



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

**Producción de bioplásticos integrada a un tratamiento de
aguas residuales en un biorreactor con membranas
sumergidas**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

presenta:

IBQ. Diana Isela Loeza Barragán

Director de tesis:

Dr. Julio César Orantes Ávalos

Co-directora de tesis:

M.C. Abril Munro Rojas

Morelia, Michoacán; septiembre de 2017.

A mí mamá, con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Al Dr. Julio César Orantes Avalos por la confianza que puso en mí para la realización de este proyecto y por su paciencia.

A la M.C. Abril Munro Rojas por el gran apoyo y la comprensión que siempre me brindó durante los momentos difíciles. Gracias también por su asesoría académica y sus sugerencias como co-asesora.

A las Doctoras Ruth Alfaro Cuevas Villanueva y Ma. Del Carmen Chávez Parga y al M.C. Isaías Negra Jiménez por su apoyo y disposición como revisores del presente trabajo.

Al laboratorio de biología acuática de la Facultad de biología de la UMSNH.

Al laboratorio de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera.

A los Doctores Juan Pablo García Merinos e Ylinana López Castro y a la M.C. Alejandra Pérez Nava del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, por el apoyo brindado para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto.

Al Doctor Juan Carlos González Hernández y su equipo del laboratorio de bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia.

A la Doctora Yvonne Herreras Diego y al Doctor Javier Ponce Saavedra.

A Víctor, mi compañero de equipo que compartió conmigo el trabajo, la presión y el éxito de nuestras bacterias.

A los compañeros que se volvieron mis amigos, Carmen y Daniel por su generoso apoyo en las largas jornadas de trabajo, y por el invaluable regalo de su amistad.

A mi mamá, Teya, a quien le debo todo lo bueno que soy y a mis hermanos Miguel y Beto, mis mejores amigos.

A Vishy, por su amor y su apoyo incondicional a pesar de mis ganas desmedidas de demolerlo todo.

RESUMEN

Ante la necesidad de hacer de los bioplásticos una alternativa competitiva frente a los plásticos de origen sintético, parte de los esfuerzos de investigación se centran en el desarrollo de procesos que utilicen materias primas de bajo costo y en la obtención del polímero a altos rendimientos. En el presente trabajo se integró la producción de PHAs a un sistema continuo de tratamiento de aguas residuales en un BRM a escala laboratorio, con capacidad para tratar un caudal de 22.09 L·d⁻¹. Se utilizó un cultivo mixto de biomasa en suspensión a una concentración de 5g·L⁻¹, bajo condiciones aerobias (>2mgO₂·L⁻¹) y pH neutro. La biomasa se alimentó con dos distintos diseños de aguas residuales sintéticas, formuladas a partir de un sustrato simple y fácilmente biodegradable (ácido acético y glucosa) con una relación C:N:P de 30:2:1. El BRM se operó con dos cargas orgánicas de operación (0.1 y 0.3 (kgDQO·kgSSV⁻¹·d⁻¹)).

En todas las condiciones operacionales, se obtuvieron eficiencias de remoción de materia orgánica y nitrógeno amoniacal superiores a 99% y 97%, respectivamente, obteniendo un efluente de calidad. El coeficiente de rendimiento celular de PHAs incrementó al aumentar la carga orgánica de operación, pasando de 4.06% a 5.01% con el agua residual formulada a base de glucosa, mientras que incrementó de 2.53% a 8.89% con el agua residual diseñada a base de ácido acético.

Palabras clave: Biorreactor con membranas sumergidas, BRM, bioplásticos, polihidroxicanoatos, polihidroxibutirato, tratamiento de aguas residuales, cultivos microbianos mixtos.

ABSTRACT

Given the need to make bioplastics a competitive alternative to plastics of synthetic origin, part of the research efforts are focused on the development of processes that use low-cost raw materials and on obtaining the polymer at high yields. In the present work, the production of PHA was integrated to a continuous system of treatment of residual waters in a lab-scale MBR, with a capacity to treat 22.09 L·d⁻¹. A mixed liquor suspended culture at a 5 gVSS·L⁻¹, under aerobic conditions (> 2 mgO₂·L⁻¹) and neutral pH was used. Biomass was fed with two simple synthetic wastewater designs, formulated with a readily biodegradable substrate (acetic acid and glucose) at a C:N:P ratio of 30: 2: 1. The substrates were supplied at two different organic loading conditions (0.1 and 0.3 kgCOD·kgVSS⁻¹·d⁻¹).

For all the operating conditions, the organic matter and ammonia nitrogen removal efficiencies were above 99% and 97% respectively, obtaining a high-quality treated effluent. The PHA yield increased when the organic loading increased, from 4.06% to 5.01% with the glucose-based residual water design and, from 2.53% to 8.89% with the acetic acid based residual water design. Concluding that it was feasible to obtain PHA from a synthetic wastewater effluent in a continuously feed MBR.

Key words: MBR, bioplastics, polyhydroxyalkanoates, polyhydroxybutirate, wastewater treatment, mixed microbial cultures.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
NOTACIÓN	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO CONCEPTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
2.2 JUSTIFICACIÓN	12
2.3 HIPÓTESIS	13
2.4 OBJETIVOS.....	14
2.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
2.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	14
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	15
3.1.1 Estructura	15
3.1.2 Aplicaciones.....	16
3.1.3 Producción de PHAs.....	17
3.1.4 Sustratos empleados en la producción industrial de PHAs	18
3.1.5 Aguas residuales como sustrato en la producción de PHAs	19
3.1.6 Estrategias para incrementar la producción de PHAs	20
3.2 BIORREACTORES CON MEMBRANAS	21
3.2.1 Tipos de reactores empleados para la producción de PHA.....	21
3.2.2 Descripción y funcionamiento de los Biorreactores con Membrana ..	23
3.2.3 Producción de PHAs en un BRM.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Descripción del reactor piloto y condiciones de operación.....	26
4.1.1 Condiciones fisicoquímicas	26
4.1.2 Condiciones de filtración.....	28
4.1.3 Protocolo de lavado	29
4.1.4 Características del inóculo.....	29

4.1.5	Características del sustrato	30
4.2	Condiciones experimentales y seguimiento del reactor	32
4.2.1	Diseño experimental	32
4.2.2	Técnicas analíticas	33
4.3	Cuantificación de los PHAs	34
4.3.1	Cuantificación de PHAs por gravimetría	34
4.3.2	Cuantificación de PHB por espectrofotometría	35
4.4	Cálculos y análisis estadístico.....	35
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1	Comportamiento del BRM y eficiencia del tratamiento.....	38
5.1.1	Parámetros fisicoquímicos.....	38
5.1.2	Remoción de materia orgánica	39
5.1.3	Remoción de Nitrógeno amoniacal.....	40
5.1.4	Determinación de la actividad bacteriana	42
5.2	Recuperación y cuantificación gravimétrica del polímero obtenido	43
5.3	Cuantificación espectrofotométrica de PHB	49
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
6.1	Conclusiones.....	53
6.2	Validación de hipótesis.....	54
6.3	Recomendaciones.....	55
7.	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Estructura general de los PHAs, y ejemplos de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R). (Tomado de González et al., 2012).	15
Figura 3.2. Comparación entre diseños convencionales de lodos activados y reactores con membranas (Tomado y modificado de Le-Clech 2010).	24
Figura 4.1. Biorreactor con membranas sumergidas.	26
Figura 4.2. Esquema de operación del reactor. (Tomado de Negra 2015).	27
Figura 4.3. Módulo de membranas instalado en el reactor. a. Vista frontal. b. Vista de cara superior.	28
Figura 4.4. Reactor biológico de la planta de tratamiento "Las Garzas", Pátzcuaro; Michoacán.	30
Figura 5.1. Análisis discriminante canónico. (Temperatura, pH, DQOe, N-NH ₃ , CO).....	39
Figura 5.2. Muestras del polímero tipo PHA obtenido. a) Después de centrifugar, b) Después de extraer con cloroformo, c) Después de secado y recuperación.	43
Figura 5.3. Promedio de rendimientos de PHA obtenidos con las cuatro condiciones experimentales.	44
Figura 5.4. Rendimientos de PHAs obtenidos en función CO y relación C:N en reactores por lotes.	45
Figura 5.5. Análisis de Componentes Principales.	47
Figura 5.6. Porcentaje de acumulación de PHA por muestra vs tiempo de retención celular ●AC ●GL.	48
Figura 5.7. Porcentaje de acumulación de PHA vs porcentaje de remoción.	49
Figura 5.8. Fracción de PHB correspondiente a la concentración de PHA obtenido en cada condición.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Características generales y dimensiones del módulo de membranas .	28
Tabla 4.2. Protocolo de lavado de membranas.....	29
Tabla 4.3. Características iniciales de la suspensión.....	30
Tabla 4.4. Formulación de los cuatro diseños de agua resdiadual sintética.	31
Tabla 4.5. Diseño experimental de dos factores con dos niveles	32
Tabla 4.6. Periodo de tiempo comprendido por cada etapa experimental. A: periodo de adaptación. E: periodo estable	32
Tabla 4.7. Frecuencia y zona de los muestreos de cada parámetro por periodo de reacción.....	33
Tabla 4.8. Metodología y equipos empleados en el análisis de parámetros de seguimiento del BRM	34
Tabla 5.1. Promedios de pH y temperatura durante periodos de carga estabilizada	38
Tabla 5.2. Promedios de DQO en el sistema y porcentaje de remoción durante periodos estables (n=3).....	40
Tabla 5.3. Promedios de Nitrógeno amoniacal, nitrógeno asimilado por la biomasa, y porcentaje de remoción, durante periodos estables (n=3)	41
Tabla 5.4. Coeficientes cinéticos y estequiommétricos por cada condición experimental. (media \pm ds, n=3).....	42
Tabla 5.5. Resumen del análisis de varianza realizado las pruebas gravimétricas	46

NOTACIÓN

Notación	Descripción	Unidades
A	Área de filtración	m ²
AC	Ácido acético	
BRM	Biorreactor de membranas sumergidas	
CO	Carga Orgánica	kg _{DQO} •kg _{SSV} •d ⁻¹
C:N:P	Relación Carbono:Nitrógeno:Fósforo	
DQO	Demanda Química de Oxígeno	mg•L ⁻¹
DQO _e	Demanda Química de Oxígeno en el efluente	mg•L ⁻¹
DQO _{sol}	Demanda Química de Oxígeno soluble	mg•L ⁻¹
DQO _{tot}	Demanda Química de oxígeno total	mg•L ⁻¹
GL	Glucosa	
J	flujo transmembranal	L•m ⁻² •h ⁻¹
N _{asim}	Nitrógeno asimilado	mg•L ⁻¹
NT	Nitrógeno total	
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal	mg•L ⁻¹
PHAs	Polihidroxialcanoatos	
PHB	Polihidroxibutirato	
Q	Flujo	L•d ⁻¹
RLA	Reactor de lodos activados	
r _s	Tasa de utilización de sustrato	g _{DQO} •L ⁻¹ •d ⁻¹
r _x	Tasa de producción de biomasa	g _{SSV} •L ⁻¹ •d ⁻¹
SOUR	Velocidad específica de consumo de oxígeno	mgO ₂ •mg _{SSV} ⁻¹ •L ⁻¹
SST	Sólidos suspendidos totales	mg•L ⁻¹
SSV	Sólidos suspendidos volátiles	mg•L ⁻¹
TRC	Tiempo de retención celular	d
TRH	Tiempo de retención hidráulico	d
VR	Volumen del reactor	L
Y	Coeficiente de rendimiento de biomasa	mg _{SSV} •mg _{DQO} ⁻¹

1. INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por la problemática que representa la acumulación de productos plásticos en el ambiente, aunado a la imperante necesidad de migrar hacia formas de producción menos costosas energética y ecológicamente, ha incrementado el interés en el desarrollo de tecnologías para la obtención de biopolímeros ecológicamente amigables. En este sentido, la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs), ha sido investigada por más de ochenta años, debido tanto a las ventajas de ser producidos a partir de fuentes renovables, como a la amplia versatilidad que presentan para ser usados en diversas aplicaciones que van desde empaques de alimentos, textiles y materiales para la biomedicina; sin embargo, en la actualidad, la mayor parte de las producciones comerciales de PHAs son más caras que la producción de polímeros sintéticos convencionales.

La tendencia actual se centra en implementar estrategias que hagan más competitiva la producción de PHAs, entre las cuales se incluyen mejoras en los procesos de producción y extracción, así como el desarrollo de cepas microbianas más productivas capaces de utilizar sustratos de bajo costo (Khanna y Srivastava 2005), tales como aguas residuales.

En este trabajo se pretende estudiar la producción de PHAs a partir del tratamiento de aguas residuales sintéticas, formuladas con fuentes de carbono simples y suministradas en diferente proporción alimento: microorganismo a un biorreactor con membranas sumergidas (BRM). Más allá de un simple avance biotecnológico, la producción de un material de gran interés industrial integrada a un sistema de tratamiento significativamente eficiente, ofrece una alternativa viable e innovadora que podría ser la antesala de un sistema de producción bilateral ecológicamente amigable y altamente competitivo.

2. MARCO CONCEPTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En un biorreactor con membranas sumergidas, ¿cuál es el efecto que tiene el incremento de la carga orgánica con la que se suministran dos diseños de aguas residuales sintéticas, formuladas con distinta fuente carbono (completamente soluble y fácilmente biodegradable), sobre el rendimiento celular de polihidroxialcanoatos?

2.2 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, hay un notable interés por el desarrollo de procesos energéticamente eficientes y de bajo impacto ambiental que disminuyan los costos de los biopolímeros, facilitando su fabricación y aplicación. Surge entonces la necesidad de desarrollar procesos más asequibles para la producción de PHAs y, en este sentido, el uso de aguas residuales como sustrato de cultivos mixtos es una alternativa atractiva que elimina la necesidad de mantener condiciones estériles, reduciendo así los costos energéticos y de operación; mientras que la obtención del producto a partir de un residuo implica una disminución en el costo final de éste, atendiendo además la problemática de tratamiento de aguas residuales urbanas, lo cual implica un valor agregado a los lodos producidos.

