



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA
TESIS

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) A PARTIR DE
LIXIVIADOS DE COMPOSTEO DE DESECHOS ORGÁNICOS CON UN CULTIVO
AEROBIO MIXTO**

PRESENTA

M. Bt. Sánchez Valencia Angel Iván

MATRICULA

2163807843

Para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

Directora: **Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz**

Asesora: **Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez**

Asesora: **Dra. Mónica Liliana Salazar Peláez**

JURADO

Presidenta: Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Secretaria: Dra. Mónica Liliana Salazar Peláez

Vocal: Dr. Ulises Rojas Zamora

Vocal: Dr. Iván Moreno Andrade

Ciudad de México, 9 de febrero del 2022

La presente tesis fue financiada a través de la beca número 570212, concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Este trabajo fue llevado a cabo en el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales W-106 en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

“El Doctorado en Biotecnología de la UAM-I está incorporado en el PCPC del CONACYT, con número de referencia 001466”

México D.F. a 9 de febrero del 2022

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

“ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS
(PHA) A PARTIR DE LIXIVIADOS DE COMPOSTEO DE DESECHOS
ORGÁNICOS CON UN CULTIVO AEROBIO MIXTO”

Presenta

Angel Iván Sánchez Valencia

Comité Tutorial:

María del Carmen Fajardo Ortiz
Directora, UAM-Iztapalapa

Mónica Alicia Meraz Rodríguez
Asesora, UAM-Iztapalapa

Mónica Liliana Salazar Peláez
Asesora, UAM-Azcapotzalco

Jurado:

Mónica Alicia Meraz Rodríguez
Presidenta, UAM-Iztapalapa

Dra. Mónica Liliana Salazar Peláez
Secretaria, UAM-Azcapotzalco

Dr. Ulises Rojas Zamora
Vocal, UAM-Azcapotzalco

Dr. Iván Moreno Andrade
Vocal, UNAM-Juriquilla

Agradecimientos

A mi madre Elvira Sánchez Valencia por apoyarme en todos y cada uno de los momentos de mi vida fueran buenos o malos y por creer en mí cuando yo mismo no lo hacía.

A mi familia, en especial a mis tíos, Martin y Natalia Sánchez, así como a mi primo Daniel, por acompañarme en este largo camino, nunca dejarme solo, y apoyarme en todo.

A la Dra Carmen Fajardo, quien, con su dirección, conocimiento y enseñanza fue posible este proyecto.

A la Dra Mónica Meraz por su tutoría durante la realización de mi proyecto de investigación. Así como por el tiempo dedicado, e interés mostrado en mi formación académica y el apoyo constante.

A la Dra Mónica Salazar por hacerme entender la forma de desarrollar un proyecto de este tipo, por sus consejos y aportes que ayudaron a elevar la calidad de este trabajo

Al Dr. Ulises Rojas por sus importantes consejos y observaciones que ayudaron a mejorar esta tesis

Al Dr. Iván Moreno Andrade por sus valiosos consejos y recomendaciones que permitieron enriquecer esta tesis.

A mis amigos del laboratorio W-106 Vianka, Anita y Memo, quienes me apoyaron durante esta parte de mi vida, pasando buenos y malos momentos. Por el esfuerzo y tiempo que implicó recolectar las muestras para el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos Briseida y David, de la UAM-I que, igual que yo saben lo difícil que es este camino, por su apoyo y palabras de aliento.

A mi amiga Phaedra quien me motivo a continuar adelante, realizar otros proyectos además del posgrado, sin descuidar el mismo, apoyándome y aconsejándome.

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos, como reservas de carbono y energía, los cuales tienen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo, con la ventaja de que son completamente biodegradables y, en consecuencia, amigables con el medio ambiente. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, una limitante son los costos de producción, una alternativa para reducirlos es sustituir cepas puras por cultivos mixtos, así como aprovechar y valorizar el contenido de carbono orgánico de las aguas residuales y residuos agroindustriales empleándolos como fuente de sustrato.

De esta manera, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la producción de PHA a partir de lixiviados de composteo de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) empleando un cultivo aerobio mixto, mediante un reactor de lote secuencial (SBR).

En primer lugar, se puso en marcha un SBR a escala laboratorio (5 L), el cual fue inoculado con lodos activados de la Planta de tratamiento de aguas Residuales “Cerro de la Estrella”, y alimentado con lixiviados de la FORSU, procedentes de la planta de composteo “Bordo Poniente” como fuente de sustrato por 233 días.

Los lixiviados fueron caracterizados y diluidos obteniendo una concentración en el influente de 1g DQO/L y una relación C/N de 23.2. El SBR fue operado bajo la estrategia de la alimentación dinámica aerobia (ADA), ciclos de 12 horas divididos de la siguiente manera: 8 minutos de ADA, 680 minutos de aireación y agitación, 30 minutos de sedimentación y 10 minutos de descarga, temperatura de 22 ± 3 °C, con una velocidad de agitación de 250 rpm y sin control de pH.

Los resultados mostraron que, bajo esta configuración operacional, el cultivo mixto pudo ser enriquecido en biomasa acumuladora de PHA en un lapso de 30 días, alcanzando una máxima acumulación de 16.8%; además, el biopolímero obtenido a partir de lixiviados de la FORSU fue identificado como polihidroxibutirato (PHB).

Una vez enriquecida la biomasa, un segundo experimento fue llevado a cabo con la finalidad de evaluar el efecto de la variación en la relación C/N sobre la acumulación de PHB, se tomó como control la cinética de un ciclo de operación típico del SBR (C/N= 23.2), la cual fue llevada a cabo a los 30 días de operación, las otras C/N ensayadas fueron: 13.3, 25.2, 38.1 y 41.2, que corresponden a los días de operación 60, 103, 118 y 133, respectivamente. Además de la acumulación de PHB, se siguieron los perfiles de consumo de oxígeno disuelto (OD), carbono orgánico total (COT), ácidos grasos volátiles (AGV), amonio (NH_4^+) y fosfato (PO_4^{3-}).

Los análisis cinéticos revelaron que el aumento en la relación C/N a más de 25.2 afectó la acumulación de PHB, disminuyendo a 10.5 y 5.3% para las relaciones C/N de 38.1 y 41.2, respectivamente. En contraste, la mayor acumulación fue alcanzada con la aplicación de la relación C/N de 23.2 teniendo un valor de 16.8%. Este resultado permitió concluir que el exceso en la fuente de carbono puede causar una inhibición en la síntesis de PHB, promoviendo rutas metabólicas que conducen al crecimiento de biomasa y la formación de CO_2 frente a la síntesis del biopolímero.

A lo largo del tiempo de operación del SBR se registró una pérdida en la capacidad respiratoria medida como la tasa de consumo de oxígeno (q_{O_2}), la cual disminuyó de 3.49 mg/L•min (segundo mes) a 0.89 mg/L•min (octavo mes). Este comportamiento fue atribuido a la exposición continua a largos periodos de ayuno y a la composición de los lixiviados.

Finalmente se evaluó el efecto del incremento de la carga orgánica sobre la acumulación de PHB, empleando un inóculo fresco y un SBR con las mismas condiciones empleadas durante el enriquecimiento. Debido a la contingencia COVID-19, sólo fue posible operar el SBR por 38 días, mientras que las cargas aplicadas fueron de 2.01 ± 0.12 g DQOs/L•d (día 0 a 21) y 3.88 ± 0.19 g DQOs/L•d (día 22 a al 38). Este experimento mostró que el incremento en la carga orgánica, afectó negativamente la acumulación de PHB, asimilación del sustrato y capacidad respiratoria, probablemente causado por compuestos no viables para la síntesis de PHB, que se fueron acumulando en el sistema.

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers synthesized intracellularly by some microorganisms as carbon and energy reserves, which have properties similar to those of petroleum-derived plastics, with the advantage that these are completely biodegradable; consequently, friendly with the environment. Nevertheless, despite the advantages, a limitation is the production costs, an alternative to reduce them is to substitute pure strains for mixed cultures and take advantage and value the organic carbon content of wastewater and agro-industrial wastes using them as the substrate source.

In this way, this work aimed to evaluate PHA production from composting leachates of the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) using a mixed aerobic culture through a sequential batch reactor (SBR).

In the first place, a laboratory-scale SBR (5 L) was started up, which was inoculated with activated sludge from the “Cerro de la Estrella” Wastewater Treatment Plant and fed with leachates from OFMSW, from “Bordo Poniente” composting plant, as a substrate source for 233 days.

Leachates were characterized and diluted, obtaining an influent concentration of 1g COD/L and a C/N ratio of 23.2. The SBR was operated under the strategy of aerobic dynamic feeding (ADF), cycles of 12 hours divided as follows: 8 minutes of ADF, 680 minutes of aeration and agitation, 30 minutes of settling, and 10 minutes of withdrawal. The temperature was 22 ± 3 °C, with a stirring speed of 250 rpm and without pH control.

The results showed that, under this operational configuration, the mixed culture could be enriched in PHA accumulating biomass in a lapse of 30 days, reaching a maximum accumulation of 16.8%, and the biopolymer obtained from OFMSW leachates was identified as polyhydroxybutyrate (PHB).

Once the biomass is enriched, a second experiment was carried out in order to evaluate the effect of the variation in the C/N ratio on the accumulation of PHB, the kinetic of a typical SBR operating cycle (C/N = 23.2) was taken as control, which was

carried out after 30 days of operation, the other C/N assayed were: 13.3, 25.2, 38.1 and 41.2 corresponding to working days 60, 103, 118 and 133 respectively. In addition to the accumulation of PHB, the profiles of dissolved oxygen (DO), total organic carbon (TOC), volatile fatty acids (VFA), ammonium (NH_4^+), and phosphate (PO_4^{3-}) consumption were also followed.

Kinetic analysis revealed that the increase in the C/N ratio above 25.2 affected PHB accumulation, decreasing to 10.5 and 5.3% for the C/N ratios of 38.1 and 41.2, respectively. In contrast, the highest accumulation was achieved by applying the C/N ratio of 23.2, having a value of 16.8%. This result allowed to conclude that the excess in the carbon source can cause an inhibition in the synthesis of PHB, promoting metabolic pathways that lead to the growth of biomass and the formation of CO_2 front to the synthesis of the biopolymer.

Throughout the time of operation of the SBR, a loss in respiratory capacity was recorded, measured as the rate of oxygen consumption ($q\text{O}_2$), which diminished from 3.49 mg/L•min (the second month) to 0.89 mg/L•min (the eighth month). This behavior was attributed to continuous exposure to long periods of famine and the composition of the leachates.

Finally, the increase in the organic load on the PHB accumulation was evaluated, using a fresh inoculum and an SBR with the same conditions used during enrichment. Due to the COVID-19 contingency, only was possible to operate the SBR for 38 days, while the applied loads were 2.01 ± 0.12 g CODs/L•d (day 0 to 21) and 3.88 ± 0.19 g CODs/L•d (day 22 a to 38). This experiment showed that the increase in organic load negatively affected PHB accumulation, substrate assimilation, and respiratory capacity, probably caused by non-viable compounds for the synthesis of PHB, which accumulated in the system.

Índice	Pág.
1. Introducción	16
2. Marco teórico	18
2.1 Problemática de los petroplásticos	18
2.2 Bioplásticos	19
2.3 Polihidroxicanoatos (PHA)	22
2.3.1 Definición, características, clasificación, propiedades y usos	22
2.3.2 Síntesis de PHA	27
2.3.3 Degradación de PHA	29
2.3.4 Microorganismos acumuladores de PHA	31
2.3.5 Sustratos empleados en la producción de PHA	33
2.3.6 Proceso de producción de PHA a partir de aguas residuales	37
3. Antecedentes directos	43
4. Justificación hipótesis y objetivos	46
4.1 Justificación	46
4.2 Hipótesis	47
4.3 Objetivo general	47
4.4 Objetivos particulares	47
5. Materiales y métodos	48
5.1 Muestreo de lixiviados de la FORSU y lodos aerobios de purga	50
5.2 Reactor lote secuencial (SBR) para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA	50
5.3 Análisis cinético del inóculo	52
5.4 Efecto de la relación C/N sobre la producción de PHA	53
5.5 Efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA	54
5.6 Técnicas analíticas	54
6. Resultados	56
6.1 Muestreo y caracterización de lixiviados de composteo de la FORSU	56

6.2 Análisis del proceso de acumulación de PHA	59
6.2.1 Perfil cinético del inóculo	59
6.2.2 Identificación de PHA por microscopia de fluorescencia	61
6.2.3 Caracterización de los PHA por espectrofotometría UV e infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	63
6.2.4 Evolución de los periodos de saciedad/ayuno a lo largo del tiempo	66
6.2.5 Disminución en la actividad respiratoria	67
6.2.6 Desempeño del SBR	70
6.2.7 Efecto de la relación C/N sobre la acumulación de PHB de un cultivo mixto	73
6.3 Efecto de la carga orgánica volumétrica sobre la acumulación de PHB en un reactor SBR a escala laboratorio	92
6.3.1 Desempeño del SBR a diferentes cargas orgánicas	92
7. Conclusiones y recomendaciones	99
7.1 Conclusiones	99
7.2 Recomendaciones	100
8. Referencias	101
9. Anexos	119

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 2.1 Comparación de las propiedades físicas del PHB y PP (tomado de Lemos y Mina, 2015)	25
Tabla 2.2 Empresas productoras de PHA, sustratos utilizados, tipo de polímero y nombre comercial	26
Tabla 2.3 Tiempo de degradación de PHA en diferentes ambientes (tabla elaborada con datos de Emadian et al., 2017)	30
Tabla 2.4 Microorganismos reportados como productores de PHA en cultivos mixtos usando residuos como sustrato	33
Tabla 2.5 Residuos prefermentados utilizados para la producción de PHA	35
Tabla 5.1 Diseño Experimental para los ensayos de variación en las relaciones C/N	53
Tabla 5.2 Técnicas analíticas	55
Tabla 6.1 Comparaciones realizadas al lixiviado de la FORSU de la planta de Composteo Bordo Poniente	57
Tabla 6.2. ANOVA para la comparación de medias del PHB a diferentes relaciones C/N mediante una prueba de Tukey	88
Tabla 6.3 Balance de carbono incorporado a PHB para cada relación C/N	89
Tabla 6.4 Parámetros cinéticos para las relaciones C/N	91
Tabla 6.5 Parámetros obtenidos para las cargas orgánicas probadas	94

