with gas recirculation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(3), 353–360. <https://doi.org/10.1002/jctb.2523>
- Ruiz-Ruiz P. (2023). *Co-cultivo de bacterias metanotróficas y microalgas para la mitigación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>* [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa .



- Ruiz-Ruiz, P., Estrada, A., & Morales, M. (2020). Carbon dioxide capture and utilization using microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds* (pp. 185–206). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00008-7>
- 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>
- Ruiz-Ruiz, P., Gómez-Borraz, T. L., Saldivar, A., Hernández, S., Morales-Ibarria, M., & Revah, S. (2024). Diluted methane mitigation by a co-culture of alkaliphilic methanotrophs and the microalgae *Scenedesmus obtusiusculus* towards carbon neutrality. *Biochemical Engineering Journal*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109211>
- Safitri, A. S., Hamelin, J., Kommedal, R., & Milferstedt, K. (2021). Engineered methanotrophic syntrophy in photogranule communities removes dissolved methane. *Water Research X*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2021.100106>
- Saldivar-García A. (2021). Estudio del ensamble de una comunidad microbiana con actividad metanotrófica. In *Idónea comunicación de resultados*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.
- Salehi, R., & Chaiprapat, S. (2022). Conversion of biogas from anaerobic digestion to single cell protein and bio-methanol: mechanism, microorganisms and key factors-A review. In *Environmental Engineering Research* (Vol. 27, Issue 4). Korean Society of Environmental Engineers. <https://doi.org/10.4491/eer.2021.109>
- Samanta, D., & Sani, R. K. (2023). Methane Oxidation via Chemical and Biological Methods: Challenges and Solutions. *Methane*, 2(3), 279–303. <https://doi.org/10.3390/methane2030019>
- Schmitz, R. A., Peeters, S. H., Versantvoort, W., Picone, N., Pol, A., Jetten, M. S. M., & Op Den Camp, H. J. M. (2021). Verrucomicrobial methanotrophs: Ecophysiology of metabolically versatile acidophiles. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 45, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab007>
- Selvaraj, G. K., Wang, H., Zhang, Y., Tian, Z., Chai, W., & Lu, H. (2022). Class 1 Int5393c array contributed to antibiotic resistance of non-pathogenic *Pseudoxanthomonas mexicana* isolated from a wastewater bioreactor treating streptomycin. *Science of the Total Environment*, 821. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153537>

- Semrau, J. D., diSpirito, A. A., & Vuilleumier, S. (2011). Facultative methanotrophy: False leads, true results, and suggestions for future research. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 323, Issue 1, pp. 1–12). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02315.x>
- Singh, B. K., Bardgett, R. D., Smith, P., & Reay, D. S. (2010). Microorganisms and climate change: Terrestrial feedbacks and mitigation options. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 11, pp. 779–790). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2439>
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. Diversity and Significance. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* (pp. 11–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- Singh, S. P., & Montgomery, B. L. (2011). Determining cell shape: Adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. In *Trends in Microbiology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 278–285). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.001>
- Skeie, R. B., Hodnebrog, Ø., & Myhre, G. (2023). Trends in atmospheric methane concentrations since 1990 were driven and modified by anthropogenic emissions. *Communications Earth and Environment*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00969-1>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 6, pp. 896–907). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009>
- Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geißdörfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R., Monroy, O., Labat, M., & Ouattara, A. S. (2004). *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2245–2255. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02810-0>
- UNEP. (2021). *Lo que necesitas saber sobre la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático COP26*. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/lo-que-necesitas-saber-sobre-la-conferencia-de-las-naciones-unidas>
- Ungerer, J., Lin, P.-C., Chen, H.-Y., & Pakrasi, H. B. (2018). *Adjustments to Photosystem Stoichiometry and Electron Transfer Proteins Are Key to the Remarkably Fast Growth of the Cyanobacterium Synechococcus elongatus UTEX 2973*. <https://doi.org/10>
- Wang, D. H., Zhu, M. Y., Lian, S. J., Zou, H., Fu, S. F., & Guo, R. B. (2022). Conversion of Renewable Biogas into Single-Cell Protein Using a Combined Microalga- and Methane-