Por otro lado, los reactores biológicos con membranas son actualmente considerados una de las mejores alternativas disponibles para el tratamiento de aguas residuales, debido a las ventajas que ofrece esta tecnología entre las cuales destacan un alto grado de descontaminación y un efluente libre de gérmenes. Así, integrar la producción de PHAs a un proceso de tratamiento en un BRM como planta piloto, ofrecería una ventaja doble: por un lado, la depuración eficiente de agua residual y, simultáneamente, el aprovechamiento de la materia orgánica removida como recurso para producir los PHAs. Este aprovechamiento

se traduciría finalmente en un beneficio económico adicional, incorporado a un tratamiento eficiente de aguas residuales.

2.3 HIPÓTESIS

Los coeficientes de rendimiento celular de polihidroxicanoatos obtenidos en un biorreactor con membranas sumergidas, a partir de dos sustratos diferentes, diseñados con fuentes de carbono simples, completamente solubles y fácilmente biodegradables, serán similares entre sí, siempre y cuando, la relación C:N:P se mantenga constante.

El coeficiente de rendimiento celular de los polihidroxicanoatos producidos en un biorreactor con membranas sumergidas, aumenta al incrementar la carga orgánica a la que se suministra agua residual sintética, diseñada a partir de una fuente de carbono simple, completamente soluble, fácilmente biodegradable y de relación C:N:P constante.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la producción microbiológica de polihidroxialcanoatos en un biorreactor con membranas sumergidas, operado en continuo a distintas cargas orgánicas, alimentado con dos influentes de aguas residuales sintéticas, diseñadas con diferentes fuentes de carbono completamente solubles y fácilmente biodegradables.

2.4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la eficiencia de remoción de materia orgánica y nitrógeno amoniacal en aguas residuales sintéticas por un BRM.
- Estimar los rendimientos celulares de polihidroxialcanoatos producidos en un biorreactor con membranas sumergidas, por un cultivo microbiano mixto.
- Comparar la producción de polihidroxialcanoatos producidos en un biorreactor con membranas sumergidas, bajo dos condiciones distintas de carga orgánica.
- Comparar la producción de polihidroxialcanoatos en un biorreactor con membranas sumergidas, alimentado con dos diferentes diseños de agua residual sintética, cuyas fuentes de carbono están en la misma proporción C:N:P, son completamente solubles y fácilmente biodegradables.

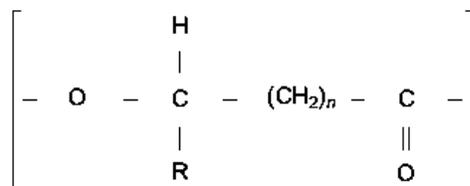
3. MARCO TEÓRICO

3.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de polímeros que algunas bacterias acumulan intracelularmente como material de reserva de energía y carbono cuando hay abundancia de éste y déficit de otros nutrientes como nitrógeno y fósforo, principalmente (González *et al.*, 2012).

3.1.1 Estructura

Estructuralmente, estos polímeros se clasifican de acuerdo al tipo de unidades monoméricas que presentan, produciendo homopolímeros y heteropolímeros (Keshavarz y Roy, 2010). Dependiendo del número de átomos de carbono en la cadena (Figura 3.1), los PHA se pueden clasificar en dos grupos: longitud de cadena corta (SCL), cuando contienen de 3 a 5 átomos de carbono, y longitud de cadena media (MCL), que consisten en cadenas de 6 a 14 átomos de carbono. (Khanna y Srivastava, 2005; Keshavarz y Roy, 2010).



<i>n</i>	R	Nombre del polímero	Símbolo
1	Hidrógeno	Poli (3-hidroxiacetato)	PHA
	Metil	Poli (3-hidroxiisobutirato)	P3HB
2	Hidrógeno	Poli (4-hidroxiisobutirato)	P4HB
3	Hidrógeno	Poli (5-hidroxiisovalerato)	P5HV

Figura 3.1. Estructura general de los PHAs, y ejemplos de su nomenclatura y símbolo según la longitud y posición de la cadena lateral (R). (Tomado de González *et al.*, 2012).

3.1.2 Aplicaciones

Los PHAs poseen propiedades similares a varios plásticos sintéticos como el polipropileno y el polietileno, con la ventaja de que son completamente biodegradables, lo que les confiere importancia como sustitutos de los plásticos convencionales (Khanna y Srivastava, 2005; Rathore, 2014).

Los PHAs tienen pesos moleculares relativamente altos, características termoplásticas o elastoméricas y otras propiedades físicas que los hacen candidatos para varias aplicaciones en la industria de empaques, médica, farmacéutica, agrícola y alimenticia, o como materias primas para la síntesis de químicos enantioméricamente puros y para la producción de pinturas (Babel y Steinbüchel, 2001).

La aplicación más conocida de estos biopolímeros de cadena corta es para la fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos (Anderson y Dawes, 1990). Dado que los PHAs presentan propiedades biocompatibles con el tejido humano y son reabsorbidos a baja velocidad, también han sido utilizados en un gran número de aplicaciones biomédicas (Babel y Steinbüchel, 2001). En los últimos 25 años, los PHAs se han utilizado para desarrollar dispositivos, incluyendo hilos para suturas, dispositivos de reparación de menisco, remaches, tornillos, placas óseas, mallas quirúrgicas, parches cardiovasculares, materiales de relleno para aumento óseo (Dai *et al.*, 2009) e incluso se han utilizado para el desarrollo de implantes oculares, injertos de tendón y como sustitutos de piel (Chen y Wu, 2005).

El poli-3-hidroxi-butirato, poli-b-hidroxi-butirato, ácido poli(R)-(3-hidroxi-butírico), P3HB o simplemente PHB es el polihidroxi-alcanoato más común y también el más estudiado, y constituye un ejemplo verdadero de termoplástico con propiedades físicas muy similares a las del polipropileno.

Recientemente se ha reportado que algunos productos obtenidos a partir de la esterificación de PHB y PHAs de cadena media podrían ser utilizados como combustibles, tal es el caso del éster metílico 3-hidroxi butirato (3HBME) y 3-hidroxi alcanoato (3HAME) (Zhang *et al.*, 2009).

3.1.3 Producción de PHAs

Diversas bacterias acumulan PHAs en condiciones de crecimiento “desfavorables”, tales como la limitación de nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, o bien, en presencia de una fuente de carbono en exceso. Sin embargo, todas las fuentes de carbono metabolizable se pueden utilizar para la producción de PHAs. Es posible producir con éxito copolímeros al azar de PHAs en fermentaciones de monocultivos mediante el control del tipo de alimentación de carbono y la composición (Gumel *et al.*, 2012), tanto con bacterias nativas como con bacterias recombinantes (Li *et al.*, 2010).

Hay una gran cantidad de bacterias que comparten un metabolismo común para generar intermedios básicos de monómeros de PHA a partir de un sustrato de carbono, sin embargo, las características del metabolismo de cada especie dan lugar a la generación de diferentes monómeros para PHAs (Anderson y Dawes, 1990; Lee, 1996). Estos polímeros se acumulan como inclusiones intracelulares en las bacterias de diversos géneros tales como *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Necator*, *Rhodobacter*, *Ralstonia* y *Cupriavidus* (Chanprateep *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2010). La literatura sobre la producción de PHA en bacterias es extensa, sobresale el hecho de que ha sido posible producir con éxito copolímeros al azar de PHA en fermentaciones de monocultivos mediante el control del tipo de alimentación de carbono y la composición (Gumel *et al.*, 2012), demostrando que la producción es posible utilizando tanto bacterias nativas como recombinantes (Li *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que la producción de PHAs por cultivos microbianos mixtos (CMM) podría ser más favorable que el uso de cultivos puros en ambos puntos de vista económicos y ambientales (Albuquerque *et al.*, 2011). Los CMM se han utilizado con éxito en la producción de PHAs tanto en reactores continuos completamente mezclados, como en reactores secuenciales por lotes, encontrando que las condiciones de operación influyen en gran medida en la acumulación del polímero por las células (Albuquerque *et al.*, 2011). La composición del biopolímero formado en un cultivo mixto podría manipularse cambiando la composición de la fuente de carbono y la estrategia de alimentación. Tales cambios podrían usarse para alterar la relación de hidroxibutirato (HB) y hidroxivalerato (HV) en el copolímero de PHA, cambiar su peso molecular medio, grado de cristalinidad y otras propiedades físicas (Albuquerque *et al.*, 2011).

3.1.4 Sustratos empleados en la producción industrial de PHAs

El empleo de procesos biotecnológicos para la producción de PHAs a escala industrial es prometedor para el desarrollo sostenible, sin embargo, para muchos productos las estrategias de producción biotecnológicas aún no han superado la prueba de la viabilidad económica. La viabilidad económica de la producción de PHAs se determina en gran medida por los costos de materias primas (que alcanzan hasta un 50% de la totalidad de costos de producción).

Una estrategia de solución viable puede ser la utilización de residuos que puedan usarse como materias primas para la producción de bioplásticos tipo PHA, ya que, además de la disminución de los costos de producción, ayuda a la industria a superar los problemas de eliminación (Chen G.Q., 2010). Por el tipo de residuos que se requieren para la producción de PHAs (*i.e.* materia orgánica biodegradable y carencia de otros nutrientes), estos sustratos se pueden encontrar en los residuos de la industria agrícola y alimenticia (Braunegg *et al.*, 1998; Solaiman *et al.* 2006; Khardenavis *et al.*, 2007; Khanna y Srivastava, 2005a).

Entre estos tipos de residuos se encuentran los excedentes de suero de leche de la industria láctea; residuos de glicerol de la producción de biodiesel; melaza de la industria azucarera, almidón, lípidos residuales, alcoholes (Bourque *et al.* 1995) y materiales lignocelulósicos (Chen G.Q., 2010).

En Brasil, la compañía PHBISA ha logrado la producción de biopolímeros en un biorreactor a escala piloto acoplado a un molino de caña de azúcar, donde se produce bioetanol y PHAs a partir de sacarosa. En este sistema, la energía necesaria para la producción de bioetanol y biopolímero se genera por la combustión de bagazo. La fracción de aceite de fusel (alcoholes con más de dos átomos de carbono) de la destilación de bioetanol se aplica como un disolvente de extracción para el aislamiento de PHAs a partir de biomasa microbiana (Nonato *et al.*, 2001).

3.1.5 Aguas residuales como sustrato en la producción de PHAs

En el desarrollo y aplicación de sustratos de bajo costo, una alternativa atractiva es el uso de aguas residuales domésticas, ya que la mayoría de las aguas residuales domésticas tienen una fracción de DQO biodegradable de entre 85 y el 90% de la DQO total (Ciggin *et al.*, 2012), por lo que se tiene una buena fuente de carbono y además se tienen cultivos mixtos, lo que elimina la necesidad de mantener condiciones estériles, reduciendo así los costes energéticos y de operación. (Albuquerque *et al.*, 2011; Venkata *et al.*, 2010).

La producción de PHAs empleando aguas residuales de procesos industriales como sustrato ha sido estudiado por un gran número de autores: con efluentes de la producción de aceite de palma (Mumtaz *et al.*, 2010), aceite de oliva (Beccari, 2009), residuos alimenticios (Venkateswar Reddy *et al.*, 2014, 2015), subproductos de la pirólisis (Moita y Lemos, 2012), quienes concluyen que el uso de estos efluentes es adecuado para la producción de PHA.

3.1.6 Estrategias para incrementar la producción de PHAs

No obstante que el uso de cultivos mixtos y de aguas residuales para la producción de PHA disminuye los costos de inversión, el bajo rendimiento es una limitación importante en estos sistemas (Moita y Lemos, 2012). El enriquecimiento selectivo de los cultivos con alta capacidad de almacenamiento de PHA es un factor clave. Para lograr una mayor selectividad de los microorganismos en la suspensión biológica, frecuentemente se recurre a estrategias de alimentación aeróbica dinámica, donde la alimentación intermitente crea una alternancia de fases de abundancia de sustrato, seguida por un periodo de carencia de sustrato externa (Amulya *et al.*, 2015a).

Además del enriquecimiento selectivo, es importante evaluar diversos parámetros que gobiernan la producción, tales como la fuente de carbono, la concentración de nutrientes, el pH y el medio ambiente del reactor son los principales parámetros que influyen en la producción de PHAs en cultivos mixtos (Albuquerque *et al.*, 2013).

Diversos autores han desarrollado influentes sintéticos para estudiar la producción de PHAs en reactores por lotes, utilizando cultivos mixtos provenientes de procesos de tratamiento de aguas residuales a escala real, variando diferentes condiciones de operación. Amulya K., *et al.* (2015), estudiaron el impacto de tres diferentes condiciones de pH (6, 7, 8) sobre la eficiencia de producción en términos de peso seco celular (p.s.c.), bajo un ambiente microaerofílico (0.6 mg·L⁻¹ de oxígeno disuelto), a temperatura constante, obteniendo el mayor rendimiento (56%) a un pH de 7. En otro estudio, Liu *et al.* (2013), realizaron una comparación de los rendimientos obtenidos entre cuatro diferentes relaciones C/N (10, 20, 50 y 125 DQO/N), mediante un proceso acoplado de fases aerobias y anaerobias, encontrando una mayor eficiencia (64.2%) bajo la condición más alta (125 DQO/N).

Dado que en las aguas residuales están formadas por diferentes fracciones orgánicas que a su vez presentan diferentes características de biodegradación, Ciggin *et al.* (2012), estudiaron el efecto de una mezcla de dos sustratos con diferente tasa de biodegradabilidad (acetato/almidón), sobre la formación de PHB en reactores secuenciales por lotes, bajo dos diferentes condiciones de edad de lodos (2 y 8 días). Ellos compararon el rendimiento PHB/sustrato de la mezcla contra el de ambos sustratos por separado, obteniendo mejores resultados con la mezcla de sustratos que en el caso del lodo de 8 días alcanzó un 58% en contraste con un 25% obtenido con acetato como único sustrato; mientras que con el lodo de 2 días se reportó un rendimiento del 50%, superior al 30% obtenido con sustrato simple.