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Capacidad global de producción de bioplásticos (gráfica elaborada a partir de los datos de la <i>European Bioplastics and Nova-Institute</i> , 2020)	21
Figura 2.2 Inclusiones de PHA (Tipos de Bioplásticos: Os Polihidroxialcanoatos (PHA's) ~ Bioplastic News)	22
Figura 2.3 Estructura polimérica general de los PHA (adaptada de Kaur et al., 2017)	23
Figura 2.4 Metabolismo del Carbono y Fósforo en la respiración aerobia durante la síntesis de PHB (adaptado de Kaur et al., 2017; Lemos et al., 1998; Pereira et al., 1996)	29
Figura 2.5 Producción de PHA a partir de AGV (tomada de Lemos et al., 2006)	35
Figura 2.6 Régimen de saciedad/ayuno	40
Figura 5.1 Diagrama de actividades realizadas para cumplir los objetivos planteados en la tesis a) Lixiviados y b) Reactor SBR	48
Figura 5.2 SBR de enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA	51
Figura 5.3 Ciclo de operación del reactor SBR para el enriquecimiento de biomasa productora de PHA	52
Figura 6.1 Perfil cinético del inóculo: a) — OD, ▲ COT, ○ PHA. b) Perfil de consumo de ♦ HA	60
Figura 6.2. Gránulos de PHA observados bajo fluorescencia a 460 nm con aumento de 100X: a) 0, b) 6, c) 12 y d) 20 días	62
Figura 6.3 Espectro UV: estándar de ácido crotonico (—), muestra problema (—)	63
Figura 6.4 Espectro FTIR de PHB	65
Figura 6.5 Cinéticas de consumo de OD en distintos días de operación: — día 7, — día 50, — día 120, — día 210	67
Figura 6.6 Actividad respiratoria del cultivo durante el monitoreo del SBR ■ qO ₂ y ● k	69
Figura 6.7 Perfil de enriquecimiento del SBR durante la operación: a) DQOs: □ influente, ■ efluente; b) NH ₄ ⁺ : ● influente, ○ efluente y PO ₄ ³⁻ : ◇ influente, ◆ efluente	71
Figura 6.8 Perfil cinético típico de un ciclo de operación a una relación C/N de 23.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ♦ HA, × HP y □ HB	74

Figura 6.9 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 13.3. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. B) Perfil de consumo de ◆ HA	77
Figura 6.10 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 25.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. B) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV	79
Figura 6.11 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 38.1. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV	81
Figura 6.12. Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 41.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV	83
Figura 6.13 Perfil de relaciones C/N: ◇ 13.3, ◆ 23.2, ● 25.2, ■ 38.1, □ 41.2. figura a) HA, en figura b) PHB	85
Figura 6.14 Perfil de consumo de PO_4^{3-} para las relaciones C/N: ◇ 13.3, ◆ 23.2, ● 25.2, ■ 38.1, □ 41.2	87
Figura 6.15 Perfil de DQOs del reactor SBR con aumento de cargas: ■ Influyente, □ efluente	93
Figura 6.16 Perfil de acumulación de PHB en el SBR durante las etapas con aumento de carga: ○ %PHB	96
Figura 6.17. Actividad respiratoria del cultivo durante el monitoreo del SBR con aumento de cargas: a) ■ $q\text{O}_2$ y b) ● k	98

Nomenclatura

ACP	Proteína Acil Transportadora
ADA	Alimentación Dinámica Aerobia
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
ANOVA	Análisis de Varianza
AR	Agua Residual
ATP	Adenosín trifosfato
C _{AGV}	Carbono de AGV
C _{HA}	Carbono de ácido acético
COT	Carbono Orgánico Total
C/N	Carbono/Nitrógeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DQOs	Demanda Química de Oxígeno Soluble
DQOt	Demanda Química de Oxígeno Total
FID	Detector de Ionización de Flama
FORSU	Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos
FTIR	Espectrofotometría Infrarroja con Transformada de Fourier
HA	Ácido Acético
HP	Ácido Propiónico
HB	Ácido Butírico
HV	Ácido Valérico
<i>k</i>	Constante de consumo de primer orden
NH ₄ ⁺	Amonio
OD	Oxígeno Disuelto
PA	Poliamida
PAO	Organismos Acumuladores de Polifosfato
PBAT	Adipato-tereftalato de polibutileno
PBS	Polibutileno succinato
PE	Biopolietileno teraftalato
PHA	Polihidroxicanoatos

PHB	Polihidroxibutirato o Poli-3-Hidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato
PLA	Ácido poliláctico
PO_4^{3-}	Ión Fosfato Inorgánico
PP	Biopolipropileno
PTT	Tereftalato de politrimetileno
q_s PHB	Tasa Especifica de Acumulación de Polihidroxibutirato
SBR	Reactor de Lote Secuencial
SSVLM	Sólidos Suspendidos Volátiles en el licor de mezcla
TCA	Ciclo de los ácidos Tricarboxílicos o Ciclo de Krebs
TRC	Tiempo de Retención Celular
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
Y_p/s	Coeficiente de Rendimiento Producto/substrato
Y_x/s	Coeficiente de Rendimiento Biomasa/substrato

1. Introducción

Actualmente, la producción de plásticos derivados del petróleo o petroplásticos ha aumentado drásticamente debido a su uso intensivo en la vida diaria, con la desventaja de su acumulación en los ecosistemas por largos periodos debido a su lenta degradación. Por esta razón, se han buscado materiales con propiedades similares pero que sean más amigables con el medio ambiente, siendo los bioplásticos una posible solución (Chamas et al., 2020; Thakur et al., 2018; Segura et al., 2007).

Los bioplásticos son materiales plásticos producidos a partir de fuentes de biomasa renovables que hoy en día han generado un creciente interés. Entre estos se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales son sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía, tienen propiedades similares a las de los petroplásticos y son completamente biodegradables, convirtiéndolos en un atractivo sustituyente (Kaur et al., 2017; Vert et al., 2012b).

A pesar de las ventajas que tienen los PHA, la principal limitante que presentan son los costos de producción, los cuales pueden ser reducidos empleando cultivos mixtos y fuentes residuales como sustrato. Generalmente, el proceso de producción de PHA a partir de cultivos mixtos y residuos como fuente de carbono requiere una etapa de prefermentación que tiene como objetivo generar ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son los precursores inmediatos para la síntesis de estos biopolímeros.

En este sentido, algunos de los residuos que han demostrado contener estos AGV, sin necesidad de aplicar la etapa antes mencionada, son los lixiviados de composteo de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU), los cuales se caracterizan por ser altamente contaminantes. De esta manera, darle un valor agregado a este residuo al usarlo como sustrato para la producción de PHA es una alternativa muy prometedora (Sabapathy et al., 2020; Koller, 2018; Kaur et al., 2017; Castilla-Hernández et al., 2016; Lemos et al., 2006).

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar la producción de PHA a partir de los lixiviados de composteo de la FORSU utilizando cultivos mixtos microbianos en un reactor de lote secuencial (SBR) a escala laboratorio.

La tesis se dividió en tres fases: la primera consistió en la obtención de biomasa acumuladora de PHA con la estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADA) en un SBR usando lixiviados como sustrato. En la segunda fase se realizaron ensayos cinéticos en el sistema SBR, con la misma configuración operacional usada en la primera fase, para evaluar el efecto de la relación C/N en la capacidad de acumulación de PHA de un cultivo mixto enriquecido. Finalmente, la última fase consistió en evaluar el efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA en cultivos mixtos no enriquecidos.

El documento de esta tesis doctoral fue organizado de la siguiente manera: en el capítulo 2 se presenta el marco teórico, donde se abordan los fundamentos teóricos que dan sustento a esta tesis, mientras que el tercer capítulo recopila los antecedentes bibliográficos que llevaron a la realización de esta tesis. En el capítulo 4 se aborda la justificación sustentando la realización de la tesis, así como la hipótesis planteada y objetivos por cumplir en este trabajo. En el quinto capítulo se muestran los experimentos, técnicas analíticas y equipos empleados. En el sexto capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos. En el séptimo capítulo se muestran las conclusiones y recomendaciones obtenidas a partir del presente trabajo experimental. Finalmente, en el octavo capítulo se enlistan las referencias consultadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.

2. Marco teórico

2.1 Problemática de los petroplásticos

Los petroplásticos son materiales constituidos por polímeros orgánicos de alto peso molecular sintetizados a partir de derivados del petróleo, que tienen la propiedad de ser maleables y, por tanto, pueden ser moldeados en objetos sólidos de diversas formas, lo cual les confiere una amplia variedad de aplicaciones. Los más utilizados son polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET) y poliuretano (PU) (Chamas et al., 2020).

Durante el último siglo, el uso de los petroplásticos, ha aumentado de manera exponencial, convirtiéndolos en materiales esenciales en actividades domésticas e industriales, principalmente en las industrias farmacéutica y alimenticia, en donde se utilizan como reemplazo de empaques de vidrio y papel debido a sus propiedades mecánicas y bajo costo (Rodríguez-Perez et al., 2018; Thakur et al., 2018; Lemos y Mina, 2015).

La producción mundial de materiales plásticos alcanzó los 299 millones de toneladas en el año 2013, de las cuales el 98% fueron sintetizados a partir de combustibles fósiles, mientras que para el año 2017, la cifra ascendió a 348 millones de toneladas y se estima que para el año 2050 su producción se cuadriplique (Qureshi et al., 2020).

Estos materiales se acumulan en el ambiente por largos periodos debido a su estabilidad estructural, por lo que su potencial contaminante es enorme. Se ha estimado que aproximadamente 6,300 millones de toneladas de plástico se convirtieron en desecho en el 2015. De la producción total de plásticos, sólo una pequeña fracción de alrededor del 9% fue reciclado y 12% incinerado; mientras que el resto, alrededor de 5,000 millones de toneladas, se ha acumulado en vertederos o se han desechado al medio ambiente. Si las tendencias actuales de producción y gestión de desechos continúan, para el 2050 tanto en el medio ambiente como en los rellenos sanitarios se encontrarán aproximadamente 12,000 millones de toneladas de desechos plásticos (Geyer et al., 2017).

La degradación de los materiales plásticos puede tardar periodos de tiempo de cientos de años bajo condiciones normales de intemperización, debido a que los procesos de degradación principalmente por foto-oxidación (fotodegradación oxidativa), es decir, la acción combinada de oxígeno y radiación UV en la superficie del material son muy lentos. Adicionalmente, la degradación es incompleta, ya que sólo se produce la ruptura de algunas cadenas del polímero por escisión química, que finalmente deriva en la fragilización del material haciéndolo quebradizo y por ruptura mecánica, produce partículas finas conocidas actualmente como microplásticos (< 5 mm) y nanoplasticos (1 a 100 nm). Estas partículas se acumulan en los ecosistemas provocando impactos negativos severos en la biota (Chamas et al., 2020; Silva et al., 2018; Segura et al., 2007).

Recientemente, nueve diferentes petroplásticos con tamaños de partícula entre 50 y 500 µm hechos principalmente de PP y PET, fueron identificados en el intestino humano de donde se cree que pueden ser llevados al sistema circulatorio, linfático y a varios órganos (Pollack, 2018). REF: [https://derstandard.at/2000089947285/Frage-und-Antwort-Wie-Mikroplastik-in-den-Organismus-gelangt] Accedido el 22/09/2021.

La problemática generada por la producción, uso en diferentes aplicaciones comerciales y subsecuente acumulación de residuos plásticos ha motivado distintas investigaciones con el objeto de sustituir estos materiales por otros con propiedades similares, pero que sean más amigables con el medio ambiente, siendo los bioplásticos la alternativa más prometedora (Bakar y Othman, 2019).

2.2 Bioplásticos

La IUPAC los define como “*Polímeros de base biológica derivados de biomasa o producidos a partir de monómeros derivados de biomasa los cuales, en alguna etapa de su procesamiento pueden ser moldeados para transformarlos a productos terminados*” (Vert et al., 2012a).

Son materiales plásticos producidos a partir de fuentes de biomasa renovables, como aceites y grasas vegetales, derivados de azúcares como almidón y celulosa, ácido láctico, paja, virutas de madera y aserrín, desechos de alimentos reciclados, entre otros, mediante el uso de microorganismos. Los bioplásticos son producidos a partir de fuentes orgánicas y/o biodegradables, sin embargo, no todos son biodegradables como es el caso del bio polietilentereftalato (PET), la poliamida (PA) o el adipato-tereftalato de polibutileno (PBAT), el Propileno de origen biológico (PP) entre otros (*European Bioplastics and Nova-Institute*, 2020; Changwichan et al., 2018; Chakravarty et al., 2010).

Entre los bioplásticos más comercializados se encuentran los producidos a partir del ácido poliláctico (PLA), las policaprolactonas (PCL) y los polialquilensuccinatos, cuya principal característica es que son completamente biodegradables. Recientemente los bioplásticos que han generado interés son los polihidroxicanoatos (PHA) (Kaur et al., 2017; Nampoothiri et al., 2010).

Los PHA componen una familia de más de 150 polímeros y co-polímeros y pueden ser sintetizados por microorganismos y plantas (Kaur et al., 2017; Lu et al., 2009). Dentro de esta familia se encuentra el Poli(3-hidroxibutirato) (P3HB), comúnmente conocido sólo como polihidroxibutirato o PHB (Mannina et al., 2020; Anjum et al., 2016).