- Oxidizing Bacterial System. *ACS ES and T Engineering*, 2(12), 2317–2325. <https://doi.org/10.1021/acsestengg.2c00237>
- Wendlandt, K. D., Stottmeister, U., Helm, J., Soltmann, B., Jechorek, M., & Beck, M. (2010). The potential of methane-oxidizing bacteria for applications in environmental biotechnology. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 10, Issue 2, pp. 87–102). <https://doi.org/10.1002/elsc.200900093>
- Yun, J. H., Lee, H., Nam, J. W., Ko, M., Park, J., Lee, D. H., Lee, S. G., & Kim, H. S. (2024). Unlocking synergies: Harnessing the potential of biological methane sequestration through metabolic coupling between *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z and *Chlorella* sp. HS2. *Bioresource Technology*, 399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130607>
- Zhang, B., Cai, C., & Zhou, Y. (2023). Iron and nitrogen regulate carbon transformation in a methanotroph-microalgae system. *Science of the Total Environment*, 904. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166287>
- 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. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 876–882. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.011>
- Zuñiga, C., Morales, M., & Revah, S. (2013). Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates. *Bioresource Technology*, 129, 686–689. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.120>
- Zuñiga, C., Zaramela, L., & Zengler, K. (2017). Elucidation of complexity and prediction of interactions in microbial communities. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 1500–1522). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12855>

## ANEXOS

---

### ANEXO 1. Técnicas de perfil bioquímico

#### A. Cuantificación de carbohidratos por 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.

##### *Pretratamiento de muestra*

Para muestras frescas se toma 1 mL de cultivo (V1) con concentración de biomasa conocida, el cual se centrifuga a 14 000 rpm durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y la pastilla celular se re-suspende en 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, agitando en vórtex y se coloca tres ciclos en el homogeneizador.

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 14 000 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.

##### *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 0.01 g (10 mg) de glucosa y se afora a 100 mL con agua destilada. De la solución patrón, se hacen las diluciones descritas en la Tabla 1, en tubos de 2 mL (Eppendorf). Todos los puntos deberán realizarse por triplicado.

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

Tubo	Volumen solución patrón	Volumen de agua destilada	Volumen total	Concentración de Glucosa	Absorbancia (485 nm)
Blanco	0 µL	2 000 µL	2000 µL	0 µg/mL (Blanco)	
1	400 µL	1 600 µL	2000 µL	20 µg/mL	
2	800 µL	1 200 µL	2000 µL	40 µg/mL	

3	1 200 $\mu\text{L}$	800 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{g/mL}$	
4	1 600 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{g/mL}$	
5	2 000 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$	2000 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{g/mL}$	

Una vez realizadas las diluciones y mezcladas 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  $R^2$  y el valor de la pendiente (m). Donde  $R^2 > 0.98$ , en caso de obtenerse un valor inferior deberá prepararse nuevamente la curva.

#### *Metodología de Dubois*

1. En un tubo de ensaye de al menos 5 mL agregar 500  $\mu\text{L}$  de la muestra.
2. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de fenol al 5% (p/v) y agitar ligeramente. Después dejar la muestra 40 min en reposo.
3. Terminado el tiempo, adicionar 2.5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado de manera lenta por las paredes y agitar en el vórtex usando pinzas para tubo de ensaye.
4. 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 ( $\mu\text{g}_{\text{carbohidratos/mL}}$ ) en el extracto ácido. Se considera el volumen de muestra ( $V_1$ , mL), la concentración de la muestra ( $X$ ,  $\text{g}_{\text{biomasa/L}}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V_2$ , mL).