3.2 BIORREACTORES CON MEMBRANAS

3.2.1 Tipos de reactores empleados para la producción de PHA

Uno de los objetivos principales en el campo de la investigación para la obtención PHAs es alcanzar una producción económicamente eficiente, por lo tanto, se deben diseñar estrategias de cultivo, que permitan la obtención del producto de interés en altas concentraciones, con alta productividad y alto rendimiento (Lee *et al.*, 1999). Para esto se pueden utilizar principalmente tres tipos de procesos, que son cultivo en lote, lote alimentado y continuo.

El cultivo en lote se realiza utilizando un volumen determinado de medio (licor mezclado), en el cuál se adicionan tanto la biomasa como los nutrientes al inicio del ciclo. En este tipo de proceso las únicas líneas de entrada y salida son las de aireación. El sistema permite la evaluación y descripción de las fases de crecimiento microbiano, el cual está dividido en varias etapas (latencia, crecimiento exponencial, decaimiento), cuyo comportamiento y duración están determinados por el metabolismo del microorganismo de estudio y las condiciones suministradas para su crecimiento (Shuler y Kargi, 1992, Madigan *et al.*, 2005). Este proceso tiene dos grandes desventajas, la primera es que, debido al

agotamiento de nutrientes, las concentraciones celulares alcanzadas, generalmente no son altas, sin embargo, los datos obtenidos resultan útiles para el diseño de estrategias de alimentación; la segunda desventaja y más importante es que no es un proceso aplicable al tratamiento de aguas residuales a escala real.

Por su parte, en el cultivo por lote alimentado, los nutrientes son continua o semi-continuamente alimentados, mientras que el efluente es removido discontinuamente. Este sistema es utilizado principalmente para disminuir efectos de inhibición por sustrato o represión catabólica mediante la adición intermitente de nutrientes, llegando a mejorar la productividad de la fermentación (Shuler y Kargi, 1992). Este proceso también resulta poco práctico para el tratamiento de aguas residuales domésticas a escala real, pero sí puede ser implementado en procesos de tratamiento de aguas residuales industriales con bajos caudales.

En muchos casos, estos cultivos por lote alimentado son llevados a cabo como un proceso de dos fases. En la primera fase, las células son cultivadas hasta un máximo de densidad celular, mientras que en la segunda fase solo se adiciona la fuente de carbono para la acumulación de PHA y empieza la limitación de nutrientes. Dado que la acumulación es un proceso lineal, el flujo de carbono se puede hacer a un ritmo lineal para cubrir las necesidades energéticas de las células y la acumulación de PHA (Chen, 2010).

En el cultivo continuo, se busca mantener las células en etapa de producción, adicionando constantemente nutrientes al medio de cultivo y retirando células y productos, ambos procesos a la misma velocidad, de manera que el volumen dentro del reactor permanezca constante (Shuler y Kargi, 1992).

Los inconvenientes presentados con este proceso, radican principalmente en la alta variación genética que puede presentarse y los altos riesgos de contaminación. Este método ha sido utilizado para la producción de PHAs, encontrando que el contenido del polímero disminuye cuando existe una alta tasa

de crecimiento específico (Chen, 2010), por tanto, aún faltan estudios para proponer su uso a escala comercial, debido a que es necesario un alto contenido de PHA para que los costos de separación sean rentables (Sun *et al.*, 2007).

3.2.2 Descripción y funcionamiento de los Biorreactores con Membrana

Con apenas tres décadas de existencia, la tecnología del BRM ha recibido una considerable atención debido a la necesidad actual de procesos más eficientes y fiables para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (Le-Clech, 2010).

El BRM es generalmente descrito como la combinación de un tratamiento de biodegradación por medio de biomasa en suspensión acoplada a un proceso de separación sólido/líquido por membranas porosas (Figura 3.2).

La presencia de membranas de micro o ultrafiltración (*i.e.* tamaño de poro desde 0.05 a 0.4 μm) conduce a mejoras y ventajas significativas del BRM en comparación con otros procesos de tratamiento:

- La huella del sistema de tratamiento global se reduce en gran medida debido a la sustitución del clarificador secundario por módulos de membranas compactas.
- Mejora la calidad del efluente producido. El BRM permite la retención física completa de flóculos y sólidos en suspensión, ofreciendo una buena capacidad de desinfección. (Hirani *et al.* 2010).

La retención total de lodos activados en el biorreactor también permite el funcionamiento a altas concentraciones de biomasa, por lo tanto, resiste cargas volumétricas elevadas, y elevados tiempos de retención celular (TRC), que permiten el desarrollo de microorganismos de crecimiento lento, responsables de la degradación de contaminantes orgánicos específicos (e.g. compuestos

nitrogenados o compuestos difícilmente biodegradables). La operación con TRC elevados también puede conducir a un rendimiento bajo de lodos, lo que resulta en la minimización del volumen de los mismos. Por su parte, las altas concentraciones de biomasa también permiten la reducción del tamaño del biorreactor.

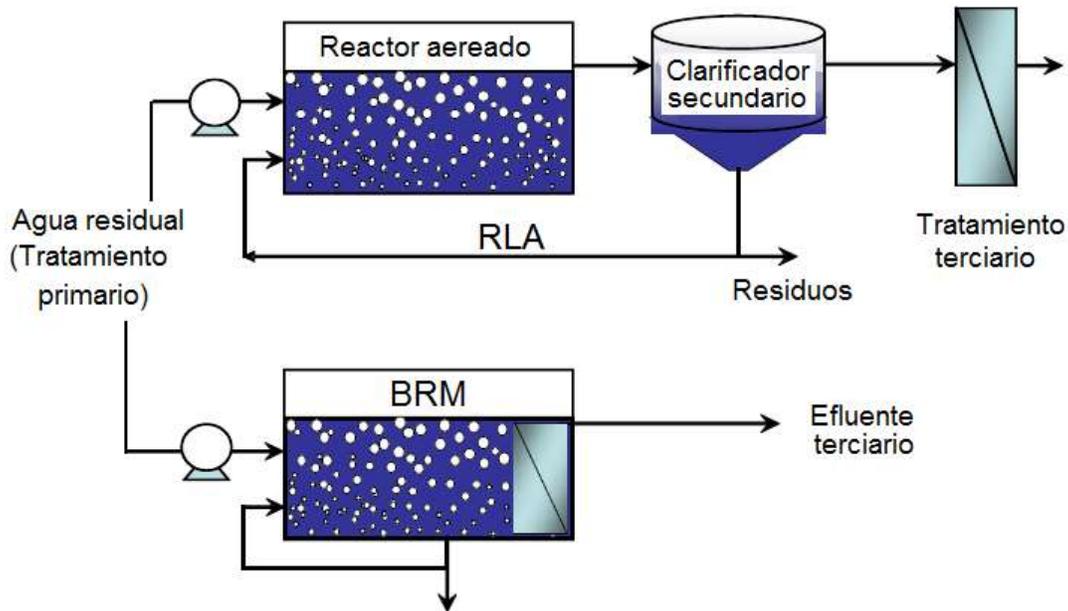


Figura 3.2. Comparación entre diseños convencionales de lodos activados y reactores con membranas (Tomado y modificado de Le-Clech 2010).

3.2.3 Producción de PHAs en un BRM

Uno de los factores más importantes para lograr procesos eficientes de obtención de metabolitos microbianos es el empleo de cultivos con alta densidad celular, en los cuáles se mantiene el crecimiento microbiano a una tasa específica, mediante la adición de nutrientes (Lee, 1996). Es por ello que, en este proyecto, se seleccionó un BRM para el estudio del rendimiento celular de PHAs.

En el BRM se conjuntan varias características deseadas:

- (i) su funcionamiento en continuo, que permite tratar grandes volúmenes de efluentes de agua residual
- (ii) está diseñado para operar bajo condiciones de alta densidad celular, lo que podría incrementar potencialmente la acumulación de PHAs y,
- (iii) la separación por medio de membranas y la elevada densidad celular con la que opera, garantizan una alta calidad del efluente tratado.

No obstante, es importante mencionar que, hasta el momento, no se han encontrado referencias de otros estudios en los que empleen este tipo de reactores para la producción de PHAs.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción del reactor piloto y condiciones de operación

El reactor está construido de acrílico transparente, tiene un volumen útil $V_R = 70$ L y forma cilíndrica con una base cónica truncada (Figura 4.1). Funciona bajo el régimen de mezcla completa y se mantuvo en operación durante 231 d.



Figura 4.1. Biorreactor con membranas sumergidas.

4.1.1 Condiciones fisicoquímicas

En la figura 4.2, se muestra el esquema de montaje y operación del BRM. Se suministró agua residual sintética a un flujo (Q) de 22.09 L·d⁻¹, para mantener un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 3.17 d. Éste parámetro de operación se estableció de acuerdo a los rangos óptimos para BRM (Metcalf y Eddy, 2015) y

tomando en cuenta el área de filtración de la membrana y el flujo transmembranal óptimo del módulo de membranas. El caudal tanto de suministro de sustrato como de salida del efluente, se controlaron mediante dos bombas peristálticas marca Watson Marlow® modelo 323.

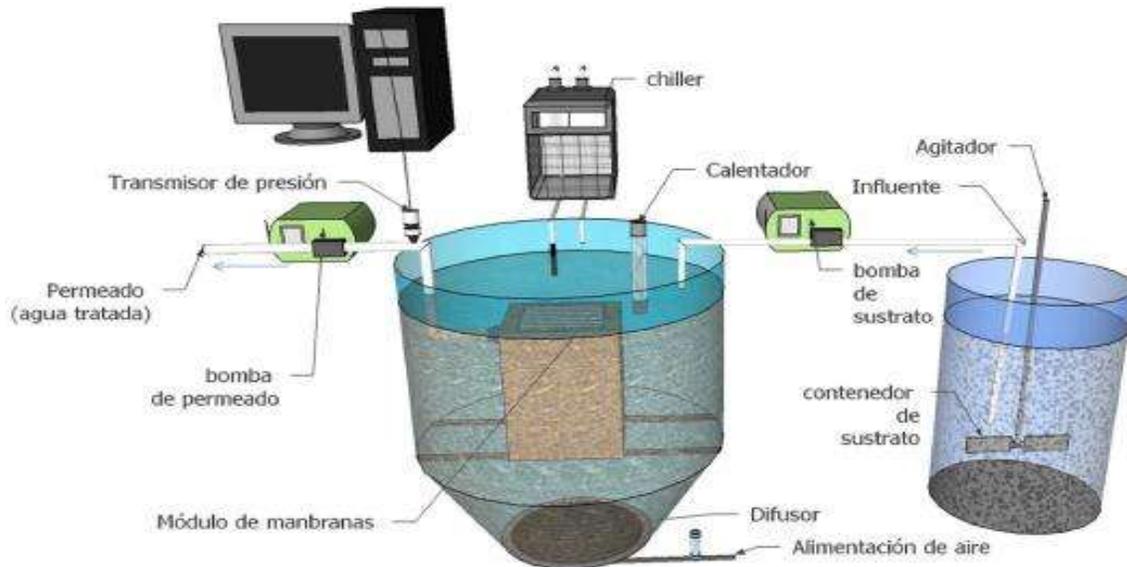


Figura 4.2. Esquema de operación del reactor. (Tomado de Negra 2015).

La aireación es suministrada a través de un difusor de burbuja fina tipo disco de 22 cm de diámetro, que además proporciona agitación al sistema a través de una corriente de aire en flujo ascendente, reduciendo el riesgo de colmatación de la membrana. El sistema permaneció en condiciones aerobias, con una concentración de oxígeno superior a $2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

La temperatura de operación se mantuvo en $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, regulándose mediante un enfriador marca BOYU® modelo C-150. Este parámetro se definió con base en el rango de operación óptimo para los sistemas de biomasa en suspensión para tratamiento de aguas residuales municipales (Metcalf y Eddy, 2015) y en los

valores promedio de la temperatura del agua en los puntos de suministro en el laboratorio.

El pH se mantuvo dentro del rango 6.5-7.5 (Amulya *et al.*, 2015), mismo que fue regulado mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) y ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N.

4.1.2 Condiciones de filtración

El módulo de membranas (Figura 4.3) consta de ocho láminas de polifluoruro de vinilideno y está instalado en sentido paralelo al flujo de aire, con la finalidad de procurar un mayor cizallamiento de las burbujas con las membranas. Se trabajó con flujo transmembranal $J = 4.6 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, establecido de acuerdo a las características y especificaciones de la membrana (Tabla 4.1).

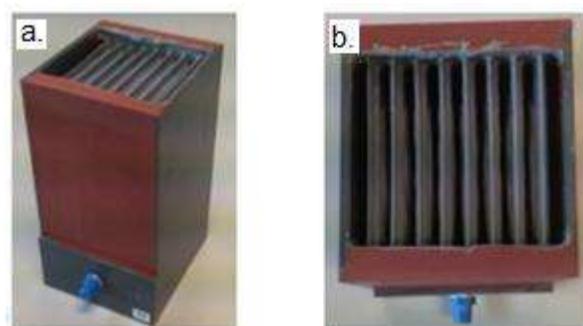


Figura 4.3. Módulo de membranas instalado en el reactor. **a.** Vista frontal. **b.** Vista de cara superior.

Tabla 4.1. Características generales y dimensiones del módulo de membranas

Concepto	Dimensión	Unidad
<i>Material</i>	PVDF	
<i>Diámetro de poro</i>	0.14	µm
<i>Número de hojas</i>	8	pza
<i>Espacio entre hojas</i>	12	mm
<i>Área de filtración</i>	0.20	m ²
<i>Densidad de Área</i>	54	m ² ·m ⁻³

4.1.3 Protocolo de lavado

Para mantener el módulo de membranas en condiciones óptimas de funcionamiento, se estableció un protocolo de lavado químico (Tabla 4.2). Este tratamiento se realizó previo al arranque del periodo experimental de cada sustrato.