De acuerdo a los datos de la “European Plastics” en el año 2020 la producción global de bioplásticos fue de 2.05 millones de toneladas con el pronóstico de que alcance 2.87 millones de toneladas para el 2025. En la Figura 2.1 se muestra la producción global de distintos bioplásticos en el 2020 (*European Bioplastics and Nova-Institute*, 2020).

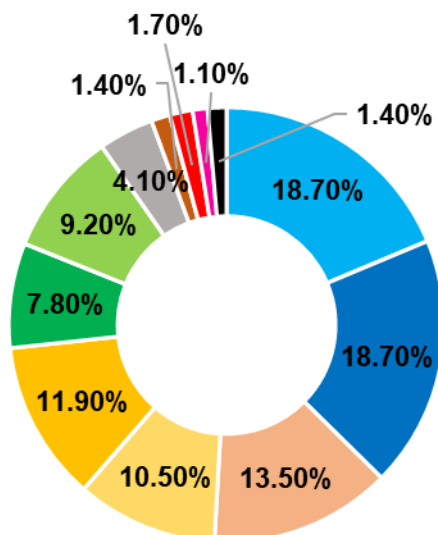


Figura 2.1 Capacidad global de producción de bioplásticos (gráfica elaborada a partir de los datos de la *European Bioplastics and Nova-Institute*, 2020).

Biodegradables	No biodegradables
PBAT : Adipato-tereftalato de polibutileno.	PE : Biopolietileno.
PBS : Polibutilen-succinato.	PA : Poliamida.
PHA : Polihidroxialcanoatos.	PET : Biopolietileno tereftalato.
PLA : Ácido poliláctico.	PTT : Tereftalato de politrimetileno.
Almidón	PP : Biopolipropileno.
Otros	Otros

En la Figura 2.1 se observa que los PHA representan únicamente el 1.7% con respecto al total de la producción de bioplásticos. Sin embargo, debido a sus características termoplásticas similares a las de algunos petroplásticos y a su potencial para sustituirlos, han despertado un creciente interés en el desarrollo de tecnología para su elaboración y comercialización.

2.3 Polihidroxiclcanoatos (PHA)

2.3.1 Definición, características, clasificación, propiedades y usos

Son biopolíesteres sintetizados intracelularmente y almacenados en el citoplasma en forma de gránulos conocidos como carbonosomas por algunos microorganismos tales como procariontes, arqueas y cianobacterias (Gatea et al., 2019; Albuquerque y Malafaia, 2018; Kaur et al., 2017). Estos gránulos son visibles directamente en microscopio óptico, como grandes inclusiones citoplasmáticas (Figura 2.2).



Figura 2.2 Inclusiones de PHA (*Tipos de Bioplásticos:Os Polihidroxiclcanoatos (PHA's) ~ Bioplastic News*).

Los PHA son polímeros de hidroxilácidos, en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Figura 2.3). Cuando un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) se une como radical R, da como resultado el PHB, si el grupo R es un grupo etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$), el polímero será el polihidroxiclvalerato (PHV), siendo estos dos más frecuentemente encontrados (Mozejko-Ciesielska et al., 2019; Kaur et al., 2017; Almeida et al., 2004).

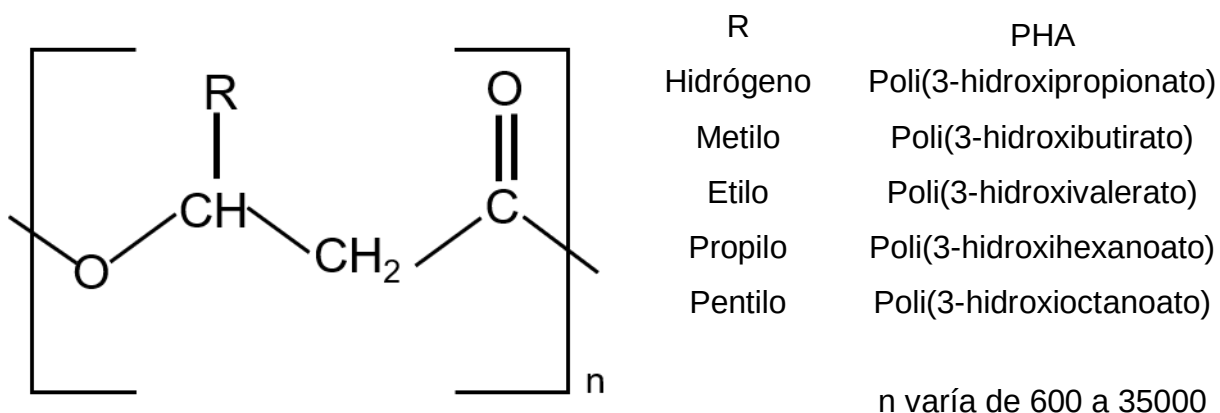


Figura 2.3 Estructura polimérica general de los PHA (adaptada de Kaur et al., 2017).

El tipo de PHA, así como sus características, dependen de los microorganismos que los producen, las condiciones de crecimiento, el hidroxiaácido utilizado por el microorganismo y el sustituyente del radical R. Su peso molecular varía en un intervalo amplio de 2×10^5 a 6×10^3 Da (Anjum et al., 2016; Madigan et al., 2014; Ortiz, 2009). Otras características generales de los PHA son (Bugnicourt et al., 2014):

- Nula solubilidad en agua
- Relativa resistencia a la degradación hidrolítica
- Buena resistencia a la luz ultravioleta
- Pobre resistencia a ácidos y bases
- Solubilidad en solventes no polares como cloroformo y otros hidrocarburos clorados
- Biocompatibles
- Menor densidad que el agua
- Nula toxicidad

Los PHA se clasifican de acuerdo con el número de carbonos de sus monómeros (Cardona et al., 2013; Sánchez et al., 2012; Kunasundari y Sudesh, 2011; Lu et al., 2009):

1) Cadena corta: Generalmente presentan propiedades termoplásticas, son conformados por monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, como el poli(3-

hidroxivalerato) (PHV) y el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), siendo este último formado por unidades de ácido β -hidroxibutírico.

2) Cadena media: Usualmente tienen propiedades elastómeras, están constituidos por monómeros de 6 a 14 carbonos, entre los cuales están el poli(3-hidroxihexanoato), poli(3-hidroxi octanoato) y el poli(3-hidroxidecanoato). También están los co-polímeros y de cadena mixta, los cuales combinan 2 tipos de homopolímero o bien, se combinan de cadena corta y media, por ejemplo, el poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-3-hidroxihexanoato) (P3HB-co-3HV-co-3HHx).

3) Cadena larga. Son los menos estudiados, consisten en monómeros con más de 14 átomos de carbono.

Entre las diversas unidades monoméricas que se pueden encontrar en los PHA están los 3-hidroxiácidos saturados, insaturados, ramificados y con cadenas laterales sustituidas (Lu et al., 2009).

Dependiendo del número de carbonos, los PHA presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad, propiedades clave para sus aplicaciones en diferentes campos. Los más utilizados industrialmente son los de cadena corta, como el PHB, el cual presenta propiedades físicas similares a la de los plásticos derivados del petróleo como el polipropileno (PP) (Lemos y Mina, 2015). La Tabla 2.1 muestra una comparación entre ambos polímeros.

Tabla 2.1 Comparación de las propiedades físicas del PHB y PP (tomado de Lemos y Mina, 2015).

Parámetro	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50 – 70
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

La aplicación más conocida de los PHA de cadena corta es la fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas, envases, además de otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos, cubiertos y productos de un solo uso. También es posible usarlos para cubiertas de materiales como papel o cartón ya que, debido a su resistencia al agua, protegen al papel o cartón contra el deterioro causado por la humedad (González et al., 2013; Cerrone, 2011).

Otra aplicación es en la agricultura, con la ventaja de que el polímero no requiere un grado de purificación muy alto (Lemos y Mina, 2015).

También pueden ser usados para la fabricación de juguetes, electrónicos, herramientas y autopartes, así como en la industria farmacéutica en la fabricación de implantes, suturas, sustitutos pericárdicos. Además, se ha propuesto usarlos para fabricar jeringas desechables y lubricantes para guantes de cirugía (J. Zhang et al., 2018; González et al., 2013).

Debido al inmenso campo de aplicaciones que presentan estos materiales, diversos países han decidido introducirlos en su vida diaria. En la Tabla 2.2 se muestran los principales productores a escala industrial de PHA en el mundo.

Tabla 2.2 Empresas productoras de PHA, sustratos utilizados, tipo de polímero y nombre comercial.

Compañía	País	Materia Prima	PHA	Nombre comercial
Tian-An	China	Dextrosa derivada de maíz o yuca	P(3HB-co-3HV)	ENMAT
Telles	Estados Unidos	Azúcar	PHA	Mirel
Kaneka	Japón	Aceites vegetales	P(3HB-3HHx) y PHBH	Green Planet
PHB Industrial	Brasil	Caña de azúcar	P(3HB) y P(3HB-co-3HV)	Biocycle
Biomer Biopolyesters	Alemania	Sacarosa	P(3HB)	Biomer
Danimer Scientific	Estados Unidos	Aceites de canola y soya	PHA	Danimer
Tepha	Estados Unidos	No reportado	No reportado	TephaFLEX
Beijing Tianzhu Biomaterials	China	No reportado	P(3HB-co-HHx)	P(3HB-co-HHx)
Bio-on	Italia	Azúcar	PHA	MINERV- PHA
Mango Materials	Estados Unidos	Metano	P(3HB)	YOOP

A pesar de las ventajas que ofrecen, una de sus limitantes es su elevado costo de producción en comparación con los petroplásticos, ya que dependiendo de la composición del polímero, su costo se encuentra entre 2.2 y 5.0 €/kg, lo que es

aproximadamente tres veces más alto que el de polímeros a base de petróleo, cuyo valor de producción es menor a 1.0 €/kg (Sabapathy et al., 2020).

Por lo cual, la búsqueda para disminuir los costos de producción ha dado lugar a intensas investigaciones y desarrollos tecnológicos para utilizar sustratos más baratos tales como aguas residuales o residuos agroindustriales, dándole así un valor agregado al carbono orgánico que contienen estos residuos.

Existen empresas que han iniciado desarrollos tecnológicos para producir PHA a partir de desechos. Tal es el caso de Veolia Environment SA, una empresa francesa que ha desarrollado tecnología para su producción a partir de aguas residuales municipales (Bengtsson et al., 2017). Y el caso de la empresa americana Micromidas que inició su desarrollo tecnológico en 2015, utilizando lodos de desecho (*Micromidas to Test Sludge-to-Plastic Tech - CNET*).

2.3.2 Síntesis de PHA

Los diferentes microorganismos capaces de sintetizar y acumular PHA utilizarán diversas rutas metabólicas dependiendo de la fuente de sustrato. Existen tres grandes rutas metabólicas con diferente grado de interconexión (Adeleye et al., 2020; Zhang et al., 2020):

- A partir de azúcares.
- β -oxidación de ácidos grasos.
- Biosíntesis *de novo* a partir de ácidos grasos.

Síntesis a partir de azúcares: En esta vía los azúcares, ácidos grasos volátiles (AGV) o aminoácidos son convertidos sucesivamente por las enzimas cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa hasta hidroxibutiril-CoA, que será polimerizada a PHB el cual es un polímero de cadena corta por la PHA sintetasa.

β -oxidación de ácidos grasos: En esta vía se sintetizan PHA de cadena media utilizando intermediarios de la β -oxidación tales como los AGV, los cuales son

convertidos a enoil-CoA que es transformado por la hidroxiaxil-CoA hidratasa a hidroxiaxil-CoA, precursor de los PHA de cadena media. Finalmente, la polimerización es llevada a cabo por la PHA sintetasa.

Biosíntesis de novo a partir de ácidos grasos: esta ruta abarca el ciclo de síntesis de los ácidos grasos, que proporciona la R-3-hidroxiaxil-ACP (proteína acil transportadora) para la síntesis de PHA de cadena media. La enzima clave es la 3-hidroxiaxil-acil proteína CoA transferasa, que transforma la R-3-hidroxiaxil-ACP a R-3-hidroxiaxil-CoA para la síntesis de PHA.

Estas tres vías metabólicas se encuentran en el anexo 1.

Una de las rutas mejor conocidas para la producción de PHB es la usada por *Cupravidus necator* (antes *Ralstonia eutropha*) donde la acetil-CoA es el principal intermediario, ya que ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs para la síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa, en presencia de un exceso de fuente de carbono y por lo tanto de acetil-CoA, ingresa a la vía de síntesis de PHB.

La síntesis de PHB inicia con la activación del acetato a acetil-CoA empleando un ATP proveniente de la incorporación de fosforo inorgánico al ADP. Posteriormente, serán necesarias dos moléculas de acetil-CoA que por acción de la enzima β -cetotilasa, se condensarán para formar acetoacetilcoenzima-A. Este producto es reducido a (R)-3-hidroxibutiril-CoA por una enzima dependiente de NADPH llamada acetoacetil-CoA reductasa y finalmente la enzima PHB sintetasa cataliza la polimerización de las unidades de (R)-3-hidroxibutiril-CoA en PHB vía esterificación (Figura 2.4) (Mannina et al., 2020; Kaur et al., 2017; Jian et al., 2010; Lemos et al., 1998).