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{carbohidratos}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1\text{g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1\text{L}}\right) \left(\frac{\text{Vol. extracto (V2 mL)}}{\text{Vol. de medio (V1 mL)}}\right)}{\left(\frac{X \text{ g}_{\text{bio}}}{\text{L}}\right)} * 100$$

### Curva de calibración

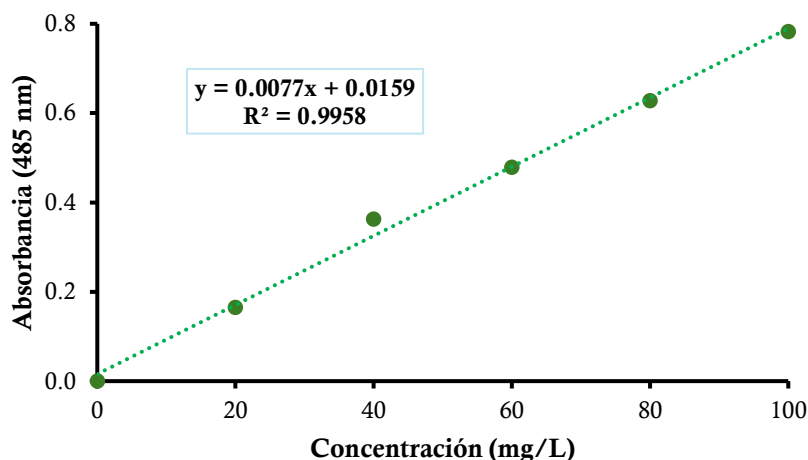


Figura 1. Curva de calibración para carbohidratos.

### B. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

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

#### Pretratamiento de muestra

Para muestras frescas se utiliza 1 mL de cultivo (V1) con concentración de biomasa conocida, el cual se coloca en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifuga a 14 000 rpm por 10 min. Posteriormente se desecha el sobrenadante.

La pastilla celular se re-suspende en 1 mL de NaOH (0.2 N), agitando en vórtex, se coloca tres ciclos en el homogeneizador y 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 14 000 rpm durante 10 minutos.

#### Curva estándar

El stock de la solución estándar se prepara utilizando Suero 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. 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 (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.

Tubo	Volumen de solución estándar (mL)	Volumen de solución NaOH 0.2 N (mL)	Concentración de proteína BSA (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia (750 nm)
Blanco	0	1.0	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	0	300	

Los datos de la Tabla 2 se grafican y se ajustan utilizando de 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 200 µL del extracto alcalino.
2. Agregar 100 µL de reactivo A de Bio-Rad.
3. Posteriormente agregar 800 µL de reactivo B de 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.

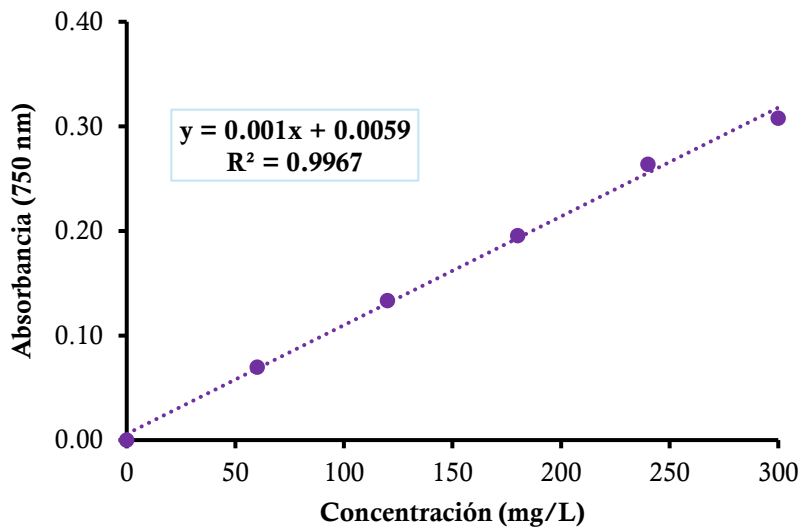
**Nota:** Como blanco se utiliza 200 µL de NaOH 0.2 N y siguiendo los pasos 2-4.