Tabla 4.2. Protocolo de lavado de membranas

Etapa	Concentración	Duración
1. Inmersión en solución de NaOH	4 g·L ⁻¹	24 h
2. Inmersión en solución ácido cítrico	22.4 g·L ⁻¹	5 h
3. Inmersión en solución de hipoclorito de sodio	0.24 g·L ⁻¹	5 h

4.1.4 Características del inóculo

El reactor se inoculó con biomasa concentrada, proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales “Las Garzas” del municipio de Pátzcuaro, Michoacán (Figura 4.4). Las características iniciales de la biomasa se presentan en la tabla 4.3.



Figura 4.4. Reactor biológico de la planta de tratamiento "Las Garzas", Pátzcuaro; Michoacán.

Tabla 4.3. Características iniciales de la suspensión.

DQO_{tot} (mgDQO•L ⁻¹)	DQO_{sol} (mgDQO•L ⁻¹)	SSV (mgSSV•L ⁻¹)	SSV/SST (mgSSV•SST ⁻¹)	SOUR (mgO ₂ •mgSSV ⁻¹ •L ⁻¹)
875	679	595	0.75	0.284

4.1.5 Características del sustrato

El BRM fue alimentado de forma continua con dos sustratos simples solubles y fácilmente biodegradables. Utilizar sustratos sintéticos facilita la cuantificación de las cinéticas de reacción, lo cual permite trabajar en condiciones más precisas y reproducibles. El reactor se alimentó con un agua residual sintética diseñada a partir ácido acético (CH₃COOH) como fuente de carbono, y otra a partir de glucosa (C₆H₁₂O₆); ambos sustratos fueron enriquecidos con nitrato de amonio (NH₄NO₃) y fosfato de amonio (NH₄H₂PO₄). Los nutrientes fueron proporcionados con una relación C:N:P = 30:2:1 (Tabla 4.6).

Tabla 4.4. Formulación de los cuatro diseños de agua residual sintética.

DISEÑO AC 0.1		DISEÑO AC 0.3	
Fuente de carbono: Ácido acético		Fuente de carbono: Ácido acético	
DQO _{tot} = 1888.3 mg·L ⁻¹		DQO _{tot} = 5210 mg·L ⁻¹	
CO _{teórica} = 0.11 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹		CO _{teórica} = 0.3 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹	
CO _{real} : 0.11 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹		CO _{real} : 0.29 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹	
C:N:P = 30:2:1		C:N:P = 30:2:1	
REACTIVOS		REACTIVOS	
(NH ₄) ₃ PO ₄		(NH ₄) ₃ PO ₄	
P-total	196 mg·L ⁻¹	P-total	588 mg·L ⁻¹
NH ₄ NO ₃		NH ₄ NO ₃	
N-NH ₄ (total)	467.5 mg·L ⁻¹	N-NH ₄ (total)	1402.5 mg·L ⁻¹
CH ₃ COOH		CH ₃ COOH	
densidad	1.05 kg·L ⁻¹	densidad	1.05 kg·L ⁻¹
pureza	85 %	Pureza	85 %
volumen	1.66 ml·L ⁻¹	volumen	1.66 ml·L ⁻¹
CaCl	5 mg·L ⁻¹	CaCl	5 mg·L ⁻¹
MgSO ₄	10 mg·L ⁻¹	MgSO ₄	10 mg·L ⁻¹
DISEÑO GL 0.1		DISEÑO GL 0.3	
Fuente de carbono: Glucosa		Fuente de carbono: Glucosa	
DQO _{tot} = 1485 mg·L ⁻¹		DQO _{tot} = 4933.3 mg·L ⁻¹	
CO _{teórica} = 0.1 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹		CO _{teórica} = 0.3 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹	
CO _{real} : 0.09 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹		CO _{real} : 0.28 kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹	
C:N:P = 30:2:1		C:N:P = 30:2:1	
REACTIVOS		REACTIVOS	
(NH ₄) ₃ PO ₄		(NH ₄) ₃ PO ₄	
P-total	196 mg·L ⁻¹	P-total	588 mg·L ⁻¹
NH ₄ NO ₃		NH ₄ NO ₃	
N-NH ₄ (total)	467.5 mg·L ⁻¹	N-NH ₄ (total)	1402.5 mg·L ⁻¹
C ₆ H ₁₂ O ₆	1481.4 mg·L ⁻¹	C ₆ H ₁₂ O ₆	4444.3 mg·L ⁻¹
CaCl	5 mg·L ⁻¹	CaCl	5 mg·L ⁻¹
MgSO ₄	10 mg·L ⁻¹	MgSO ₄	10 mg·L ⁻¹

4.2 Condiciones experimentales y seguimiento del reactor

4.2.1 Diseño experimental

El reactor se alimentó con dos sustratos a dos diferentes concentraciones de carga orgánica másica, haciendo un total de cuatro corridas experimentales (Tabla 4.4). Los niveles de carga orgánica se establecieron dentro del rango típico de operación de un BRM, de acuerdo con Metcalf y Eddy (2015), mientras que la concentración de biomasa (SSV) se mantuvo en 5000 mg·L⁻¹.

Tabla 4.5. Diseño experimental de dos factores con dos niveles

FACTOR NIVEL		SUSTRATO	
		ÁCIDO ACÉTICO	GLUCOSA
CARGA ORGÁNICA (kgDQO·kgDQO ⁻¹ ·SSVd ⁻¹)	0.1	AC 0.1	GL 0.1
	0.3	AC 0.3	GL 0.3

Durante cada corrida experimental, el sistema se mantuvo en un periodo de aclimatación de mínimo 20 días, antes de realizar los muestreos en periodo estabilizado correspondientes a cada condición de trabajo (Figura 4.5). Para verificar la etapa estabilizada, se realizaron análisis de regresión lineal de la concentración de DQO en el efluente del BRM, donde la estabilidad se acepta si la regresión no resulta significativa para un periodo de 3 tiempos de retención hidráulicos (TRH).

Tabla 4.6. Periodo de tiempo comprendido por cada etapa experimental. A: periodo de adaptación. E: periodo estable

Sustrato	AC				GL			
	0.1		0.3		0.1		0.3	
CO (kgDQO·kgSSV ⁻¹ d ⁻¹)	0.1		0.3		0.1		0.3	
Etapa	A	E	A	E	A	E	A	E
Tiempo (d)	1-84	85-98	99-132	133-147	148-181	182-196	197-216	217-231

4.2.2 Técnicas analíticas

Durante cada corrida experimental, se realizó el monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y las variables de respuesta a diferentes intervalos de tiempo en los periodos de arranque, aclimatación y fase estable (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Frecuencia y zona de los muestreos de cada parámetro por periodo de reacción

Parámetro	Periodo de operación	Frecuencia (Muestreos por mes)	Punto de muestreo
DQO_{tot}	Arranque	2	
	Fase de aclimatación	4	Influente/Efluente
	Fase estable	4	
SST y SSV	Arranque	2	
	Fase de aclimatación	4	Reactor
	Fase estable	4	
N-NH₃, NT	Arranque	2	
	Fase de aclimatación	4	Influente/Efluente
	Fase estable	4	
PHAs	Fase estable	9	Reactor

Los ensayos de polímero se realizaron por triplicado para cada prueba gravimétrica y por duplicado para las pruebas de espectrofotometría. Adicionalmente a estos parámetros, se monitoreó diariamente el flujo, así como temperatura y pH en las tres secciones que conforman el sistema reaccionante (influyente, reactor, efluente).

Las técnicas y los equipos empleados para el análisis de los parámetros de seguimiento del reactor se presentan en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Metodología y equipos empleados en el análisis de parámetros de seguimiento del BRM

Parámetro	Métodos	Equipo (s)
Temperatura	Inmersión	Termómetro de mercurio 520 LAUKA
pH	Potenciometrico	Potenciómetro Orion Star AZ11 Thermo Scientific
Oxígeno disuelto	Electrometrico	Sonda YSI125 modelo: 55-25 FT
DQO	Digestión por reactor	Reactor digital Hach DRB200
N-NH ₃ , NT	Método 10031 de Hach. (Salicilato/Cianurato de sodio)	Reactor digital Hach DRB200
Biomasa	Gravimétrico (NMX-AA-034-SCFI-2001)	Bomba de vacío cis-lab F500 Horno Thermo Scientific 6522 Mufla Thermo Scientific Lindberg blue Balanza analítica Neocitec FB2240
PHA	Gravimétrico (Malagón y Acosta, 2008)	Centrífuga universal SOLBAT J-40 Horno Thermo Scientific 6522 Balanza analítica Neocitec FB2240
	Espectrofotométrico (Venkateswar y Venkata, 2011)	Microcentrífuga Heraeus™ Pico™, Fresco™ series Espectrofotómetro Genesys 10S uv-vis Thermo Scientific

4.3 Cuantificación de los PHAs

4.3.1 Cuantificación de PHAs por gravimetría

Durante la fase experimental, se realizaron tres pruebas por método gravimétrico (Malagón y Acosta, 2008) (Anexo A), de los polímeros producidos y acumulados, al inicio (día 1), a la mitad (día 8) y al final (día 15) del periodo estable. Las células se sometieron a un periodo de 12 h de digestión con hipoclorito de sodio comercial (5.2% v/v), seguida de una centrifugación para separar los restos de células. Los pellets obtenidos se disolvieron en cloroformo, que posteriormente se evaporó a 60°C.

4.3.2 Cuantificación de PHB por espectrofotometría

La prueba gravimétrica se complementó utilizando la técnica espectrofotométrica (Venkateswar y Venkata, 2011) (ANEXO A), la cual se basa en la conversión del PHB a ácido crotónico, mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y la aplicación de calor. El ácido crotónico producido se cuantificó por espectrofotometría UV leyendo absorbancia a 230 nm en espectrofotómetro y correlacionando los valores con una curva estándar de referencia de ácido poli(R)-(3-hidroxi-butírico) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia) (ANEXO A). Mediante esta técnica, fue posible cuantificar la concentración de monómeros de cadena corta del tipo 3HB en el polímero recuperado.

La concentración de PHB se obtuvo mediante las ecuaciones de las rectas correspondientes a las curvas de calibración para cuantificación de PHB por espectrofotometría (ANEXO A).

Las concentraciones obtenidas por espectrofotometría se compararon con los valores de peso seco arrojados por las pruebas gravimétricas, con lo cual se logró la estimación de la fracción de polímero obtenido (PHA) que corresponde a PHB.

4.4 Cálculos y análisis estadístico

Habiendo verificado que los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron en el rango deseado, se realizó un análisis discriminante canónico con los valores experimentales de TRC, pH y temperatura, así como las condiciones de DQO en el influente y DQO y nitrógeno amoniacal en el efluente.

Los porcentajes de remoción de DQO y $N-NH_3$ se obtuvieron a partir de los valores promedio en el influente y efluente de DQO y $N-NH_3$, respectivamente, durante el periodo estable de cada corrida experimental; por su parte, la

concentración de N_{asim} se obtuvo como la diferencia de NT del efluente respecto a la del influente.

Con el fin de describir el desarrollo metabólico de los microorganismos en función del sustrato, se obtuvieron los coeficientes cinéticos para tasa de utilización de sustrato (r_s) y tasa de producción de biomasa (r_x), así como el coeficiente estequiométrico de rendimiento (Y) en el BRM y la fracción de biomasa respecto a los sólidos suspendidos totales (SSV/SST). Los cálculos se realizaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$r_s = \frac{QS_i - QSe}{V}$$

Donde:

r_s = Tasa de utilización de sustrato	($g_{DQO}L^{-1}d^{-1}$)
Q = Flujo	(Ld^{-1})
S_i = Concentración de sustrato en el influente	($g_{DQO}L^{-1}$)
S_e = Concentración de sustrato en el efluente	($g_{DQO}L^{-1}$)
V = Volumen	(L)

$$r_x = \frac{X - X_0}{t}$$

Donde:

r_x = Tasa de producción de biomasa	($gL^{-1}d^{-1}$)
X = Concentración de biomasa previa a la purga	(gL^{-1})
X_0 = Concentración de biomasa posterior a la purga	(gL^{-1})
t = Tiempo transcurrido entre cada purga	(d)

El coeficiente estequiométrico Y , se calculó como el cociente de la tasa de remoción de sustrato y la tasa de producción de biomasa:

$$Y = \frac{r_s}{r_x}$$

Por su parte, la determinación del coeficiente de rendimiento celular de PHAs, está definida como:

$$Y_{PHA/SSV} = \frac{g_{PHA}}{g_{SSV}} * 100$$

Donde:

- $Y_{PHA/SSV}$ = Rendimiento de almacenamiento para PHA (%)
 g_{PHA} = Masa de PHA en base seca (g)
 g_{SSV} = Masa de la biomasa en base seca (g)

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas gravimétricas se sometieron a un análisis de varianza bifactorial con el fin de determinar si los cuatro tratamientos muestran diferencias significativas en el porcentaje de acumulación de PHA por parte del cultivo microbiano. Dicho análisis se realizó en el software JMP 8.0 a un nivel de significancia (α) de 0.05. Adicionalmente, con el fin de determinar las variables que tienen mayor influencia sobre la acumulación de PHA, los datos de las variables de seguimiento del reactor se sometieron a un análisis de componentes principales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento del BRM y eficiencia del tratamiento

5.1.1 Parámetros fisicoquímicos

Durante el periodo de experimentación, se tuvo control de temperatura y pH al interior del reactor. La temperatura se mantuvo en $20 \pm 2^\circ\text{C}$, mientras que el pH se controló entre de 6.5 y 7.5 (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Promedios de pH y temperatura durante periodos de carga estabilizada

	pH (media \pm ds; n=15)	T(°C) (media \pm ds;n=15)
AC 0.1	7.35 \pm 0.05	18.89 \pm 0.08
AC 0.3	6.98 \pm 0.12	18.55 \pm 0.26
GL 0.1	7.06 \pm 0.07	18.53 \pm 0.27
GL 0.3	7.19 \pm 0.04	18.20 \pm 0.52

En el análisis de correlación canónica, se parecía la formación de cuatro grupos aislados y bien diferenciados; cada uno está formado por los tres muestreos realizados durante los periodos de carga estabilizada. Las variaciones entre los parámetros operacionales de las muestras de cada corrida experimental no son estadísticamente significativas, por lo tanto, existe semejanza en las condiciones de operación de cada tratamiento estudiado.