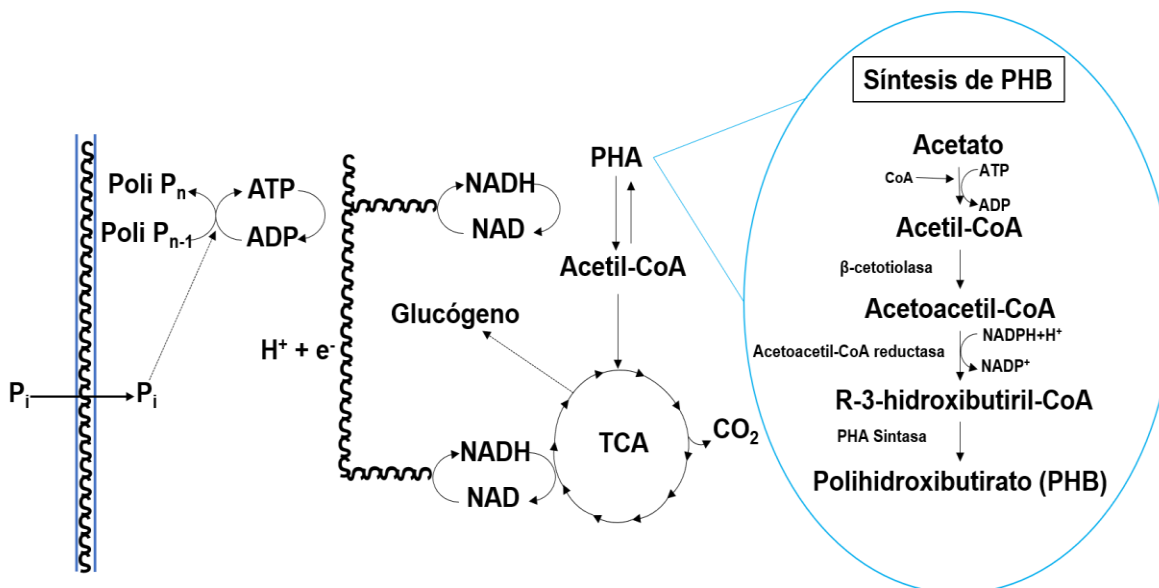


Figura 2.4. Metabolismo del Carbono y Fósforo en la respiración aerobia durante la síntesis de PHB (adaptado de Kaur et al., 2017; Lemos et al., 1998; Pereira et al., 1996).

Una vez que el PHA ha sido sintetizado se forma el carbonosoma y su principal función será como reserva de carbono, por lo cual los microorganismos también poseen un mecanismo enzimático para llevar a cabo la degradación del polímero.

2.3.3 Degradación de PHA

Los procesos de degradación son llevados a cabo a partir de la acción de enzimas específicas llamadas PHA depolimerasas, las cuales se clasifican en intracelulares y extracelulares (Roohi et al., 2018).

Cuando la fuente de carbono se ha agotado, las PHA depolimerasas intracelulares degradan los carbonosomas en sus respectivos monómeros, los cuales son transformados a acetil-CoA para utilizarlos en el ciclo de Krebs y producir energía en forma de ATP para el mantenimiento celular. Así, la degradación del PHB resulta en la liberación de ácido 3-hidroxiacético, el cual será oxidado por una

deshidrogenasa a acetoacetyl-CoA, la cual será convertida a acetyl-CoA mediante la acción de la enzima β -cetotilasa (Ong et al., 2017).

Tras la muerte celular, el carbonosoma es liberado al ambiente y degradado por acción de las depolimerasas extracelulares secretadas por otros microorganismos que no necesariamente son acumuladores de PHA (Jendrosseck, 2007).

Por ejemplo, se ha demostrado que el BIOPOL, uno de los nombres comerciales que recibió el copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) utilizado para elaborar botellas de champú, puede ser degradado por estas enzimas en el suelo (Braaz et al., 2003; Jendrosseck, 2007; Roohi et al., 2018; Ong et al., 2017).

El tiempo de degradación de los PHA difiere de acuerdo con las condiciones ambientales. Bajo condiciones anaerobias la degradación tarda hasta 42 días, siendo su principal producto el metano. Mientras que en aerobiosis, ocurre en 420 días con la subsecuente producción de CO₂ y agua (Ong et al., 2017; Shamsuddin et al., 2017; Luzier, 1992). En la Tabla 2.3 se muestran los diferentes tiempos de degradación de PHA en distintos ambientes.

Tabla 2.3 Tiempo de degradación de PHA en diferentes ambientes (tabla elaborada con datos de Emadian et al., 2017).

Ambiente	Días
Suelo	60 – 300
Composteo	28 – 110
Agua de río (condiciones naturales)	42
Agua marina (condiciones naturales)	160

2.3.4 Microorganismos acumuladores de PHA

Existe una amplia variedad de microorganismos que sintetizan PHA e incluyen bacterias, levaduras, así como algunas plantas (Suriyamongkol et al., 2007). Esta capacidad favorece su sobrevivencia bajo condiciones de estrés (Mohapatra et al., 2020).

Las bacterias acumuladoras de PHB se clasifican en dos grupos de acuerdo a las condiciones de cultivo que inducen la síntesis y acumulación de estos polímeros: 1) aquellas que requieren exceso de fuente de carbono, limitación en oxígeno o nutrientes y 2) aquellas que sintetizan los PHA durante la fase de crecimiento exponencial, por lo que no requieren de limitación de nutrientes (Kaur et al., 2017).

Entre los microorganismos reportados con la capacidad de acumular PHB se encuentran microorganismos procariontes o bacterias de los grupos pseudomanadales, corinebacteriales y bacilares que incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*, así como las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium* y *Azotobacter*.

Las cianobacterias tales como *Spirulinapla tensi*, *Synechocystis sp.*, *Synechococcus sp.* y *Nostoc muscorum* también han sido reportadas con la capacidad de acumular solamente PHB por medio de fototrofia y consumo de CO₂ y con la acción de la enzima PHA sintetasa. Adicionalmente, se han reportado bacterias metilotróficas (*Methanomonas*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*) capaces de sintetizar PHB con bajos rendimientos (Kaur et al., 2017; Lu et al., 2009).

Entre las Archaeas reportadas con capacidad de sintetizar diversos tipos de PHA se encuentran algunas cepas de Haloarchaeas como *Haloferax*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Halobiforma*, *Halorhabdus*, *Halalkalicoccus*, *Halobacterium*, *Natrianema*, *Halostagnicola*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena*, *Halopiger* y *Halococcus* (Kaur et al., 2017).

Los organismos eucariotes como las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. diastaticus*, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *Kloeckera apiculata*, *Kluyveromyces*

africans, *K. lactis*, *Rhodotorula glutinis*, *Picchia pastoris* etc.) sintetizan pequeñas cantidades de PHB que funcionan a nivel de membrana en el transporte de sustratos.

También se ha encontrado la capacidad de producir PHA en algunas plantas tales como *Solanum tuberosum* (papa), *Zea mays* (maíz), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Brassica napus* (canola), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Kaur et al., 2017; Lu et al., 2009).

Actualmente, una fuente de inóculo para la producción de PHA ha sido los cultivos microbianos mixtos que se han obtenido de sistemas aerobios de tratamiento de aguas residuales. El uso de estos cultivos se basa en la capacidad que presentan las poblaciones microbianas de prevalecer sobre otras que no tiene la capacidad de síntesis y acumulación de estos biopolímeros (Mannina et al., 2020; Kaur et al., 2017). En estos cultivos se han identificado diversos grupos de microorganismos acumuladores de PHA, los cuales han sido sintetizados a partir de diversos residuos. En la Tabla 2.4, se muestran algunos reportes, así como el residuo utilizado.

Tabla 2.4 Microorganismos reportados como productores de PHA en cultivos mixtos usando residuos como sustrato.

Microorganismo	Fuente de sustrato	Referencia
<i>Thaurea</i> , <i>Azoarcus</i> y <i>Paracoccus</i>	Melazas fermentadas	Carvalho et al., (2014); Albuquerque et al., (2013).
<i>Paracoccus</i> y <i>Amaricoccus</i>	Desechos de comida acidificados (+ propionato)	Wu et al., (2017)
<i>Delftia acidovorans</i>	Efluente del tratamiento anaerobio de lodos	Morgan-Sagastume et al., (2019).
<i>Rhodobacter</i> y <i>Paracoccus</i>	Residuos del tratamiento de la madera	Queirós et al., (2017).
<i>Corynebacterium</i> y <i>Brachymonas denitrificans</i>	Lixiviados de composteo de la FORSU	Korkakaki et al., (2016).

Como puede observarse en la Tabla 2.4, los microorganismos identificados en cultivos mixtos difieren de las cepas puras reportadas por Kaur et al., (2017) y Lu et al., (2009) exceptuando *Corynebacterium*, lo cual indica que la fuente de sustrato posiblemente influye en la población microbiana encontrada.

2.3.5 Sustratos empleados en la producción de PHA

Los sustratos empleados por empresas para la producción de PHA son compuestos puros, como azúcares, aceites, etc. (Tabla 2.2), lo cual implica un alto costo de producción.

Por este motivo el uso de diferentes residuos sólidos y líquidos, tanto agrícolas, industriales y municipales o urbanos, utilizando cultivos mixtos microbianos, representan una alternativa sustentable y competitiva para la sustitución de sustratos y cepas puras, la cual resulta en una reducción del costo de producción de los PHA hasta en 50% (Koller et al., 2017). Adicionalmente, con el uso de

residuos se obtiene la valorización del carbono orgánico contenido en ellos, lo cual transforma el proceso de tratamiento o estabilización de residuos en procesos que conllevan la recuperación del recurso como el agua, así como la obtención de productos con alto valor agregado (Mannina et al., 2020)

Sin embargo, el uso de residuos presenta limitantes para la producción de PHA ya que se caracterizan por su complejidad pues presentan compuestos orgánicos con diversas estructuras, desde algunas simples y otras más complejas, entre las cuales están: fructuosa, sacarosa, clorofenoles, lignina, hemicelulosa, proteínas, entre otros (Mannina et al., 2020). Debido a esto, son pocas las investigaciones en las que se han empleado residuos crudos en la producción de PHA, como es el caso de Liu et al., (2008), quienes usaron agua residual (AR) de enlatadora de tomate, o Queirós et al., (2017) que emplearon licores de sulfito gastados; sin embargo, el uso de residuos crudos presenta limitantes para la producción de PHA.

Generalmente, la producción de PHA a partir de AR requiere una prefermentación que comprende la hidrólisis y acidogénesis de los compuestos complejos contenidos en los desechos a utilizar y la bioconversión del carbono orgánico a ácidos grasos volátiles (AGV) (Ahmadi et al., 2020).

La acidogénesis es el proceso biológico a través del cual se producen compuestos gaseosos como hidrógeno y CO₂, además de compuestos no gaseosos como ácido láctico, alcoholes y AGV de cadena corta como ácido acético (HA), propiónico (HP), butírico (HB) y valérico (HV) (Sikora et al., 2017). Las vías metabólicas y los productos obtenidos de los diferentes compuestos contenidos en aguas complejas durante la acidogénesis pueden verse en el anexo 1.

La importancia de la prefermentación de aguas residuales complejas radica en la producción de los AGV, los cuales son los precursores inmediatos para la síntesis de PHA. En la Figura 2.5 se muestra que la composición del PHA depende del tipo de AGV utilizado como sustrato. En este sentido, el acetato y butirato tienden a formar PHB, mientras que el propionato y valerato formarán PHV (Figura 2.5) (Koller, 2018; Lemos et al., 2006).

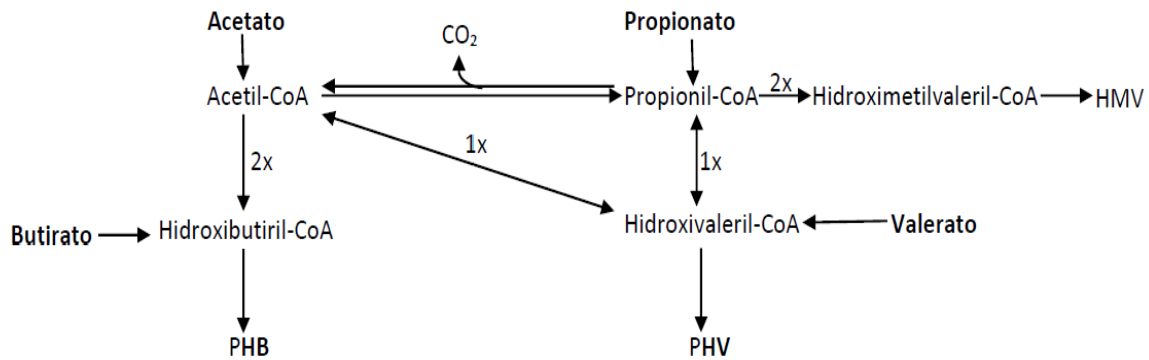


Figura 2.5. Producción de PHA a partir de AGV (tomada de Lemos et al., 2006).

En la Tabla 2.5 se enlistan distintos residuos prefermentados utilizados para la producción de PHA, los cuales han sido empleados frecuentemente como alternativa debido al contenido de AGV generados con este paso.

Tabla 2.5 Residuos prefermentados utilizados para la producción de PHA.

Tipo de Residuo	Referencia
AR de la industria del papel	Bengtsson et al. (2008a y b)
Permeado de suero de queso	Bengtsson et al. (2008b)
Melazas	Bengtsson et al. (2010)
Desechos de comida	Venkateswar y Venkata, (2012)
Licor de estiércol	Coats et al., 2016)
AR fermentada de industria cervecera	Ben et al., (2016)
Efluente de aceite de palma	Vjayan y Vadivelu (2017)
Lixiviados de la estabilización ácida de la FORSU	Colombo et al. (2017) Korkakaki et al. (2016)

Uno de los residuos con un alto potencial de producción de PHA son los lixiviados producidos a partir de la estabilización por composteo de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU) (Colombo et al., 2017; Korkakaki et al.,

2016; Sánchez, 2016). Estos se producen durante el proceso de degradación de los residuos y presentan altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta que, como ya se explicó, pueden ser utilizados como sustrato en la producción de PHA (Colombo et al., 2017; Korkakaki et al., 2016).