### Cálculos

A partir de la curva de patrón se obtiene la concentración ( $\mu\text{g}_{\text{proteínas}}/\text{mL}$ ) en el extracto alcalino. Se considera el volumen de muestra ( $V1$ , mL), la concentración de la muestra ( $X$ ,  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$ ) y el volumen total del extracto ácido recuperado ( $V2$ , mL).

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g}_{\text{proteínas}}}{\text{mL}}\right) \left(\frac{1\text{g}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}}\right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1\text{L}}\right) \left(\frac{\text{Vol. extracto (V2 mL)}}{\text{Vol. de medio (V1 mL)}}\right)}{\left(\frac{X \text{ g}_{\text{bio}}}{\text{L}}\right)} * 100$$

### Curva de calibración



**Figura 2.** Curva de calibración para proteínas.

### C. Cuantificación de productos intracelulares de reserva por el método de sulfosfo-vainillina (SPV)

#### Pretratamiento de muestra

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



**Tabla 3.** Sección de volumen de medio de cultivo para productos intracelulares.

Concentración de biomasa de la muestra (g/L)	Cantidad de muestra a tomar (μL)
$C < 0.4$	300
$0.4 \leq C < 0.8$	200
$1 \leq C$	100

Agregar 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (98%) sobre las paredes del tubo. Posteriormente, tapar los tubos y agitar en vórtex. 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 una semana de preparado. Conservar en refrigerador y protegido de la luz ya que el reactivo es fotosensible. 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 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 μg<sub>lipidos</sub>/μL. La solución estándar se reserva y se almacena a una temperatura de -20°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 μg<sub>lipidos</sub>.

### *Cálculos de volumen del stock*

Los volúmenes requeridos de la solución estándar se calculan utilizando la ecuación  $M = C * V$ . Donde, M es la cantidad de lípidos requerida, C es la concentración de la solución estándar ( $2\mu\text{g}_{\text{lipidos}}/\mu\text{L}_{\text{solución estándar}}$ ) y V el volumen requerido de la solución estándar.

$$M/C = V$$

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

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

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

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

$$(50\mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2\mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 25\mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(60\mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2\mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 30\mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

$$(70\mu\text{g}_{\text{lip}}) \left( \frac{1 \mu\text{L}_{\text{sln std}}}{2\mu\text{g}_{\text{lip}}} \right) = 35\mu\text{L}_{\text{sln std}}$$

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  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Posteriormente procesar siguiendo técnica de cuantificación de lípidos con SPV.

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

<b>Tubo</b>	<b>Volumen de Stock (µL)</b>	<b>Lípidos (µg)</b>	<b>Volumen de agua (µL)</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>	<b>Volumen de 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.

**NOTA:** Para el blanco utilizar 100 µL de agua destilada y 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Posteriormente, seguir los pasos 1-4.

**Notas adicionales:**

- \* 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 ( $\mu\text{g}_{\text{Lípidos}}$ ). Se considera el volumen de muestra algal ( $V1$ , mL), la concentración de la muestra ( $X$ ,  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{L}$ ).