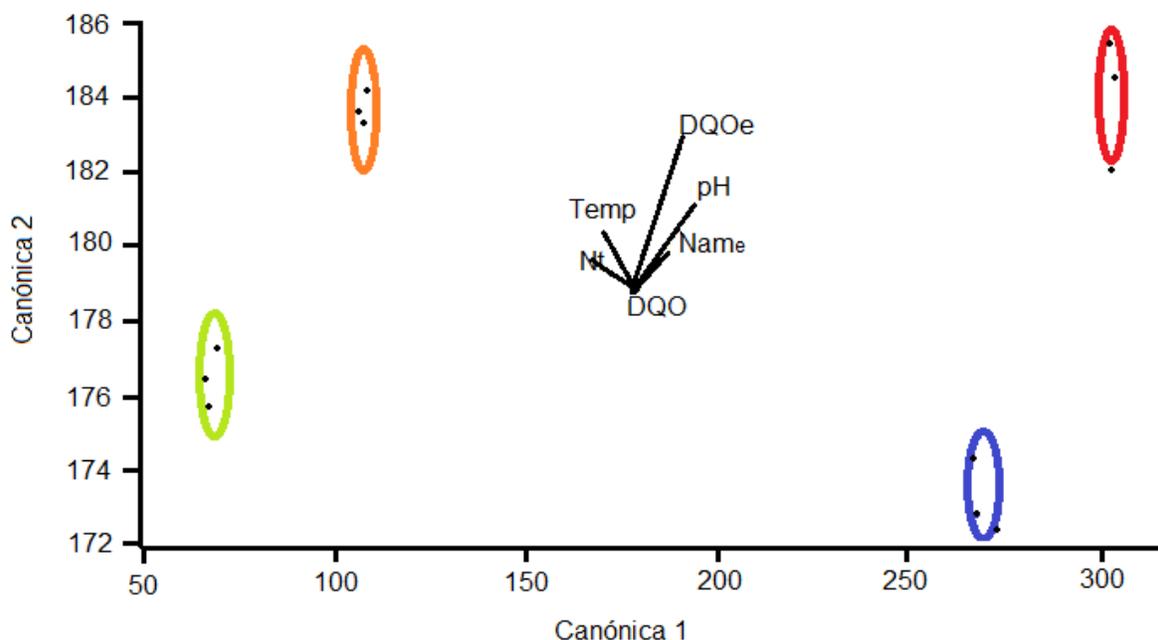


Figura 5.1. Análisis discriminante canónico. (Temperatura, pH, DQOe, N-NH₃, CO)

5.1.2 Remoción de materia orgánica

La etapa experimental consta de cuatro fases, en la primera, correspondiente a AC 0.1, el reactor se mantuvo en etapa estable a partir del día 85 y durante los siguientes 13 días. Se registró una DQO promedio en el efluente de 17 mg·L⁻¹, que en contraste con la DQO del influente (1858 mg·L⁻¹), representa una remoción del 99.1% de materia orgánica.

Concluido el periodo estable para la primera CO, el reactor se mantuvo los siguientes 34 días en fase de adaptación para AC 0.3. La etapa estabilizada para esta segunda corrida comenzó el día 133, prolongándose hasta el día 147, partiendo de una DQO promedio en el influente de 5210 mg·L⁻¹, la remoción promedio de DQO en este caso alcanzó un 99.8%, registrándose una DQO en el efluente de 10.7 mg·L⁻¹ (Tabla 5.1).

Por su parte, la estabilización del sistema en la segunda fase experimental, correspondiente al agua residual sintética formulada a base de glucosa (GL), se reportó a partir del día 182 prolongándose hasta el día 196 para GL 0.1= 0.09 kgDQO·kgSSV⁻¹·d⁻¹. Partiendo de una DQO promedio = 1490 mg·L⁻¹ en el

influyente, se consiguió un promedio de remoción de 99.32%, registrando una DQO promedio = 10 mg·L⁻¹ a la salida del reactor. Finalmente, cuando el sistema se alimentó con el sustrato a base de glucosa a GL 0.3= 0.28 kgDQO·kgSSV⁻¹·d⁻¹, se partió de una DQO promedio = 4933 mg·L⁻¹ en el influente, llegando a 19.6 mg·L⁻¹ de DQO en el efluente; en este caso, el porcentaje de remoción promedio de DQO llegó a 99.6 mg·L⁻¹ (Tabla 5.1).

Tabla 5.2. Promedios de DQO en el sistema y porcentaje de remoción durante periodos estables (n=3)

	DQOi (mg·L⁻¹) media	DQOe (mg·L⁻¹) media	% remoción media ±sd
AC 0.1	1888.3	17	99.1 ±0.002
AC 0.3	5210	10.7	99.8 ±0.001
GL 0.1	1485	10	99.3 ±0.001
GL 0.3	4933.3	19.7	99.6 ±0.001

Estos resultados revelan que el sistema de tratamiento empleado ofrece una alta eficiencia de remoción de materia orgánica, ubicándose por encima de las eficiencias comúnmente reportadas para los sistemas BRM (Sanjay y Rashmi, 2013).

5.1.3 Remoción de Nitrógeno amoniacal

Cuando se trata un efluente de agua residual urbana, después de la materia orgánica y los sólidos en suspensión, es la remoción de nitrógeno uno de los principales objetivos, que usualmente, se encuentra presente en las aguas residuales, en forma de nitrógeno amoniacal, lo que las convierte en potenciales precursores de eutrofización de los cuerpos receptores de agua. En los procesos aerobios de tratamiento de aguas residuales, es posible lograr la oxidación de nitrógeno amoniacal a nitritos y finalmente a nitratos (nitrificación), siendo estos últimos la forma menos tóxica para los ecosistemas acuáticos.

Se evaluó la remoción del nitrógeno amoniacal, mediante el monitoreo de la concentración de nitrógeno amoniacal en el influente y en el agua tratada (tabla 5.2).

Tabla 5.3. Promedios de Nitrógeno amoniacal, nitrógeno asimilado por la biomasa, y porcentaje de remoción, durante periodos estables (n=3)

	N-NH₃i (mg·L ⁻¹)	N-NH₃e (mg·L ⁻¹)	% remoción media ± ds	N_{asim} (mg·L ⁻¹)
	n = 3			
AC 0.1	119.3	3	97.7 ±0.003	18.5 ±8.2
AC 0.3	339	0.2	99.9 ±0.0001	144.1 ±8.7
GL 0.1	114	1	99.4 ±0.003	48.8 ±5
GL 0.3	333.3	0.1	99.9 ±0.0001	288.7 ±5.78

En todos los tratamientos, se observó una eficiencia de remoción superior al 97%. Estas eficiencias de conversión son similares a las obtenidas en 2016 por Sánchez *et al.*, en un sistema de tratamiento de agua residual en BRM, en cuyo estudio se implementó un sistema para la remoción de nitrógeno acoplado a la oxidación de metano.

De acuerdo con Ma *et al.* (2000), uno de los inconvenientes más notables que se presentan al trabajar en condiciones de limitación de nutrientes, es que, al estar bajo condiciones de estrés, el desarrollo de la biomasa puede verse afectado y, en consecuencia, la eficiencia del tratamiento. En este sentido, es importante señalar que, si bien existe una ligera deficiencia de nitrógeno en la proporción del agua residual suministrada al sistema, en todas las condiciones estudiadas se alcanzaron tasas de remoción de materia orgánica superiores al 98%, aunado a esto, la concentración de nitrógeno amoniacal asimilado por la biomasa (tabla 5.2), se exhibe como el principal mecanismo de remoción de nitrógeno y destaca el equilibrio en el sistema.

5.1.4 Determinación de la actividad bacteriana

Los valores obtenidos de los coeficientes cinéticos y estequiométrico se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.4. Coeficientes cinéticos y estequiométricos por cada condición experimental. (media \pm ds, n=3)

Corrida experimental	TRC (d)	r_x (gL ⁻¹ d ⁻¹)	r_s (gL ⁻¹ d ⁻¹)	Y (gSSV·gDQO ⁻¹)	ssv/sst (gSSV·gSST ⁻¹)
AC 0.1	63.9 \pm 29	0.1 \pm 0.05	0.6 \pm 0.062	0.172 \pm 0.094	0.82 \pm 0.01
AC 0.3	24.73 \pm 9.7	0.032 \pm 0.19	1.64 \pm 0.020	0.20 \pm 0.12	0.86 \pm 0.02
GL 0.1	59.69 \pm 38.4	0.044 \pm 0.0011	0.47 \pm 0.003	0.094 \pm 0.220	0.90 \pm 0.03
GL 0.3	11.95 \pm 0.09	0.51 \pm 0.05	1.55 \pm 0.08	0.33 \pm 0.033	0.87 \pm 0.02

Se observa que el rendimiento de biomasa, con cada sustrato, es mayor cuando la carga orgánica aumenta y el TRC disminuye.

Por otro lado, se puede decir que cuando se utiliza ácido acético como fuente de carbono, los microorganismos utilizan el sustrato suministrado como fuente de energía para el mantenimiento celular y no para la generación de nuevo material celular, fenómeno que también se aprecia en la condición GL 0.1, en la que se asume que la concentración de sustrato se dirige primordialmente al mantenimiento celular que a la producción de nuevas células (Sakai *et al.*, 2014).

Es importante señalar que dentro de la producción de PHA, los bajos coeficientes de rendimiento de biomasa deben considerarse como una ventaja y como un fenómeno deseable, puesto que, en el mejoramiento de los bioprocesos, se busca que los mecanismos de asimilación de la materia orgánica, se dirijan hacia la acumulación intracelular de material de reserva como fuente de carbono y energía, derivando en mayores rendimientos celulares de polímero (Chen Q., 2010).

Por su parte, la tasa de utilización de sustrato (r_s), alcanzó el pico máximo ($1.64 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$) en la condición AC 0.3, que coincide con la tasa de producción de biomasa r_x ($0.032 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$) más baja de las cuatro condiciones analizadas. En contraparte, los rendimientos de PHA alcanzan el nivel más alto en este tratamiento, por lo que se puede asumir que una fracción importante de la oxidación del ácido acético es destinada para la producción de PHA.

5.2 Recuperación y cuantificación gravimétrica del polímero obtenido

Se logró extraer y recuperar suficiente polímero para cuantificar gravimétricamente la concentración de PHA en el sistema (Figura 5.2)

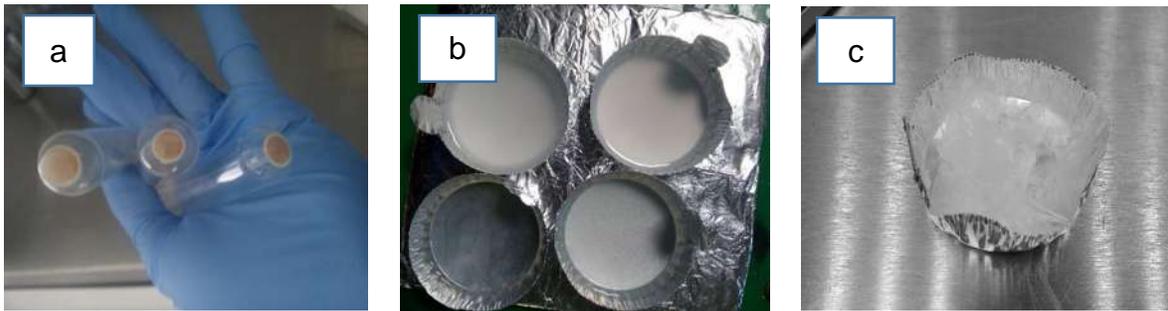


Figura 5.2. Muestras del polímero tipo PHA obtenido. a) Después de centrifugar, b) Después de extraer con cloroformo, c) Después de secado y recuperación.

El rendimiento máximo de acumulación se observó cuando el sistema se alimentó con el diseño de AC 0.3, llegando al máximo rendimiento (9.88%) hacia la mitad del periodo estable. En el extremo opuesto se encuentra la condición AC 0.1, en cuyo caso el pico más alto de rendimiento llegó hasta 3.35% también a mitad del ciclo.

En ningún caso el rendimiento de polímero fue superior al 12% bajo las condiciones propuestas en este estudio, resultados que difieren a los reportados por Sakai *et al.*, (2014), en cuyo estudio compararon la acumulación de PHA en reactores batch, utilizando comunidades microbianas en muestras de lodos activados de diferentes PTAR, concluyendo que los procesos de lodos activados

presentan un potencial de acumulación de PHA superiores a 20% en términos de peso seco celular sin necesidad de procesos adicionales de enriquecimiento.

En el análisis comparativo de los rendimientos obtenidos con los dos diseños de agua residual (Figura 5.3), se ilustra el rendimiento promedio del polímero obtenido con las dos condiciones de CO propuestas. A simple vista se puede apreciar que la mayor producción de PHA se dio cuando el sistema se alimentó con AC 0.3, mientras que la combinación AC 0.1 presentó el rendimiento más bajo. Por su parte, los rendimientos con GL 0.1 y GL 0.3, se encuentran más cercanos entre sí, mostrando a simple vista menor diferencia entre una y otra condición.