- Lixiviados de composteo de la FORSU

El composteo es una manera eficiente de manejar los residuos sólidos orgánicos ya que reduce el volumen y peso del residuo inicial en un 50%. Sin embargo, durante el proceso se generan altos volúmenes de lixiviados, los cuales se producen durante la estabilización de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) (residuos de alimentos, poda, papel, etc.). Durante la estabilización tiene lugar la lisis celular liberando los contenidos citoplasmáticos, los cuales se hidrolizan y fermentan dando lugar a la formación de estos efluentes, que contienen considerables cantidades de AGV, amonio, fósforo, metales en concentraciones traza, así como un color característico café claro a café oscuro (Roy et al., 2018).

El contenido de materia orgánica varía dependiendo de la época del año y del clima, del tipo de residuo estabilizado y de las condiciones de operación de las plantas de estabilización. Castilla-Hernández et al., (2016) y Sanchez, (2016) han reportado lixiviados con contenidos entre 70 a 120 g DQO/L, donde más del 80% es materia orgánica soluble.

La característica más importante que hace que los lixiviados de composteo sean un sustrato potencial para la producción de PHA, es su contenido de AGV de cadena corta. Esto representa una ventaja ya que permite prescindir de la etapa de prefermentación que requieren otros efluentes. El contenido reportado varía de 16 a 25 g AGV/L y corresponden a HA, HP, HB y HV, siendo el primero predominante de 38 hasta 71%. Además, el contenido de AGV (en base DQO) representa de 16 hasta 59% con respecto a la materia orgánica soluble (Castilla-Hernández et al., 2016; Sanchez, 2016).

El contenido de AGV en los lixiviados de composteo de la FORSU, permite considerarlos como un sustrato ideal para la producción de PHA, debido a que son los intermediarios principales para la síntesis de estos biopolímeros (Figura 2.5), siendo el HA el más empleado por diversos autores (Koch et al., 2020; Narancic et al., 2016; Tsuda et al., 2016; Ciesielski y Przybylek, 2014; Pandolfi et al., 2007; Serafim et al., 2004). Otro AGV de importancia detectado en los lixiviados, es el HB el cual tiene menor gasto energético en comparación con el HA, debido a que el NADH generado en su conversión a PHB, generará el ATP necesario para su polimerización a PHB (Marang et al., 2013).

Otro de los compuestos que contienen los lixiviados es el amonio (NH_4^+), el cual se encuentra en concentraciones de 0.65 hasta 2.17 g/L (Castilla-Hernández et al., 2016; Sanchez, 2016). La presencia de nitrógeno en los lixiviados brinda una ventaja metabólica a los microorganismos, ya que requieren de este nutriente durante el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA (Johnson et al., 2010).

Uno de los parámetros que puede afectar la producción de PHA es la relación C/N. Los lixiviados presentan relaciones C/N altas que van de 12 hasta 44 (Castilla-Hernández et al., 2016). Esta relación es similar a la reportada por Serafim et al. (2004), quienes usaron un medio sintético y acetato en una relación C/N de 37, para evitar la producción de biomasa y desviar el consumo del carbono a acumulación de PHB.

Otro nutriente de interés que contienen los lixiviados es el fósforo, encontrándose en concentraciones de 0.32 a 193 mg/L (Mokhtarani et al., 2012; Rajabi y Vafajoo, 2012), el cual al igual que el nitrógeno es esencial para la síntesis de ATP dentro de la ruta de síntesis de PHA como se mencionó anteriormente.

2.3.6 Proceso de producción de PHA a partir de aguas residuales

La producción de PHA generalmente se ha llevado a cabo en reactores de lote alimentado o continuos usando cepas puras, las cuales requieren condiciones estériles para su cultivo y el empleo de medios sintéticos donde la fuente de carbono

son azúcares, alcoholes o AGV entre otros, elevando los costos de producción. Una opción para reducir estos costos es el uso de cultivos mixtos, como los lodos activados, los cuales permiten trabajar en condiciones no estériles y la utilización de AR que contienen AGV como fuente de sustrato, haciendo de este método la alternativa más viable para la síntesis de estos biopolímeros.

La estrategia usada para la producción de PHA a partir de AR y cultivos mixtos generalmente requiere 3 etapas:

1. Prefermentación del sustrato para la producción de AGV.
2. Enriquecimiento del cultivo con microorganismos acumuladores de PHA.
3. Producción de PHA.

Durante la primera etapa el residuo se somete a una prefermentación o acidogénesis en la cual se producen los AGV, los cuales como ya se mencionó, son los precursores inmediatos para la síntesis de PHA.

Albuquerque et al., (2007) llevó a cabo la prefermentación de melazas. El proceso fue llevado a cabo en un reactor de tanque agitado continuo, el cual fue inoculado con lodos anaerobios, pH de 7, tiempo de retención hidráulico (TRH) de 10 horas, agitación de 400 rpm y temperatura de 30 °C. El efluente fermentado, contenía HA como AGV predominante con un 56%, los demás AGV en orden descendente fueron HP 18%, HB 13% y HV 4%.

Bengtsson et al., (2008a) usó la misma configuración en el reactor para prefermentar AR de la industria del papel, con ligeras modificaciones, pH 6 y un TRH de 14 horas, los AGV obtenidos de la prefermentación fueron HA, HP, HB y HV (72:14:4:10).

Bengtsson et al., (2008b) también probaron fermentar distintos tipos de AR, con los siguientes parámetros en el reactor: Temperatura controlada a 27 °C, agitación con barras magnéticas y como inóculo utilizaron lodos anaerobios, con estas condiciones las AR obtuvieron las siguientes especies de AGV después de la prefermentación:

- Permeado de suero de queso de la producción de cubiertas de cartón que contenía HA, HP y HB (43:15:42)
- AR blanca derivada de una papelera que produce cartón: HA, HP y HB (9:6:78)
- Efluente combinado pulpa de madera y fibras recicladas: HA y HB (96:4)
- Efluente de molino de pulpa obtenido quimiotermomecánicamente: HA, HP, HB y otros (40:24:35:1)

2. El enriquecimiento es la más importante de las tres etapas. El cultivo mixto es sometido a condiciones que favorecen la proliferación de aquellos microorganismos con la capacidad de acumular PHA, de tal manera que la población dominante en el cultivo almacene este biopolímero.

La estrategia más usada para este fin es la alimentación dinámica aerobia (ADA) propuesta por Serafim et al., (2004), la cual consiste en adicionar un pulso de alimentación en un corto periodo de tiempo con aireación al inicio del proceso, lo que proveerá un exceso de fuente de carbono al cultivo, creando una etapa de “saciedad” donde iniciará la síntesis de PHA, la formación de los carbonosomas y la acumulación intracelular. El cultivo consumirá el carbono rápidamente hasta agotarlo y dejará de consumir oxígeno, lo cual se conoce como la etapa de “ayuno”. En esta etapa el cultivo iniciará la degradación de los carbonosomas y consumirá la fuente de carbono almacenada para mantenimiento celular. Esta estrategia ha mostrado buenos resultados para seleccionar cultivos mixtos enriquecidos en microorganismos acumuladores de PHA (Kaur et al., 2017).

El periodo de disponibilidad de sustrato es llamado saciedad y durante esta etapa, la fuente de carbono es consumida y bioconvertida a PHA, el cual se acumulará en la célula. Cuando el sustrato se agota, inicia la fase denominada ayuno donde el PHA previamente almacenado es empleado como reserva de carbono y energía; si la etapa de saciedad tiene una duración menor en comparación a la de ayuno, favorecerá la proliferación de microorganismos con la capacidad de acumulación de PHA sobre aquellos que no debido a que no pueden sobrevivir periodos

prolongados de ayuno, el oxígeno disuelto (OD) ha demostrado ser un parámetro que indica la duración de ambas etapas así como el cambio entre las mismas.

La Figura 2.6 ilustra el régimen de saciedad/ayuno. Se puede observar la relación entre el consumo de carbono y el OD, este último es utilizado en la etapa de saciedad como aceptor de electrones para la oxidación de la materia orgánica que está siendo consumida, por lo cual su concentración disminuye. Al iniciar la etapa de ayuno, la concentración de OD aumenta debido a la ausencia de sustrato, sirviendo como una señal inmediata del cambio entre fases además de la ausencia de la fuente de carbono. Por este motivo, el OD se utiliza como señal en la etapa final de la producción de PHA (DIAZ 2018).

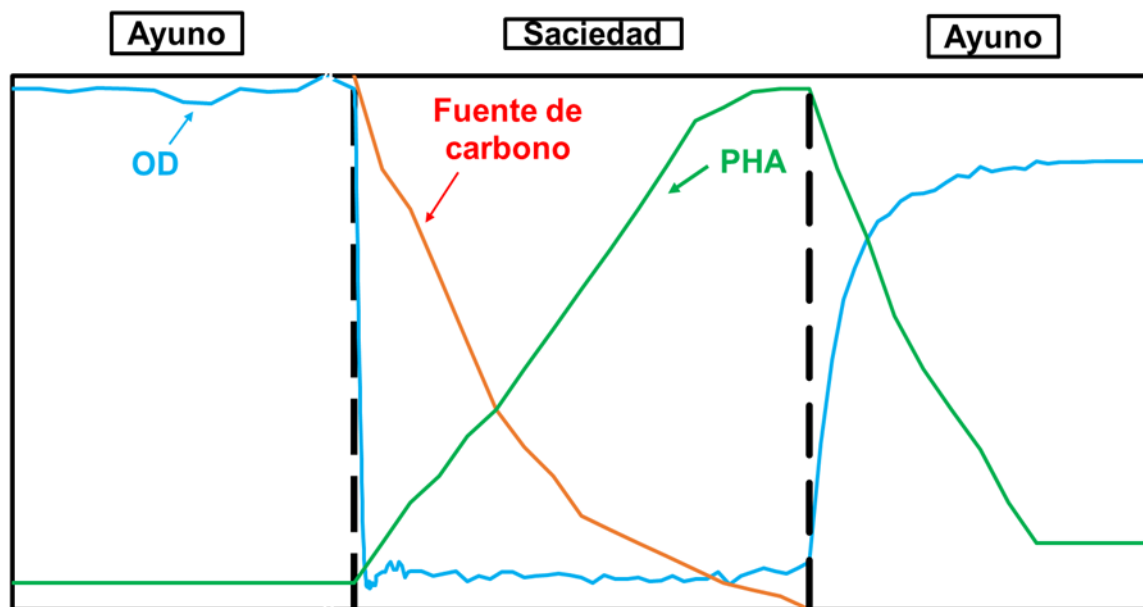


Figura 2.6 Régimen de saciedad/ayuno.

La acumulación se debe a los periodos de ayuno previos a los periodos de saciedad, lo cual favorecerá la síntesis de PHA, ya que la PHA sintetasa necesaria para la polimerización, se encuentra activa durante la síntesis y degradación debido a los pulsos de fuente de carbono. Por lo que la vía de síntesis será regulada por el carbono disponible y el PHA presente, mientras que los periodos de ayuno ocasionarán que disminuya la concentración de ARN y por ende de las enzimas necesarias para el crecimiento (Kourmentza et al., 2017). Esto a su vez promoverá

la prevalencia de los microorganismos acumuladores de PHA y limitará el crecimiento de aquellos que no tienen esta capacidad.

Fisiológicamente, hay distintos tipos de factores que afectan a los microorganismos acumuladores de PHA. Uno de ellos es el estrés causado por limitación de fuente de carbono, o nutrientes como nitrógeno, fósforo u oxígeno. Una posible explicación de la acumulación de PHA en condiciones de limitación de nutrientes puede atribuirse a la inhibición de la enzima β -cetotiolasa por exceso de CoA (Kaur et al., 2017).

En la limitación por oxígeno, al carecer del aceptor final de electrones, la relación $\text{NADH}/\text{NADH}^+$ se incrementa, lo que resulta en que muchas moléculas de acetil-CoA no entren al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, disminuyendo la concentración de CoA, resultando en que la enzima β -cetotiolasa no es inhibida y las moléculas de acetil-CoA se usen para la producción de PHA (Kaur et al., 2017).

También, la limitación de nitrógeno o fósforo resulta en una reducción de actividad de las vías anabólicas, conduciendo a un exceso de ATP que provocará la acumulación de la acetil-CoA y, con ello, la acumulación de PHA de una manera similar a la limitación de oxígeno (Kaur et al., 2017).

Los reactores de lotes secuenciales (SBR) han demostrado ser los ideales para llevar a cabo con éxito la ADA y la aclimatación o enriquecimiento, debido a que en estos reactores se pueden llevar a cabo secuencias de distintas etapas: llenado, reacción, sedimentación y vaciado, en un solo reactor de forma automatizada. Otras de sus ventajas son la operación con variaciones de carga orgánica, la eliminación de materia orgánica y nutrientes (N y P) y la posibilidad de alternar fases anaerobias/aerobias (Santos et al., 2003).

Serafim et al., (2004) usaron un cultivo mixto con alta capacidad de remoción de fósforo, para operar un SBR aplicando la ADA, como única fuente de carbono se utilizó acetato. Cada ciclo tenía una duración de 12 horas, con un periodo de adición de sustrato de 15 minutos, el TRH fue de 1 día y un tiempo de retención celular (TRC) equivalente a 10 días. El SBR operó bajo condiciones totalmente aerobias

con alrededor del 80% de saturación de oxígeno, sin control de pH, agitación fue de 250 rpm y 22 °C. Bajo estas condiciones de operación fue posible enriquecer la biomasa con microorganismos acumuladores de PHA.

Durante el enriquecimiento los nutrientes son esenciales por dos razones, la primera es enriquecer un cultivo mixto con microorganismos con alta capacidad de producir PHA; y la segunda, para mantener un alto crecimiento de biomasa celular del cultivo enriquecido para la etapa posterior y de esta forma, aumentar la producción de PHA.