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

## Curva de calibración

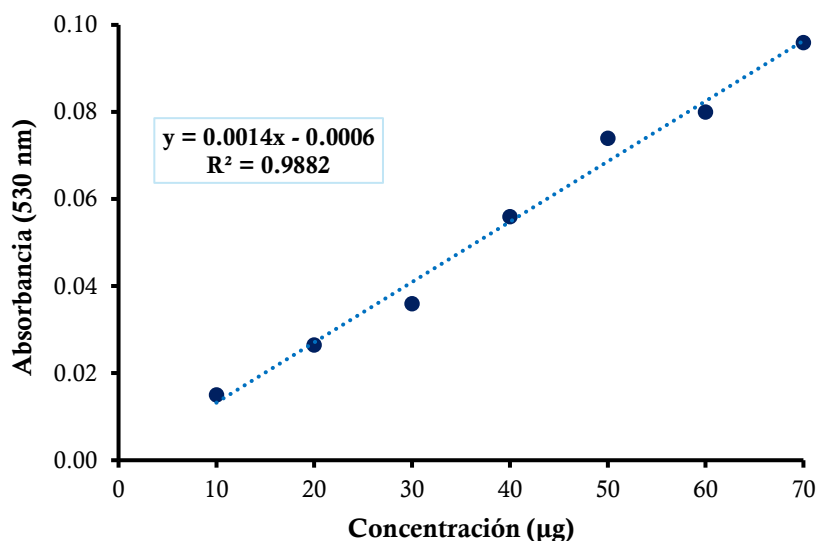


Figura 3. Curva de calibración para lípidos.

## D. Determinación de nitratos por espectrofotometría UV

### Procedimiento

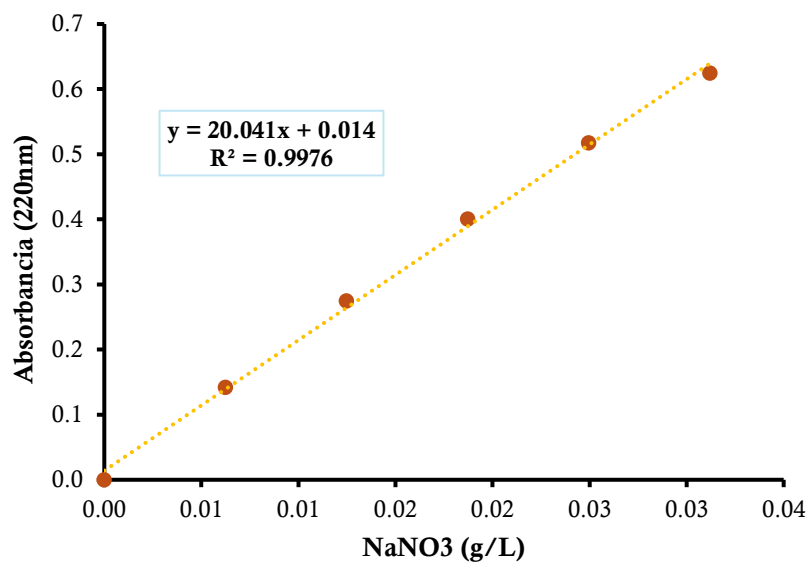
1. Se filtran 10 mL en una membrana de 0.8  $\mu\text{m}$  para microalgas y 0.2  $\mu\text{m}$  para bacterias. El filtrado se usa para la cuantificación de  $\text{NO}_3$
2. Se toma 2 mL de la muestra y se le adicionan 1 mL de HCl 1N.

**NOTA:** Se realiza una dilución de la muestra 1:100 con agua MiliQ durante las etapas iniciales de cultivo cuando la concentración de biomasa es baja y por tanto se esperan los valores de nitratos más altos, posteriormente pueden utilizarse diluciones menores

3. Agitar en Vortex durante 30 segundos y leer a densidad óptica de 220 nm.

**NOTA:** El blanco se prepara con agua MiliQ y siguiendo los pasos 2-3.

*Curva de calibración*



**Figura 4.** Curva de calibración para nitratos.

ANEXO 2. Árbol de abundancias del CMA-B.