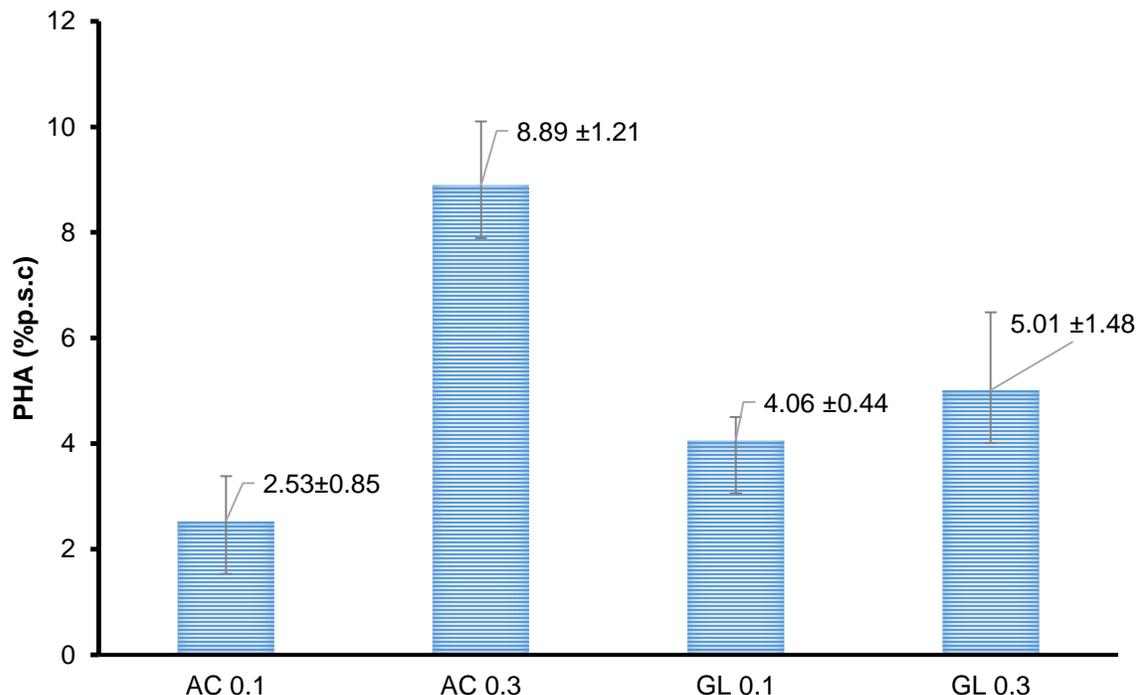


Figura 5.3. Promedio de rendimientos de PHA obtenidos con las cuatro condiciones experimentales.

En contraste con los resultados obtenidos, Amulya *et al.* (2015b), quienes determinaron el rendimiento de PHAs producido por un cultivo mixto de biomasa en suspensión bajo condiciones aerofílicas ($OD=3.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) alimentado con AR sintética a base de glucosa, alcanzando un rendimiento de 28% p.s.c., sin embargo, en aquel diseño de AR la limitación de nitrógeno fue superior, respecto

al presente estudio, lo cual pudo generar un mayor grado de estrés nutricional sobre el cultivo microbiano, traduciéndose en un mayor potencial de acumulación (Figura 5.4).

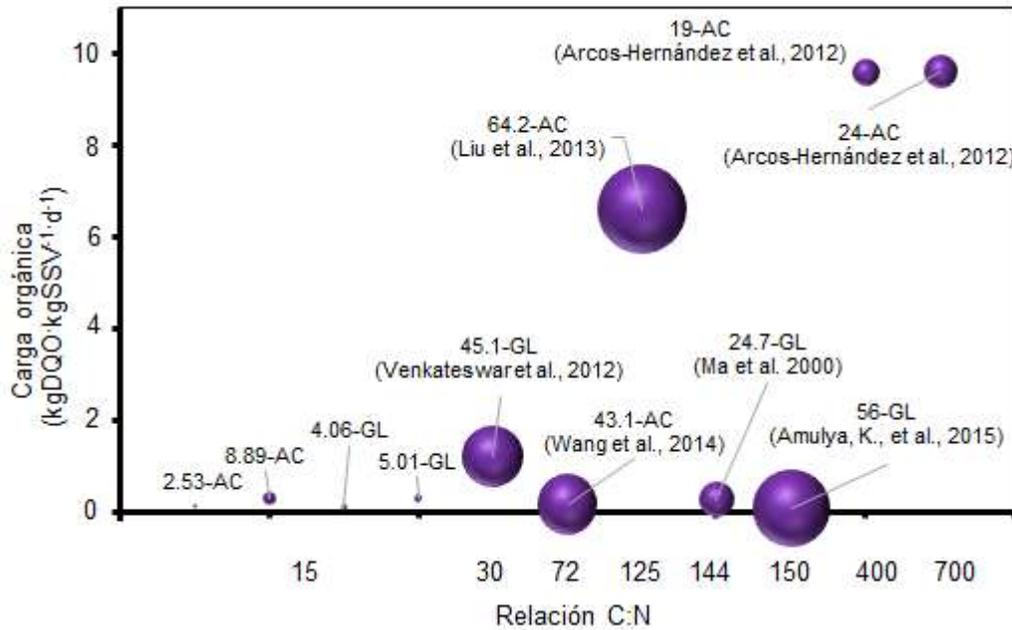


Figura 5.4. Rendimientos de PHAs obtenidos en función CO y relación C:N en reactores por lotes.

En otro estudio, Liu et al. en 2013, suministraron agua residual sintética a base de ácido acético, obteniendo un rendimiento de hasta 64% del p.s.c. de un cultivo mixto de biomasa en suspensión inoculado en un reactor batch, operado bajo condiciones aerobias en pH neutro (Figura 5.4).

Un factor importante que debe considerarse de los bioprocesos a las altas relaciones C:N es que, cuando se trabaja por periodos prolongados con condiciones de deficiencia de nitrógeno, se puede ver afectado negativamente el crecimiento de microorganismos, en consecuencia, se puede ver disminuida la calidad del tratamiento del sistema. Con el fin de reducir este efecto, Ma et al. (2000), propusieron una estrategia de ciclos combinados de suministro y limitación de nitrógeno (en relación limitación:suministro 3:1). En este estudio, lograron

incrementar de 0.061 a 0.247 g de polímero/gramo de biomasa para ratios C:N de 24:1 y 144:1, respectivamente, sin efecto significativo sobre la eficiencia de remoción de materia orgánica (98.3%).

Por su parte Venkateswar y colaboradores (2012), suministraron agua residual sintética completamente soluble y rápidamente biodegradable para la producción de PHAs en un reactor batch, obteniendo rendimientos superiores a 32% para $CO=1.5 \text{ kgCOD}\cdot\text{kgVSS}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; sin embargo, la alimentación de oxígeno se dio de manera intermitente bajo condiciones anóxicas, sometiendo a la biomasa a una condición adicional de estrés, lo que finalmente pudo tener incidencia sobre el rendimiento celular del polímero (Figura 5.4).

Mediante el análisis de varianza (Tabla 5.5) a un nivel de confianza del 95%, se observó que, para el caso de los sustratos, la hipótesis nula de igualdad de medias debe ser rechazada. Es decir que existe diferencia significativa en el rendimiento del producto cuando se cambió el sustrato.

Tabla 5.5. Resumen del análisis de varianza realizado las pruebas gravimétricas

ANÁLISIS DE VARIANZA							
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Sustratos	12.49	1.00	12.49	4.83	0.0354	4.15	
Cargas	120.40	1.00	120.40	46.51	0.0001	4.15	
Interacción	65.72	1.00	65.72	25.38	0.0001	4.15	
Dentro del grupo	82.85	32.00	2.59				
Total	281.46	35.00					

El análisis también mostró que la variable de respuesta reportó diferencias estadísticamente significativas cuando se modificó la carga orgánica. Por su parte, la combinación entre sustratos y cargas también presentó diferencia significativa en el rendimiento celular del polímero.

La diferencia significativa observada en el rendimiento celular de PHA, explica que el potencial de acumulación del cultivo se incrementa ante el aumento de la carga orgánica, sin embargo, no es el único parámetro que interviene. Aún son muchos los esfuerzos de investigación que se dedican a obtener el equilibrio óptimo entre la carga orgánica y otros parámetros de proceso, particularmente el tiempo de retención celular (Reis *et al.*, 2011, Villano *et al.*, 2010).

En el análisis de componentes principales (Figura 5.5) se introdujeron los valores experimentales de DQO, pH y nitrógeno amoniacal, así como los coeficientes determinados TRC, r_s y SSV/SST, correspondientes a los muestreos realizados durante periodos estables. Se aprecia la formación de cuatro grupos, cada grupo representa una corrida experimental y al centro se agrupan las variables estudiadas. El desplazamiento diagonal del TRC hacia las condiciones correspondientes a AC 0.1 y GL 0.1, muestra que éste es el parámetro que tiene mayor preponderancia en la acumulación del polímero, siendo el rendimiento celular de PHAs inversamente proporcional al TRC.

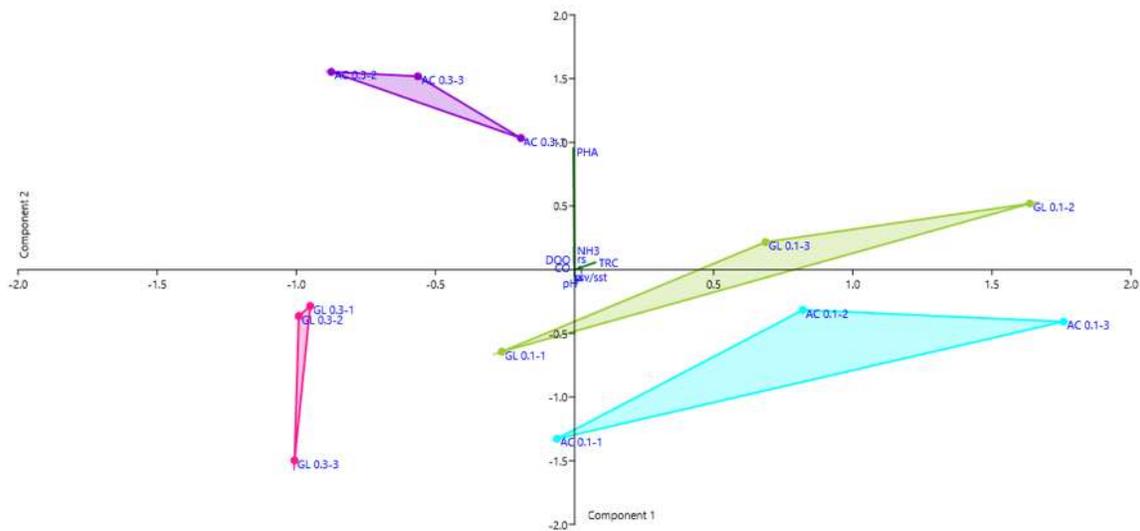


Figura 5.5. Análisis de Componentes Principales.

De acuerdo con Dionisi *et al.*, 2010, en reactores por lotes, se ha encontrado que, disminuyendo el tiempo de contacto entre la biomasa y el sustrato, se puede

incrementar la relación PHA/SSV hasta en un 25%; esto destaca al TRC como un parámetro crucial en la operación de reactores para la producción de PHA.

En este mismo sentido, como se señaló previamente (Tabla 5.3), la CO influyó de manera significativa sobre el TRC; en la Figura 5.6, se muestra la variación en el porcentaje de acumulación de PHA respecto al TRC observado con cada CO, este análisis ayuda a apreciar de forma más clara la relación entre las dos variables (TRC, PHA) y la condición establecida como parámetro de control (CO).

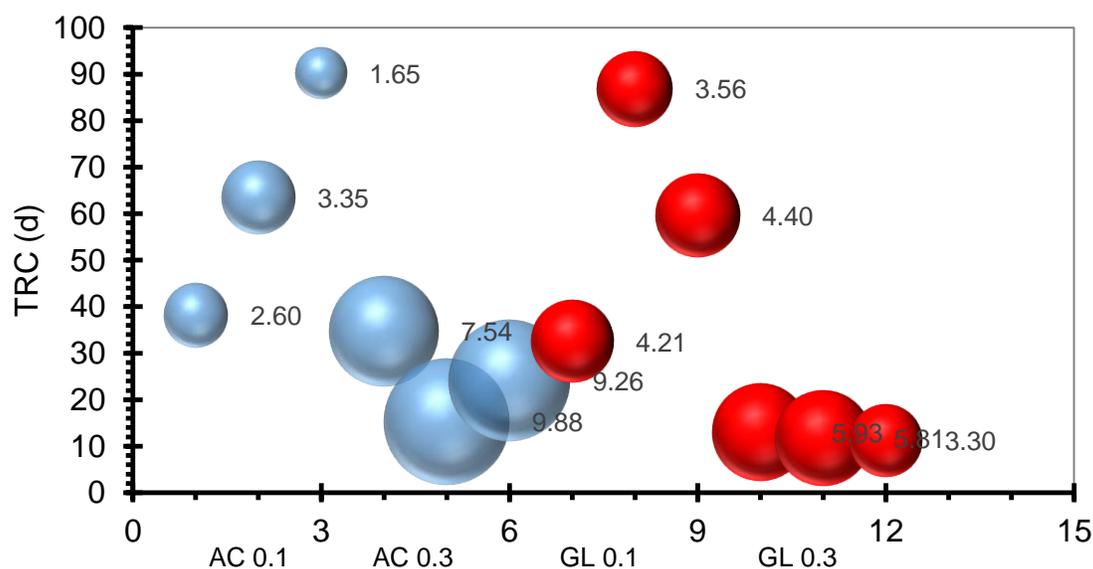


Figura 5.6. Porcentaje de acumulación de PHA por muestra vs tiempo de retención celular ●AC ●GL.

Por otro lado, una de las ventajas de la tecnología BRM es la minimización de los volúmenes de lodos; por esta razón se planteó mantener en el límite inferior la concentración de biomasa en el reactor ($5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo cual ocasionó que los TRC se elevaran, particularmente con las CO cercanas a $0.3 \text{ kgDQO}\cdot\text{kgSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; sin embargo, se tiene certeza del efecto de la CO y la composición del agua residual sobre el rendimiento de PHA bajo condiciones de operación que proveen porcentajes de remoción de materia orgánica superiores al 95%, con lo cual se

pueden explorar alternativas para optimizar el proceso de bioacumulación, entre ellos, la reducción de los TRC.