3. Finalmente, para la producción de PHA, el cultivo enriquecido con microorganismos acumuladores de PHA de la segunda etapa, es alimentado con el sustrato con alto contenido de AGV producido durante la prefermentación, generalmente este proceso es llevado a cabo en reactores de lote alimentado con parámetros operacionales similares a los del enriquecimiento.

Con la finalidad de lograr la máxima producción de PHA, se adicionan pulsos de sustrato independientes entre sí, como ya se mencionó el OD disuelto provee una señal inmediata del consumo de la fuente de carbono indicando la ausencia del mismo, lo cual permitirá saber el momento en que se agote el sustrato de un pulso y la adición del siguiente, normalmente se usan sistemas automáticos que detecten el cambio de OD fijando una concentración, lo cual hará que el nuevo pulso sea adicionado, el procedimiento se repetirá con el objetivo de llevar a las células a una etapa de saciedad prolongada, acumulando más de este biopolímero con cada pulso agregado (Argiz et al., 2020; Lorini et al., 2020; Munir y Jamil, 2018; Kaur et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Wang et al., 2017; Moralejo-Gárate et al., 2014).

3. Antecedentes directos

Serafim et al., (2004) fueron los primeros en someter un cultivo mixto a condiciones de alimentación dinámica aerobia en un reactor SBR y, durante dos años de operación, consiguieron seleccionar biomasa microbiana con una alta capacidad de acumulación de PHA. Estos autores también encontraron que bajas concentraciones de amonio, así como la alimentación en pulsos favorecen la acumulación de PHA. Así mismo, demostraron que es posible producir PHA a partir de cultivos mixtos, abriendo toda una nueva línea de investigación en este campo.

Liu et al., (2008) produjeron PHA a partir de las aguas residuales de una enlatadora de tomate y un cultivo mixto, en un proceso de dos fases constituido por un reactor SBR operado bajo el régimen de saciedad y ayuno, seguido de un reactor batch para producción de biomasa acumuladora de PHA, consiguiendo un máximo de 20% de PHA en el contenido celular. Así, se demostró que es posible producir PHA con cultivos mixtos utilizando residuos sin prefermentación, por lo que es posible reducir ostensiblemente sus costos de producción.

Sin embargo, el uso de efluentes sin prefermentación durante el enriquecimiento de la biomasa acumuladora no es muy utilizado, siendo más común el uso de fuentes de desecho prefermentadas, como por ejemplo Bengtsson et al., (2008a) quienes obtuvieron un contenido máximo de PHA del 48% de PHA con respecto al peso celular seco, usando AR prefermentada de la industria del papel como sustrato en un sistema consecutivo de reactores conformado por un reactor acidogénico, un reactor SBR operado en condiciones de saciedad/ayuno y un reactor batch para la acumulación de PHA. Estos autores encontraron que después de la prefermentación, el 74% de la DQO soluble estaba presente como AGV, demostrando que la fermentación favorece la acumulación de PHA.

Por su parte, Albuquerque et al., (2010) evaluaron la influencia de la concentración de sustrato en la selección del cultivo, utilizando como sustrato melazas prefermentadas. A 30 y 45 mmol AGV/L, se encontró un efecto limitante en la cinética del proceso asociado con una deficiencia de sustrato. Sin embargo, el aumento adicional a 60 mmol AGV/L dio como resultado un efecto de limitación del

crecimiento imprevisto asociado con una deficiencia de micronutrientes (magnesio) en el sustrato prefermentado y a un pH alto. El cultivo seleccionado con 45 mmol AGV/L mostró la mejor capacidad de almacenamiento de PHA ya que ni la concentración de sustrato ni la proporción de los tiempos de saciedad y ayuno fueron factores limitantes. Este cultivo, altamente enriquecido en organismos almacenadores de PHA (88%), alcanzó un contenido máximo de PHA del 74.6%.

Coats et al., (2016) investigaron el efecto de la tasa de aireación en la síntesis de PHA durante el régimen de saciedad y ayuno, usando como sustrato licor de estiércol fermentado rico en ácidos grasos volátiles (AGV). La evaluación de los reactores de enriquecimiento de PHA no reveló ningún efecto significativo de la aireación reducida sobre las tasas de absorción y almacenamiento de carbono. De hecho, independientemente de la tasa de aireación, los cultivos exhibieron una respuesta al régimen de saciedad/ayuno basada en el ciclo de alimentación. La concentración máxima de PHA intracelular observada fue del 90.1% (mg PHA por mg SSV).

Korkakaki et al., (2016) usaron lixiviados de la FORSU provenientes de condiciones controladas como fuente de sustrato en un reactor de enriquecimiento; sin embargo, obtuvieron un bajo contenido de PHA en la biomasa (29% en peso seco), por lo que decidieron enriquecer la biomasa con un sustrato sintético compuesto por una mezcla de AGV. La subsecuente acumulación usando lixiviado en condiciones de exceso de nutrientes resultó en una máxima acumulación del 78% en peso seco. De esta manera, estos autores recomiendan enriquecer el cultivo con sustratos puros y acumular PHA con lixiviados para hacer el proceso económicamente atractivo.

Sanchez, (2016) también usó lixiviados de la FORSU y un cultivo mixto. Mediante la estrategia de ADA en un SBR, logró detectar un aumento de bacterias acumuladoras de PHA en el cultivo a los 29 días de operación mediante microscopia de fluorescencia y logró alcanzar un máximo 12% de PHA.

Colombo et al., (2017) analizaron la producción de PHA a partir de los ácidos orgánicos obtenidos de la fermentación anaerobia de la fracción orgánica de los

residuos sólidos urbanos (FORSU). Estos autores demostraron que optimizando la fermentación ácida de la FORSU es posible obtener una mayor cantidad de ácidos orgánicos para ser luego transformados en PHA. Además, la alta concentración de ácidos evita la producción de metano en el reactor de fermentación la de FORSU.

Por su parte, Vjayan y Vadivelu, (2017) estudiaron los efectos de la aireación en la acumulación de PHA en biomasa granular aerobia alimentado con efluente de la fabricación del aceite de palma obtenido de una laguna anaerobia. Encontraron que la tasa de aireación durante el periodo de ayuno no tuvo ningún efecto en el contenido de PHA ni en la remoción de DQO; aunque se encontró que el proceso de acumulación de PHA se aceleró y los microorganismos acumuladores de PHA se ubicaron más próximos a la superficie del granulo cuando las tasas de aireación se redujeron.

Queirós et al. (2018) analizaron la producción de PHA utilizando licores de sulfito gastados suplementados con HA, HP y HB en proporciones 40:27:33 para simular un efluente prefermentado, obteniendo rápidamente un cultivo estable y con un contenido máximo de PHA de 36.4%. Estos autores concluyeron que la acidificación del efluente ayuda a convertir azúcares y compuestos tóxicos en ácidos orgánicos de cadena corta, lo que favorece la producción de PHA.

Los estudios citados en esta sección muestran que se han empleado distintos residuos, entre los que destacan los lixiviados de la FORSU, por su alto contenido de ácidos grasos, los cuales son los principales precursores en la producción de PHA. De esta manera, al emplear los lixiviados en el proceso de producción de PHA es posible lograr su valorización, brindando una alternativa ecológica y comercial a la producción de PHA, con grandes perspectivas de investigación al ser necesario abordar los distintos parámetros que influyen en la síntesis de PHA usando este efluente; además, permite prescindir del paso de la prefermentación al usar otros efluentes.

4. Justificación hipótesis y objetivos

4.1. Justificación

Actualmente, la demanda de los petroplásticos crece año tras año, ya que son materiales empleados extensivamente en actividades cotidianas e industriales, lo que provoca severos problemas ambientales derivados de su permanencia y acumulación en los ecosistemas.

Por esta razón, se han explorado alternativas para sustituirlos por otros materiales que tengan propiedades similares, pero que sean más amigables con el medio ambiente. Así, los bioplásticos han ido ganando importancia. Entre estos resaltan los polihidroxiclcanoatos o PHA, los cuales son biopolímeros que, además de compartir propiedades similares a los petroplásticos, son completamente biodegradables.

Usualmente el proceso de síntesis de PHA involucra el uso de cepas puras, así como medios sintéticos, resultando en un proceso costoso. Como alternativa, resulta prometedor el uso de cultivos mixtos y residuos como sustrato. Entre los diversos residuos que se han empleado están melazas, AR de la industria del papel, licor de estiércol y suero de queso; sin embargo, para que estos puedan ser empleados en el proceso de producción de PHA, deben ser prefermentados con la finalidad de aumentar su contenido de ácidos orgánicos, los cuales son intermediarios directos en la síntesis de PHA.

De esta manera, los lixiviados del composteo de la FORSU han cobrado importancia como sustrato en la producción de PHA, debido a su alto contenido de AGV, lo cual resulta beneficioso ya que los convierte en una fuente ideal para la producción de PHA a partir de cultivos mixtos, con la ventaja de prescindir del paso de prefermentación necesario al usar otros residuos.

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de este trabajo fue evaluar los lixiviados de la FORSU como sustrato en la producción de PHA aplicando una estrategia de saciedad/ayuno a un cultivo mixto, permitiendo la valorización de este residuo.

4.2. Hipótesis

El alto contenido de AGV en los lixiviados de composteo de la FORSU, permitirán enriquecer un cultivo mixto en biomasa acumuladora de PHA, al ser empleados como fuente de sustrato y aplicando la ADA en un reactor de lote secuencial.

4.3 Objetivo general

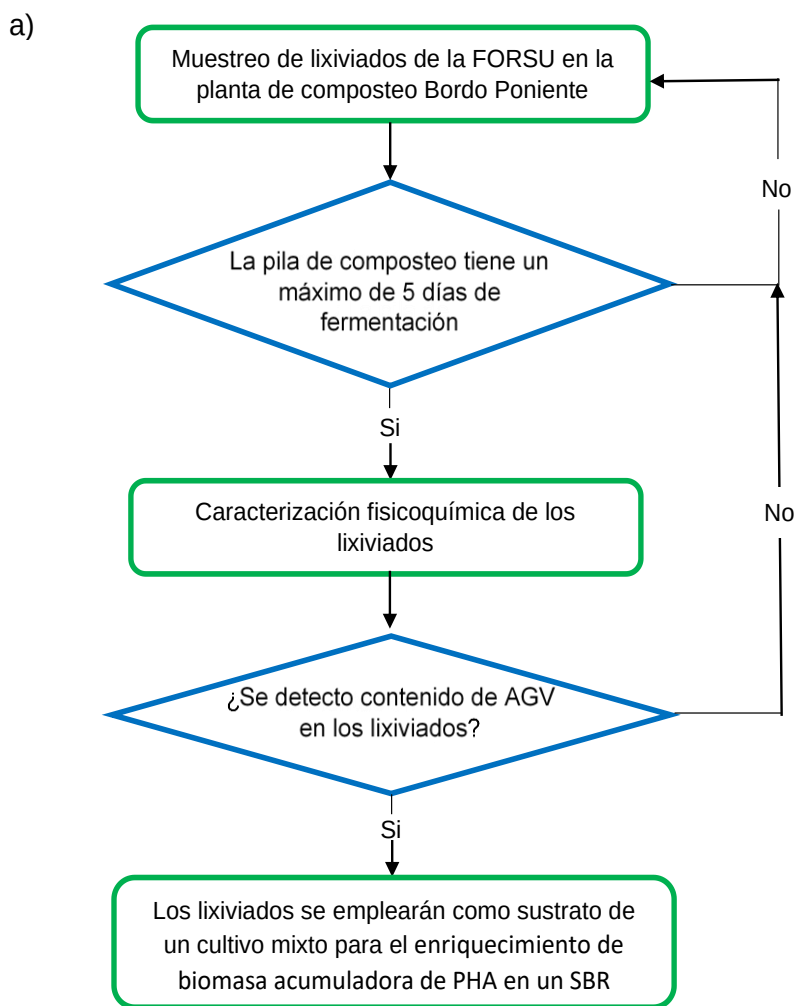
Evaluar la producción de PHA a partir de los lixiviados de composteo de la FORSU utilizando cultivos mixtos microbianos en un SBR a escala laboratorio.

4.4. Objetivos particulares

- Determinar la composición fisicoquímica de los lixiviados de composteo de la FORSU obtenidos en distintas épocas del año de la planta de composteo “Bordo Poniente” como sustrato alternativo para la producción de PHA.
- Evaluar la capacidad de acumulación de PHA en un cultivo mixto alimentado con lixiviados de la FORSU en la etapa de enriquecimiento, aplicando la ADA en un SBR a escala laboratorio.
- Analizar el efecto de la relación C/N en la capacidad de acumulación de PHA de un cultivo mixto enriquecido, usando como sustrato los lixiviados de la FORSU.
- Evaluar la eficiencia de la remoción de materia orgánica y nutrientes de los lixiviados de la FORSU en el SBR con el cultivo enriquecido con microorganismo acumuladores de PHA.
- Evaluar el efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA en cultivos mixtos enriquecidos.