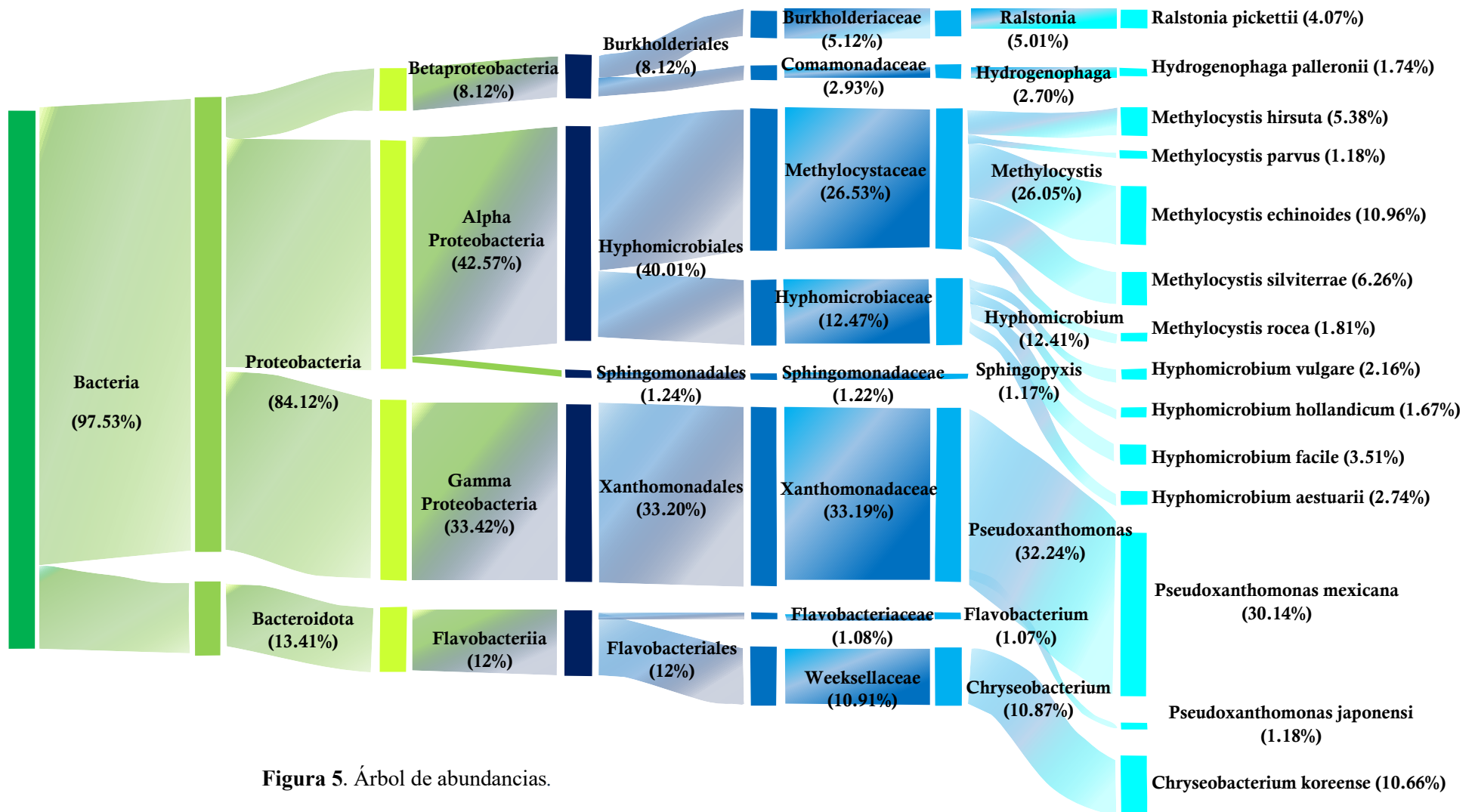


Figura 5. Árbol de abundancias.