En adición, se encontró una correlación lineal entre la remoción de DQO y el rendimiento celular de PHA, como se muestra en la Figura 5.7, en la que se puede apreciar que el PHA acumulado por las células aumenta cuanto más se acerca la eficiencia de remoción a 100%. Esta correlación muestra que el proceso productivo es compatible con el sistema de tratamiento planteado, de manera que además de lograr la producción de PHAs en un proceso continuo, se obtiene un efluente cuya calidad satisface altos estándares de tratamiento.

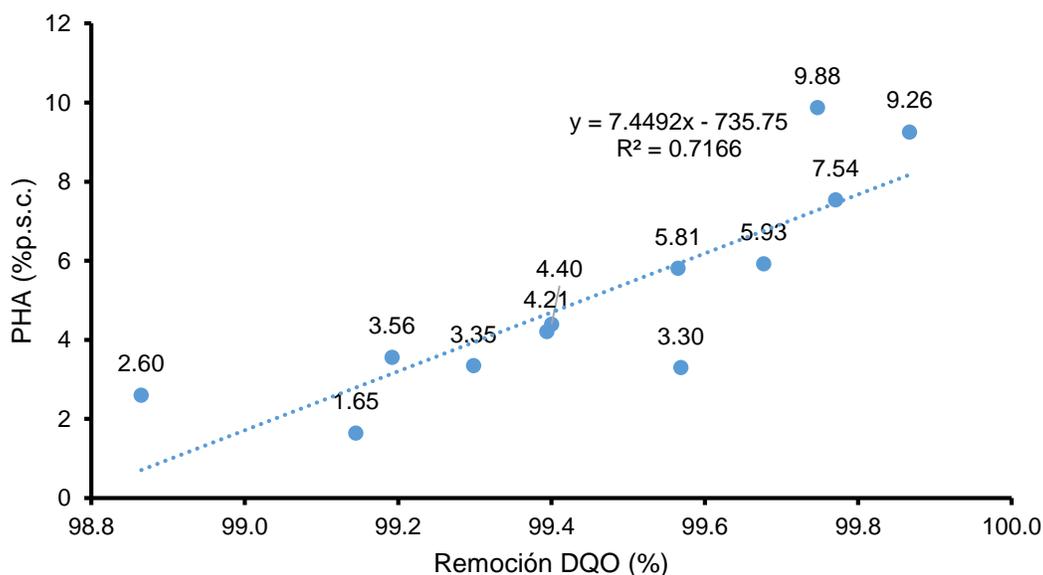


Figura 5.7. Porcentaje de acumulación de PHA vs porcentaje de remoción.

5.3 Cuantificación espectrofotométrica de PHB

Los resultados de concentración relativa de monómeros 3HB (Figura 5.8), mostraron baja concentración de PHB en las condiciones de $CO=0.1$ para ambos

sustratos, sin embargo, en la condición CO=0.3 se detectaron concentraciones superiores, particularmente cuando se empleó ácido acético son sustrato.

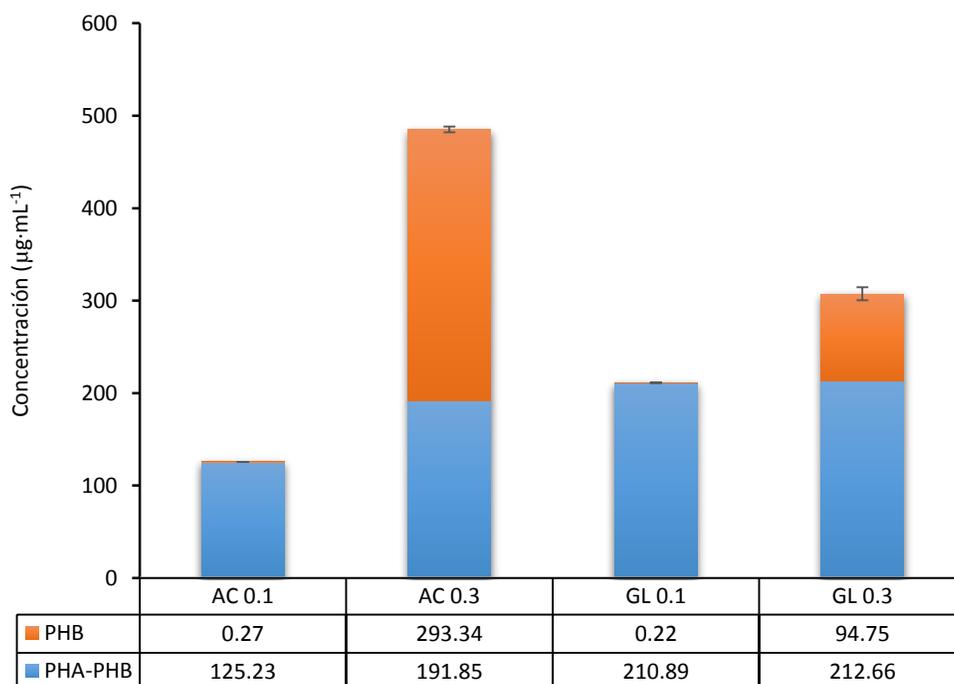


Figura 5.8. Fracción de PHB correspondiente a la concentración de PHA obtenido en cada condición.

Los resultados muestran que, cuando el suministro de materia orgánica se limitó a la carga inferior, la proporción de PHB alcanzó representa a penas el 0.21% y 0.1% del total obtenido con ácido acético y glucosa, respectivamente. Estos resultados muestran que a pesar de tener evidencia de la formación de un polímero del tipo PHA en concentraciones de hasta $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, cuando se alimenta a cargas orgánicas bajas, la presencia de PHB es despreciable, lo que pone de manifiesto la polimerización de otros monómeros.

Por su parte, los resultados obtenidos cuando el cultivo se alimentó a CO=0.3, se obtuvo una producción de monómeros 3HB de $293.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $94.75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ácido acético y glucosa, respectivamente; lo que representa el 60.46% y 30.82% del total del polímero obtenido en cada caso. Esto apunta a que el incremento en la concentración de la fuente de carbono incide sobre el

rendimiento celular del PHAs, pero además interviene directamente en la composición de éste.

La relevancia de este análisis radica en que las propiedades del PHA varían dependiendo del tipo y la concentración de monómeros que contenga su estructura (Babel y Steinbüchel 2001). De acuerdo con Anderson y Dawes (1990), los PHAs conformados por monómeros de cadena corta como el PHB, resultan mucho más versátiles que aquellos conformados por polímeros de naturaleza mixta, debido principalmente a que los primeros presentan un mayor grado de cristalinidad.

La información obtenida mediante el análisis espectrofotométrico señala que el polímero obtenido mediante ácido acético con carga orgánica superior presenta mayor grado de pureza y un rendimiento de PHB superior al 60% que se asemeja en proporción al polímero comercialmente conocido como biopol®, el bioplástico más producido industrialmente (Chen G. Q., 2010); sin embargo, sería necesario realizar un estudio de caracterización más robusto, a fin de determinar su composición y proponer una aplicación idónea.

Si bien aún no se tiene completa certeza de los factores que intervienen en la composición del polímero, se sabe que está determinada en gran parte por el género de microorganismos que lo producen y de la fuente de carbono suministrada (Wang y Lee 1997, Sudesh *et al.*, 2000).

Otros factores que afectan la clase de monómeros contenidos en el PHA son: tipo de microorganismos (por ejemplo, Gram-negativos o Gram-positivas), componentes de los medios de producción, condiciones y tipos de producción (lote, lote alimentado, continuo) y la recuperación (Keshavarz & Roy, 2010). De acuerdo con Chen, 2010, una de las desventajas de la biosíntesis de PHAs respecto a la síntesis química, es que la primera no permite suficiente control sobre las estructuras monoméricas en el polímero, aunque la especificidad enzimática de los cultivos influya de manera importante.

Con estas premisas, se puede suponer que la baja proporción de 3HB en el polímero obtenido, particularmente con las condiciones de carga orgánica baja, sugiere la presencia de uno o más polímeros (de cadena corta o media), lo que a su vez podría explicarse por el empleo de un cultivo mixto sin tratamiento previo, en el que se tiene una gran diversidad de microorganismos propios de los lodos activados, influyendo directamente sobre el tipo de monómeros que polimerizados.

También es importante señalar que, como resultado del empleo de un cultivo mixto, en el biorreactor se puede tener una gran variedad de subproductos y metabolitos intermediarios, algunos de los cuales, estarían fungiendo como sustrato. Estos sustratos alternos podrían tomar diferentes vías de síntesis (Ver anexo B) que, en consecuencia, estarían generando la polimerización de más de un tipo de monómero, dependiendo de la producción de las enzimas clave para la utilización de dichos sustratos por parte de determinados microorganismos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- ❖ El rendimiento celular de polihidroxialcanoatos aumenta al incrementar la carga orgánica, por lo que ésta resulta un parámetro muy importante en la integración de un proceso de síntesis de bioplásticos tipo PHA y un sistema continuo de tratamiento de agua residual.
- ❖ A pesar de que el rendimiento de PHA en términos de peso seco celular puede parecer bajo en las cuatro condiciones establecidas, en comparación con otros rendimientos encontrados, sin embargo, el proceso resulta viable ya que integra dos beneficios potencialmente escalables, además de que no se ha encontrado reporte previo de la producción de PHAs en reactores continuos de tratamiento de agua residual.
- ❖ El sistema BRM permitió alcanzar altas tasas de remoción de materia orgánica y de nitrógeno amoniacal durante los periodos estables, independientemente de la carga orgánica a la que se alimentó. Esto es de gran relevancia, puesto que una vez concluido el periodo de adaptación de la biomasa, la producción de ésta se mantiene estable a lo largo del tiempo de operación.
- ❖ Los resultados obtenidos son una base importante para la búsqueda de parámetros óptimos de un proceso continuo que permita el equilibrio entre la calidad el agua tratada y el rendimiento de los PHAs, ya que, si bien en los procesos por lotes se han reportado altos rendimientos de PHAs, estos procesos son poco aplicables al tratamiento de aguas residuales urbanas con grandes caudales por tratar.

6.2 Validación de hipótesis

H0₁: El rendimiento celular de polihidroxicanoatos aumenta cuando se incrementa la carga orgánica de operación, en un biorreactor con membranas sumergidas alimentado con agua residual sintética, diseñada a partir de una fuente de carbono completamente soluble, fácilmente biodegradable y relación C:N:P constante.

Validada: *El rendimiento celular de PHAs aumentó de 2.53% a 8.89% cuando se incrementó la carga orgánica en el diseño de agua residual a base de ácido acético, y de 4.06% a 5.01% en el diseño a base de glucosa.*

H0₂: El rendimiento celular de los polihidroxicanoatos obtenidos en un biorreactor con membranas sumergidas, es similar cuando éstos se producen a partir de sustratos formulados con fuentes de carbono simples, completamente solubles y fácilmente biodegradables; siempre y cuando, la relación C:N:P se mantenga constante.

Rechazada: *A pesar de que en ambos diseños de agua residual, los nutrientes fueron suministrados en la misma proporción C:N:P = 30:2:1, el análisis mostró diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento de PHA, cuando se alimentó con diferente sustrato, aún cuando ambos fueron formulados a partir de fuentes de carbono simples, completamente solubles y fácilmente biodegradables.*

6.3 Recomendaciones

- ❖ El TRC mostró una gran influencia en la producción de PHA, por lo tanto se recomienda explorar el efecto del TRC sobre el potencial acumulativo de PHAs, por parte del cultivo en un proceso continuo.
- ❖ Trabajar un diseño experimental más amplio, que además de diferentes sustratos y cargas orgánicas, incluya distintas relaciones C:N:P como variable independiente, permitiría una mayor comprensión de los mecanismos de producción de PHAs en procesos continuos, a la vez que aportaría más elementos para la selección de los parámetros que optimizarían el proceso productivo, integrado al tratamiento eficiente de aguas residuales.
- ❖ Implementar estrategias de alimentación dinámica que generen al cultivo mixto condiciones de estrés nutricional, (i) por medio de periodos intermitentes de escases y abundancia de sustrato, (ii) incrementando la relación C:N:P y (iii) disminuyendo la concentración de oxígeno en el reactor, con la finalidad de potencializar la tasa de acumulación de PHAs en el sistema. Asimismo, se recomienda someter al cultivo a una fase de selección, mediante un tratamiento previo de alimentación discontinua, que puede incrementar la producción de PHAs; sin embargo, sería necesario evaluar el efecto inmediato que esta aclimatación tendría sobre la calidad del tratamiento.

7. REFERENCIAS

- Albuquerque M.G., Martino V., Pollet E., Averous L., Reis M.A.M., (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA) rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*. 151, 66-76.
- Albuquerque M.G., Carvalho G., Kragelund C., Silva A.F., Barreto Crespo M.T., Reis M.A., Nielsen P.H., (2013). Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. *Journal of ISME*. 7(1), 1-12.
- Amulya K., Jukuri S., Venkata Mohan S., (2015a). Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: process integration for up-scaling. *Bioresource Technology*. 188, 231-239.
- Amulya K., Venkateswar Reddy M., Rohit M.V., Venkata Mohan S., (2015b). Wastewater as renewable feedstock for bioplastics production: understanding the role of reactor microenvironment and system pH. *Journal of Cleaner Production* 112 (5), 4618-4627.
- Anderson A.J., & Dawes E.A., (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 54, 450-472.
- Babel W. & Steinbüchel A., (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in Biochemistry. *Engineering Biotechnology*. 1, 342.
- Beccari M., Bertin L., Dionisi D., Fava F., Lampis S., Majone M., Valentino F., Vallini G., Villano M., (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Chemical Technology and Biotechnology*. 84, 901-908.
- Becerra J., M., (2013). Producción de un polímero tipo polihidroxicanoato (pha) empleando residuos de la producción de biodiesel (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Bourque P.Y., Pomerleau Y., Groleau D., (1995). High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecularmass PHB. *Appl Microbiol. Biotechnol*. 44:367–376.
- Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.F., (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 65,127–161.
- Braunegg G., Sonnleitner B., & Lafferty R. M., (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1), 29–37.