5. Materiales y métodos

En el presente trabajo se realizó la operación de un SBR con un cultivo mixto para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA a partir de lixiviados de la FORSU. Se evaluó el desempeño del reactor, así como la capacidad de acumulación de PHA del cultivo mixto bajo distintas relaciones C/N. Por otro lado, el efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA en un cultivo mixto fresco también fue evaluado. La Figura 5.1 ilustra las actividades realizadas en el desarrollo de esta tesis.



b)

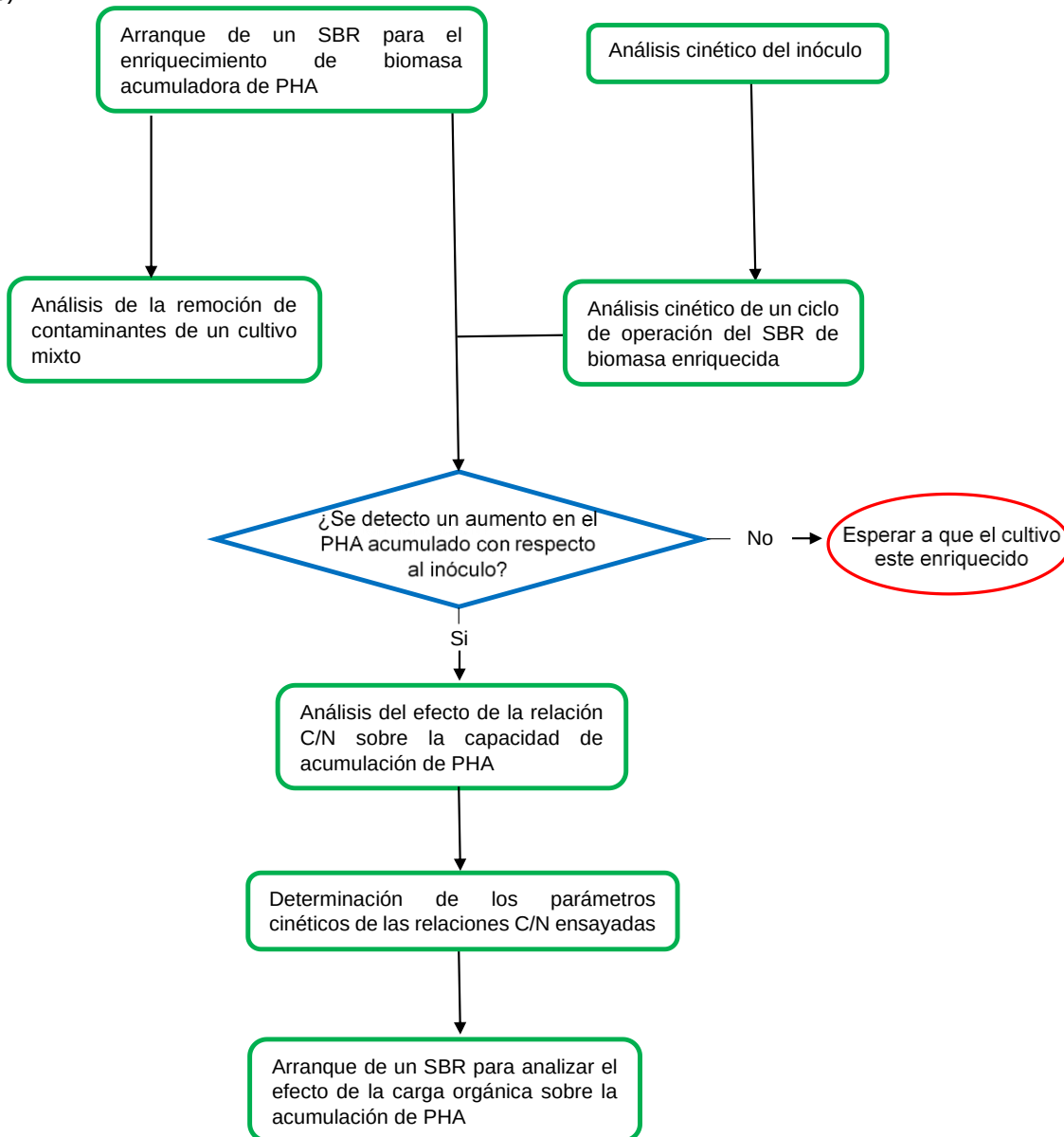


Figura 5.1 Diagrama de actividades realizadas para cumplir los objetivos planteados en la tesis a) Lixiviados y b) Reactor SBR.

5.1 Muestreo de lixiviados de la FORSU y lodos aerobios de purga

Se realizaron 16 muestreos de lixiviado de pilas de composteo de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), de máximo 5 días de fermentación, en la “Planta de Composteo Bordo Poniente”, ubicada en el Estado de México (19°27'41.3"N 99°01' 04.2"W) entre los años 2016 y 2020. Las muestras frescas de lixiviado fueron filtradas *in situ* para eliminar sólidos grandes, posteriormente fueron transportadas al laboratorio donde se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para su posterior caracterización.

El inóculo fue un lodo activado tomado del sedimentador de la “Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Cerro de la Estrella” ubicada en la Alcaldía de Iztapalapa.

5.2 Reactor lote secuencial (SBR) para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA

Para el arranque del reactor de enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA, se utilizó un reactor lote secuenciado (SBR), con un volumen útil de 5 L (Figura 5.2), inoculado con 2.7 L de lodos activados, para tener una concentración final en el reactor de 2 g SSVLM/L.

El reactor fue alimentado con lixiviados de la FORSU diluidos con agua de grifo, para una concentración final de 1 g DQO/L, resultando en una relación F/M de 0.5 (g DQO/g SSVLM) y una relación C/N de 23.2.

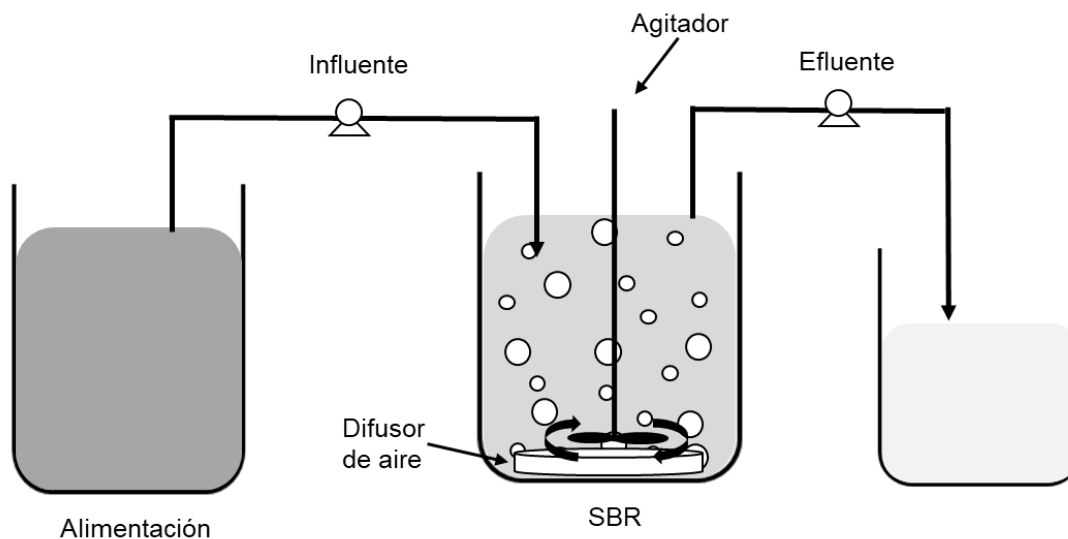


Figura 5.2 SBR de enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA.

El SBR fue operado con la estrategia de ADA, con un régimen de ciclos de saciedad/ayuno (Albuquerque et al., 2011; Johnson et al., 2010; Bengtsson, Werker, et al., 2008; Serafim et al., 2004), la cual favorece la selección de microorganismos productores de PHA.

Para llevar a cabo con éxito la ADA se ajustaron ciclos sucesivos de 12 horas con la siguiente configuración: 8 minutos de ADA, 680 minutos de aireación y agitación (reacción), 30 minutos de sedimentación y 10 minutos de descarga (Figura 5.3) Los ciclos fueron automatizados con un controlador programable lógico (DATA LOGGER, COMET, Czech Republic). Temperatura de 22 ± 3 °C, agitación de 250 rpm, sin control de pH y en cada ciclo el volumen de intercambio fue del 25%, resultando en un TRH de 2 días.

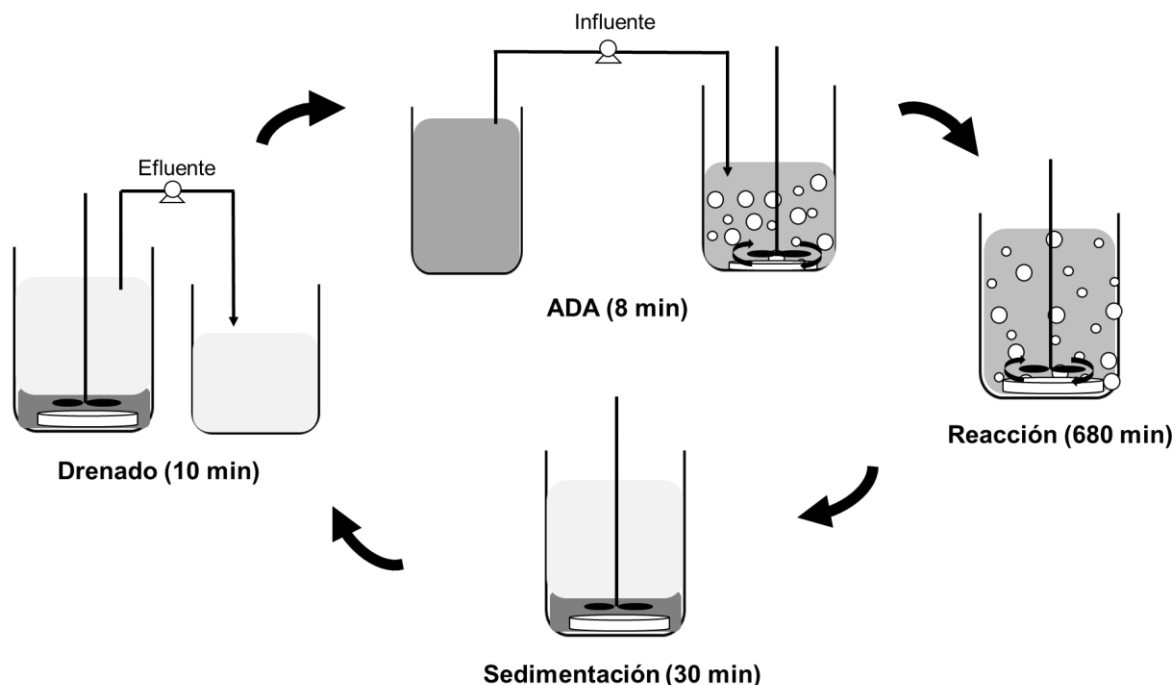


Figura 5.3 Ciclo de operación del reactor SBR para el enriquecimiento de biomasa productora de PHA.

El SBR se mantuvo con aireación constante mediante un compresor acoplado a un difusor flexible instalado en el fondo del reactor, suministrando aire para lograr el 91% de saturación de OD y 0.33 volumen de aire/volumen de reactor·minuto (vvm). El OD fue monitoreado usando un sensor óptico multiparamétrico (WTW MultiLine® Multi 3630 IDS). Para evaluar el progreso del enriquecimiento de la biomasa acumuladora de PHA se realizaron pruebas cualitativas mediante la tinción de la biomasa con azul Nilo (anexo 2).

5.3 Análisis cinético del inóculo

Con el objetivo de evaluar las características fisiológicas del inóculo se realizó una cinética, bajo las condiciones establecidas en la operación del SBR, cuantificando el consumo de materia orgánica, OD, AGV, nutrientes (NH_4^+ y PO_4^{3-}) y la capacidad de acumulación de PHA.

5.4 Efecto de la relación C/N sobre la producción de PHA

Se monitoreó el desempeño del reactor a distintas relaciones C/N sobre la capacidad de acumulación de PHA en la biomasa y la remoción de contaminantes.

Después de 10 TRH de operación se procedió a realizar el análisis cinético de un ciclo de operación (control C/N 23.2), evaluando la dinámica de consumo de materia orgánica, amonio, fosfato, AGV y la acumulación de PHA.

Una vez confirmada la presencia de PHA en el cultivo, se evaluó el efecto del cambio en la relación C/N sobre la acumulación de PHA. Para ello se adicionaron 171, 411 y 571 mg de acetato de sodio en el influente, aumentando así la concentración de carbono orgánico, obteniendo relaciones C/N de 25.2, 38.1 y 41.2 (mg C/mg N) respectivamente. Así mismo, con el objetivo de disminuir la relación C/N con respecto al control, se adicionaron 18 mg de cloruro de amonio en el influente para obtener una relación C/N de 13.3.

Las cinéticas a las relaciones C/N 13.3 y 23.2 se llevaron a cabo en los días 30 y 60 de operación, respectivamente. Mientras que los ensayos cinéticos para las relaciones C/N de 25.2, 38.1 y 41.2 se realizaron los días 103, 118 y 133, respectivamente. En la Tabla 5.1 se muestra el diseño experimental de las cinéticas.

Tabla 5.1 Diseño Experimental para los ensayos de variación en las relaciones C/N

C/N	DQOs Inicial (mg/L)	COT Inicial (mg/L)	C _{AGV} Total (mg/L)	Proporción AGV HA:HP:HB:HV	NH ₄ ⁺ Total (mg/L)	Tiempo (días)	F/M
13.3	1100	412.7	79.9	100 (a)	31.0	60	0.55
23.2*	960	349.1	80.9	83:9:8:0	15.0	30	0.48
25.2	1200	418.9	361.0	72:12:14:2	16.6	103	0.60
38.1	1700	610.0	580.1	84:7:7:2	16.0	118	0.85
41.2	1850	688.04	605.0	97:1:1:1	16.7	133	0.93

*Ensayo control. F/M: g DQOs/g SSVLM. M: 2 g SSVLM/L. C_{AGV}: Carbono de AGV. HA: Ac. Acético. HP: Ac. Propiónico. HB: Ac. Butírico. HV: Ac. Valérico.

5.5 Efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA

Para evaluar el efecto de la carga orgánica sobre la acumulación de PHA se puso en marcha un SBR con inóculo fresco replicando las mismas condiciones previamente establecidas durante el enriquecimiento.

La estrategia de operación propuesta para esta etapa fue aplicar distintas cargas orgánicas al reactor hasta alcanzar la máxima acumulación de PHB, utilizando lixiviados de la FORSU diluidos con agua del grifo. Sin embargo, el trabajo experimental para esta etapa se vio afectado por la pandemia, consiguiendo probar tan solo dos cargas. En la etapa de arranque la carga orgánica en el influente fue de 2 g DQO/L•día (21 días) y en la segunda etapa se alimentó a una carga de 4 g DQO/L•d.