### ANEXO 3. Curva de equilibrio carbonatos/bicarbonatos con respecto al pH

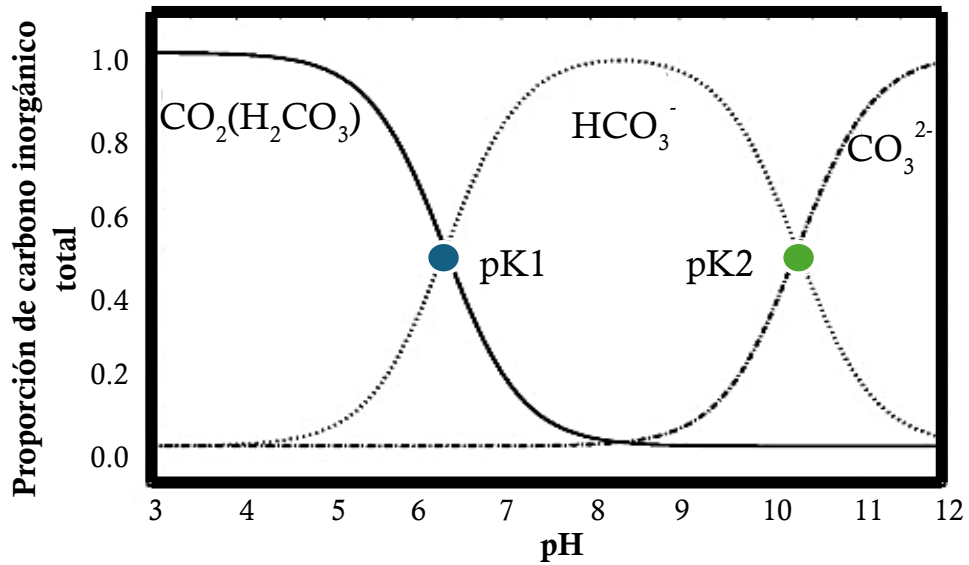


Figura 6. Equilibrio del carbono con respecto al pH del medio (Modificado de Dodds, 2002).

### ANEXO 4. Gráfica de conteo celular vs biomasa de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UAM-C/S03

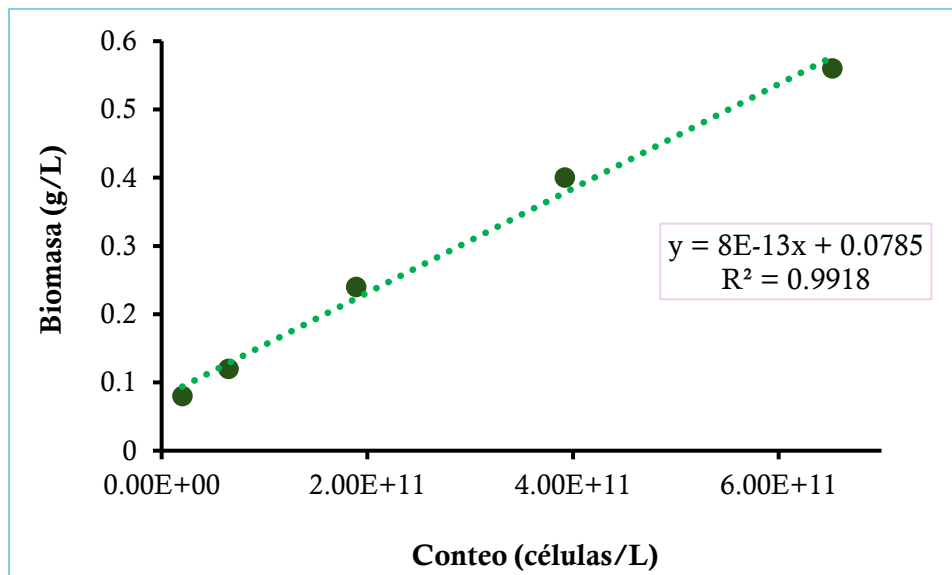


Figura 7. Gráfica de conteo celular vs biomasa de la cianobacteria *S. elongatus* UAM-C/S03