- Chanprateep S., Buasri K., Muangwong A., Utiswannakul P., (2010). Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab* 95(10), 2003–2012.
- Chen G. Q., Wu Q., (2005). Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 67, 592–599.
- Chen G.Q., (2010). *Plastics from Bacteria Natural Functions and Applications*. Berlin. Springer.
- Ciggin S. A., Rossetti S., Majone M., Orhon D., (2012). Extent of intracellular storage in single and dual substrate systems under pulse feeding. *Environmental Science and Pollution Research*. 20, 1225–1238
- Dionisi D., Majone M., Vallini G., Di Gregorio S., Beccari M., (2006). Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnol Bioeng.* 93, 76–88.
- Drews A., Vocks M., Bracklow U., Iversen V., Kraume M., (2007). Does fouling in MBRs depend on SMP?. *Desalination*. 231, 141–149.
- González G. Y., Meza C. J. C., González R. O. y Córdova L. J. A., (2012). Síntesis y Biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. Revisión. Departamento de Madera, Celulosa y Papel. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115.
- Gumel A.M., Anuar M.S.M., Heidelberg T., (2012). Effects of carbon substrates on biodegradable polymer composition and stability produced by *Delftia tsuruhatensis* Bet002 isolated from palm oil mill effluent. *Polym Degrad Stab.* 97(8), 1227–1231.
- Hirani Z.M., Decarolis J.F., Adham S.S., Jacangelo J.G., (2010). Peak flux performance and microbial removal by selected membrane bioreactor systems. *Water Research*. 44(8), 2431–2440
- Khanna S. & Srivastava A., (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40, 607-619.
- Khardenavis A.A., Kumar M.S., Mudliar S.N., Chakrabarti T., (2007). Biotechnological conversion of agroindustrial wastewaters into biodegradable plastic, poly b-hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*. 98, 3579–3584.
- Keshavarz T., & Roy I., (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13, 21–326.
- Lau N., Tsuge T. y Sudesh K., (2011). Formation of new polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer in *Burkholderia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(5), 1599-609.
- Law J.H. & Slepecky R., (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82, 33-36.

- Le-Clech P., (2010). Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88, 1253–1260.
- Lee J., Lee S.Y., Park S., Middelberg A., (1999). Research review paper Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances*. 17, 29-48.
- Li Q., Li G., Yu S., Zhang Z., Ma F., Feng Y., (2010). Ring-opening polymerization of ε-caprolactone catalyzed by a novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum*. *Process. Biochem.* 46(1), 253–257.
- Ma C. K., Chua H., Yu P. H. F., Hong K., (2000). Optimal Production of Polyhydroxyalkanoates in Activated Sludge Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84, 981–989.
- Malagón, D., & Acosta, M., (2008). Manual de procedimientos. Proyecto: biosíntesis y caracterización de polímeros biodegradables del tipo PHAs. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia IBUN, Bogotá.
- Metcalf Y Eddy, Inc., (2014). *Wastewater Engineering. Treatment and Resource Recovery*. 5th edition, MC-GRAW HILL. Estados Unidos.
- Moita R., Lemos P.C., (2012). Biopolymers production from mixed cultures and pyrolysis by products. *J. Biotechnol.* 157, 578-583.
- Mumtaz T., Yahaya N.A., Abd-Aziz S., Abdul Rahman N.A., Yee P.L., Shirai Y., Hassan M.A., (2010). Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluente. A Malaysian perspective. *J. Clean. Prod.* 18, 1393-1402.
- Negra J., I., (2015). Asimilación de nutrientes y producción de biomasa, en un biorreactor de membranas sumergidas, acoplado a un sistema acuícola con recirculación (tesis de maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán; México.
- Nonato R.V., Mantelatto P.E., Rossell C.E.V., (2001). Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 1–5
- Purushothaman M., Anderson R., Narayana S., Jayaraman V., (2001). Industrial by products as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) biodegradable plastics. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 24, 131–136.
- Rathore P., (2014). Bioprospects of PHB: A Review. *International journal of Emerging Trends in Science and Technology*. 1 (04), 2348-9480.
- Reis M. A. M., Albuquerque M., Villano M., Majone M., (2011). Mixed culture processes for polyhydroxyalkanoate production from agro-industrial surplus/wastes as feedstocks. *Comprehensive Biotechnology*. 6, 669–683.
- Sanjay K. S., & Rashmi S., (2013). *Wastewater Reuse and Management*. Dordrecht. Springer.

- Shailesh S. S., Bipinchandra K. S., Tuan K. T., and Beom S. K., (2016). Lignocellulosic and marine biomass as resource for production of polyhydroxyalkanoates. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 33 (5), 1505-1513.
- Shuler M., & Kargi F., (1992). *Bioprocess Engineering, Basic concepts*. New Jersey. Prentice Hall.
- Sakai K., Miyake S., Iwama K., D. Inoue, S. Soda and M. Ike, (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA-accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*. 118 (1), 255-266.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y., (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 25 (10), 1503-1555.
- Sun Z., Ramsay J.A., Guay M., Ramsay B.A., (2009). Fed-batch production of unsaturated medium-chainlength polyhydroxyalkanoates with controlled composition by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology Biotechnology*. 82 (4), 657-662.
- Sun Z., Ramsay, J. A., Guay, M., & Ramsay B. A., (2007). Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied Microbiology Biotechnology*. 74 (1), 69–77.
- Tian P., Shang L., Ren H., Mi Y., Fan D., Jiang M., (2010). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: current research and development. *Afr J Biotechnol*. 8 (5), 709–714.
- Valentino F, Vallini G, Majone M, Beccari M., (2010) Effect of hydraulic and organic loads in sequencing batch reactor on microbial ecology of activated sludge and storage of polyhydroxyalkanoates. 20, 187–92.
- Wang F.L. y Lee S.Y. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol*. 63, 4765-4769.
- Zagar E., Krzan A., (2004). Characterization of Microbial Polyhydroxyalkanoates. *Biomacromolecules*. 5, 628-636.
- Zhang X.J., Luo R.C., Wang Z., Deng Y., Chen G.Q., (2009). Applications of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuel. *Biomacromolecules*. 10 (4), 707-711.

ANEXO A

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

PRUEBA GRAVIMÉTRICA PARA CUANTIFICACIÓN DE PHA

Reactivos

Hipoclorito de sodio Comercial (5.25% p/v)
Cloroformo
Alcohol industrial (80% etanol)
Agua destilada

Procedimiento

1. Tomar 30 mL de biomasa en suspensión y adicionarlos en un tubo tipo Falcón.
2. Agregar 50 mL de hipoclorito de sodio.
3. Mantener a temperatura ambiente durante 12 horas.
4. Centrifugar a 5000 rpm por 15 min.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Adicionar al pellet 2 mL de agua destilada y agitar en vortex
7. Centrifugar a 5000 rpm por 15 min.
8. Descartar el sobrenadante.
9. Agregar 2 mL de alcohol industrial (80 % etanol) al pellet y agitar en vortex. Y centrifugar en las mismas condiciones.
10. Descartar el sobrenadante.
11. Adicionar 20 mL de cloruro de cloroformo y agitar vigorosamente en vortex.
12. Filtrar en papel filtro de poro mediano para separar los restos insolubles.
13. Pasar a una cazuela de aluminio previamente pesada.
14. Dejar secar en campana de extracción a temperatura ambiente.
15. Luego llevar a horno a 60° C hasta peso constante.
16. Registrar el peso de la cazuela con el polímero seco y determinar la cantidad de polímero acumulado.

PRUEBA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA CUANTIFICACIÓN DE PHB

Reactivos

Solución acetona:etanol (50:50% v/v)

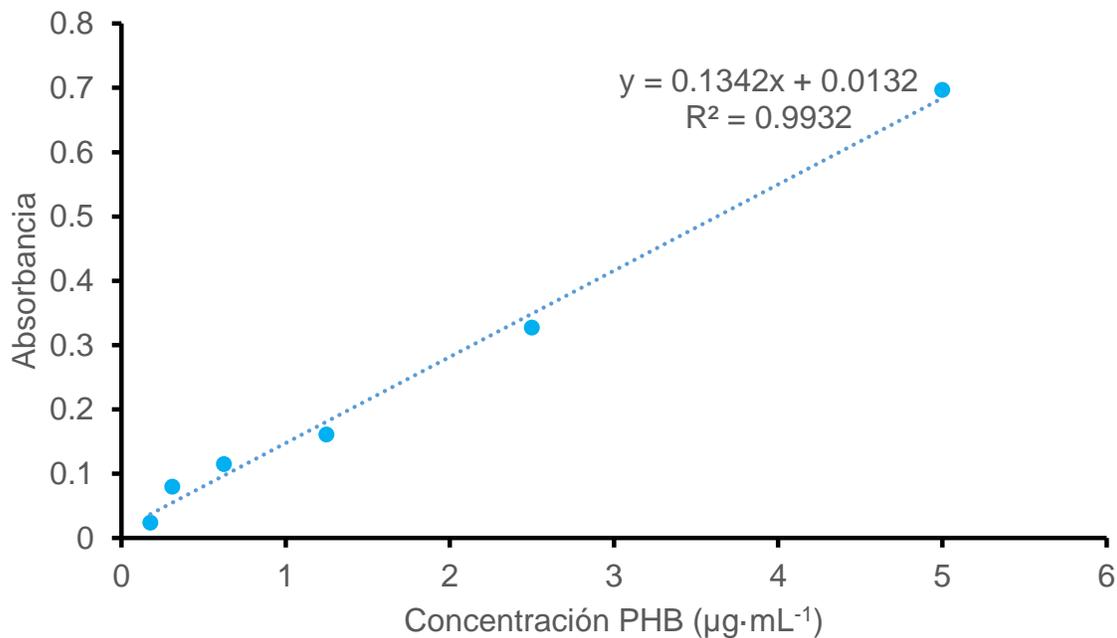
Cloroformo

Agua destilada

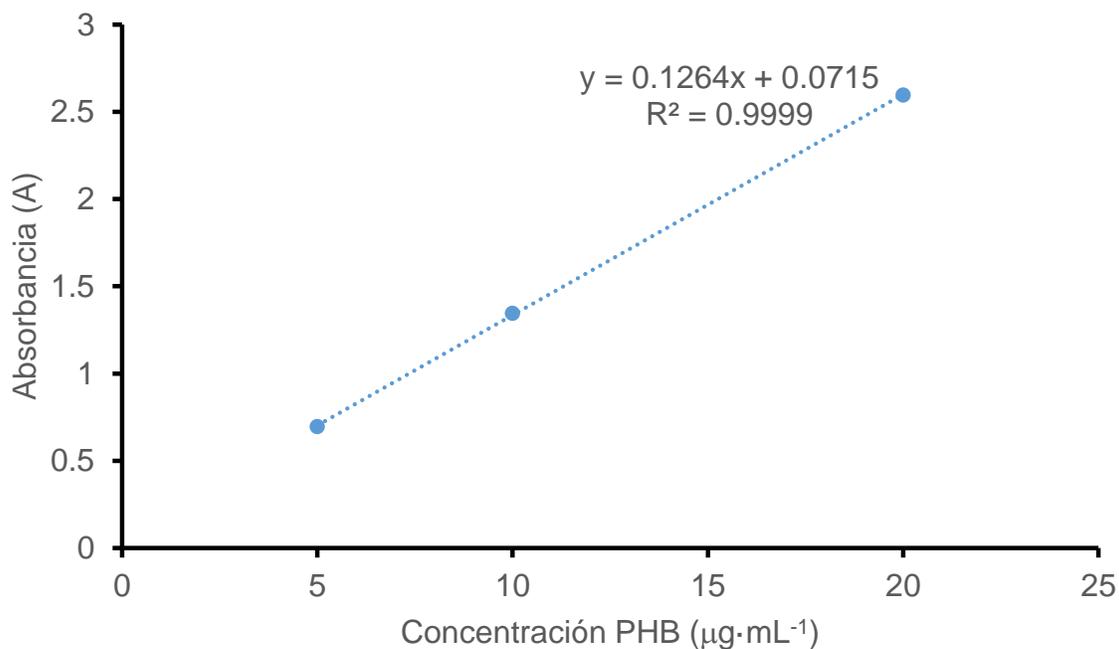
1. Colocar 1 ml biomasa en suspensión en un tubo eppendorf.
2. Centrifugar a 3000 rpm durante 30 min.
3. Lavar el pellet con 1 ml de solución acetona:etanol (50:50%)
4. Suspender del pellet en un volumen igual de hipoclorito de sodio comercial e incubar a temperatura ambiente por 3 h.
5. Centrifugar la mezcla resultante a 3000 rpm durante 30 min.
6. Descartar sobrenadante.
7. Lavar el precipitado con 1 ml de solución acetona:etanol (50:50%)
8. Disolver el pellet en 1.5 ml de cloroformo caliente
9. Transferir el cloroformo a un tubo limpio, separando los restos de células mediante un filtro de fibra de vidrio.
10. Llevar a evaporación el cloroformo.
11. Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico y calentar a 100°C en baño maría por 10 minutos. (La adición de ácido sulfúrico convierte el polímero en ácido crotónico).
12. Dejar enfriar la solución y medir absorbancia a 235 nm para la determinación de la concentración de PHB, contra un blanco de ácido sulfúrico.

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE PHB POR ESPECTROFOTOMERÍA

A). Para AC 0.1 y GL 0.1



B) Para AC 0.3 y GL 0.3



ANEXO B

RUTAS METABÓLICAS PARA LA SÍNTESIS DE PHAs (Tomado de Becerra, 2013)