5.6 Técnicas analíticas

En la Tabla 5.2, se muestran las técnicas analíticas correspondientes a las distintas determinaciones que se realizaron durante el monitoreo del SBR tanto en el influente y efluente del reactor, así como en el desarrollo de los análisis cinéticos.

Tabla 5.2 Técnicas analíticas

Parámetro	Referencia
COT	HACH (2014 product #2760445)
pH	Método: 4500-B (APHA, 2017)
DQO	Método: 5220-C (APHA, 2017)
NH ₄ ⁺	Método: 4500-NH ₃ G (APHA, 2017)
PO ₄ ³⁻	Método: 4500-P E (APHA, 2017)
OD	Método: 4500-O G (APHA, 2017)
Sólidos Totales	Método: 2540-D (APHA, 2017)
Sólidos Fijos	Método: 2540-E (APHA, 2017)
Sólidos Volátiles	Método: 2540-E (APHA, 2017)
AGV*	Adaptado del Método: 5560-D (APHA, 2017)
PHA*	
Microscopia de fluorescencia	Ostle y Holt, (1982)
Gravimetría	(Hahn et al., 1993)
PHB*	
Espectrofotometría UV	Law y Slepecky, (1961)
Espectrofotometría Infrarroja (FTIR)	Lambeek et al., (1995)
*anexo 2	

6. Resultados

6.1 Muestreo y caracterización de lixiviados de composteo de la FORSU

Se llevaron a cabo muestreos de lixiviados de la FORSU producidos en la planta de composteo “Bordo Poniente”, los cuales se programaron aproximadamente cada 2 meses, entre 2016 y 2019 ($n= 16$). Las muestras fueron caracterizadas para determinar su composición fisicoquímica, como se describió en la sección 5.6.

Los resultados muestran un pH ácido en los lixiviados, con un valor promedio de 4.7 ± 0.32 , así como una concentración de materia orgánica soluble de 86.7 ± 19.2 g/L, la cual representa entre el 92 y 96% de la total. El contenido promedio de AGV fue de 10.7 ± 5.4 g/L, teniendo una relación en su composición de 52:16:28:4 HA:HP:HB:HV, respectivamente. Los altos valores de concentración de AGV indican que la utilización de los lixiviados como fuente de sustrato para la producción de PHA permite prescindir de la etapa de prefermentación, la cual comúnmente se aplica para la conversión de la materia orgánica en AGV (Argiz et al., 2020; Lorini et al., 2020; Lee et al., 2018; Munir y Jamil, 2018; Oliveira et al., 2017; Wang et al., 2017; Moralejo-Gárate et al., 2014). De esta forma, se considera que la utilización de dicho medio residual permite simplificar considerablemente el proceso global de producción de PHA y reducir costos.

La predominancia de HA en los lixiviados permitió considerarlos como una fuente de sustrato apropiada para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA, ya que como se muestra en el capítulo del marco teórico, en las Figuras 2.4 y 2.5, el acetato es una de las fuentes de carbono representativas en la síntesis de PHB, siendo comúnmente empleado por diversos autores en el proceso de producción (Narancic et al., 2016; Tsuda et al., 2016; Ciesielski y Przybylek, 2014; Pandolfi et al., 2007). Además, también se detectó HB el cual ha sido reportado como el sustrato preferido por cultivos enriquecidos en biomasa acumuladora de PHA, siendo el PHB el producto final usando este AGV (Marang et al., 2013).

Respecto a los nutrientes, los lixiviados presentaron concentraciones de NH_4^+ y PO_4^{3-} de 1.10 ± 0.5 y 1.10 ± 0.4 g/L g/L, respectivamente, permitiendo omitir la

suplementación externa, siendo estos necesarios durante el enriquecimiento del cultivo, y para la síntesis de PHA (Oliveira et al., 2018).

La Tabla 6.1 muestra diversos parámetros medidos de los lixiviados de composteo de la FORSU de la planta Bordo Poniente, desde el año 2009 e incluye los datos recabados en el presente trabajo, donde se puede observar que la mayoría de los parámetros obtenidos en este estudio están dentro del intervalo reportado por otros autores en años anteriores (Castilla-Hernández et al., 2016; Sanchez, 2016; Gan et al., 2013).

Tabla 6.1 Comparaciones realizadas al lixiviado de la FORSU de la planta de Composteo Bordo Poniente.

Parámetro g/L	Gan et al., (2013)	Castilla-Hernández et al., (2016)		Sanchez, (2016)	Este trabajo
		Lluvias	Secas		
COT	-----	35.2 ± 6.4	39.4 ± 2.5	31.35 ± 7.51	22.0 ± 3.5
DQO _T	102.17 ± 25.20	100.1 ± 16.6	119.0 ± 11.6	92.92 ± 20.78	86.7 ± 19.2
DQO _S	96.56 ± 30.31	91.3 ± 17.4	107.9 ± 8.1	78.14 ± 16.24	78.2 ± 16.3
AGVt	18.99 ± 2.83	16.2 ± 6.3	24.5 ± 8.9	22.83 ± 2.16	10.7 ± 5.4
Proporción HA:HP:HB:HV	48:16:23:13	70:14:12:4	80:10:7:3	50:26:14:10	52:16:28:4
ST	10.66 ± 7.12	90.7 ± 18.4	99.7 ± 13.6	66.22 ± 14.14	68.7 ± 17.0
SV	8.5 ± 6.36	59.5 ± 14.7	69.0 ± 10.6	43.29 ± 10.29	45.1 ± 13.2
NH ₄ ⁺	0.64 ± 0.13	0.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3	1.07 ± 0.43	1.10 ± 0.5
PO ₄ ³⁻	-----	-----	-----	-----	1.10 ± 0.4
pH	4.66 ± 0.23	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.79 ± 0.42	4.7 ± 0.3

Además, la composición de los lixiviados de composteo de la FORSU varió ampliamente para todos los parámetros analizados (Tabla 6.1). Esto se debe al cambio natural en la composición misma de los residuos, así como a las épocas del

año y a las variaciones climatológicas debidas a los cambios estacionales, las cuales provocan la dilución en la concentración de los compuestos en temporadas de lluvia y su concentración en temporadas de secas, como reportó Castilla-Hernández et al., (2016).

Por su parte, la planta de composteo ha realizado modificaciones a lo largo de los años en lo que respecta al manejo de las pilas de composteo. Durante los muestreos realizados entre 2019 y enero 2020 se observó una actividad diferente a las colectas previas, ya que los residuos orgánicos y lixiviados eran recogidos por trascabos de la base de las pilas y los incorporaban en la parte más alta que les permitía el brazo del trascabo, esto con la finalidad de humedecer las pilas y airearlas mediante el mezclado mecánico, resultando en un menor volumen de lixiviado en comparación con años anteriores y una menor concentración en los AGV.

En contraste, durante las colectas realizadas en años anteriores no se empleaban trascabos y los lixiviados se mantenían en la parte más baja de las pilas, lo que conllevaba a un volumen significativamente más grande en este efluente y mayor concentración en los AGV.

Adicionalmente, los puntos de recolección no siempre fueron los mismos, dado que el criterio de selección del sitio para la colecta de las muestras se basó en elegir aquellos puntos en donde recientemente se hubieran depositado residuos. En este sentido, se considera que la combinación de estos factores determinó la variabilidad en la concentración de los lotes recolectados.

A pesar de la variabilidad en la composición del residuo, la presencia de AGV se observó en todas las caracterizaciones, motivo por el cual se decidió evaluar este efluente como fuente de sustrato para la acumulación de PHA en un cultivo mixto en un SBR a escala laboratorio.

6.2 Análisis del proceso de acumulación de PHA

6.2.1 Perfil cinético del inóculo

Una vez que los lixiviados de la FORSU fueron caracterizados, se evaluó el proceso cinético de acumulación de PHA en el cultivo mixto usado como inóculo durante el arranque del SBR. Para ello se monitoreó el primer ciclo de operación, alimentando el sistema mediante la ADA con lixiviados de composteo de la FORSU diluidos a una concentración de 1 g DQO/L, siguiendo el consumo a lo largo del tiempo de la fuente de carbono y nutrientes, así como la consecuente producción de PHA.

La concentración de OD antes de la alimentación fue de 5.8 mg/L. Posteriormente, cuando se adicionó el sustrato, el oxígeno fue consumido rápidamente debido a su utilización como aceptor de electrones en el proceso de oxidación de la materia orgánica biodegradable contenida en el lixiviado, provocando la disminución en la concentración de OD hasta 0.78 mg/L manteniéndose constante (Figura 6.1). En este sentido, el COT inicial se redujo de 350 mg/L a 130 mg/L en los primeros 100 minutos de aireación para luego mantenerse constante hasta el final de del ciclo.

El HA fue completamente consumido tras 80 minutos de haber iniciado el ciclo. La etapa de saciedad tuvo una duración de 99 minutos, ya que en el minuto 100 la concentración de OD comenzó a incrementarse, indicando el final de esta etapa y el comienzo del ayuno.

El consumo de materia orgánica durante la etapa de saciedad indujo a la acumulación de PHA en la biomasa, con un coeficiente de rendimiento ($Y_{p/s}$) de 0.073 mg C-PHA producido/mg C_{HA} consumido, a una tasa específica de acumulación de PHA (q_{sPHA}) de 0.041 g PHA/g SSVLM·h, alcanzando un valor máximo de 6.61% acumulado después de 60 minutos, tiempo en el que el HA fue consumido.

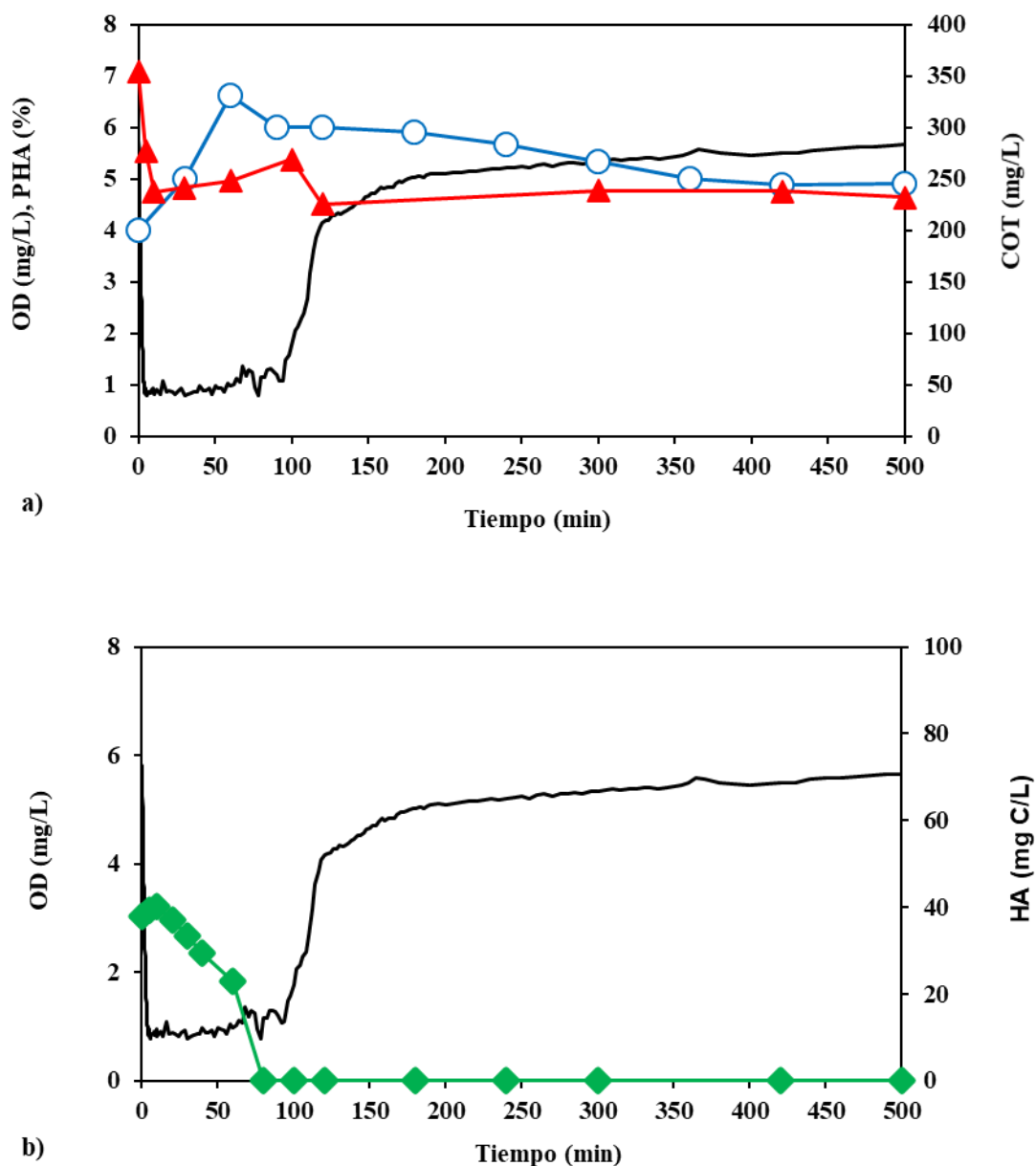


Figura 6.1 Perfil cinético del inóculo: a) — OD, ▲ COT, ○ PHA. b) Perfil de consumo de ♦ HA.

Durante el ciclo de operación se observó una eficiencia de remoción de COT del 34.45%, y una remoción de nutrientes en forma de NH_4^+ y PO_4^{3-} del 100 y 54.56% respectivamente.

Con excepción del amonio, los otros compuestos mostraron tener remociones menores al 60%, lo cual podría indicar que los lixiviados contenían una fracción importante de materia orgánica recalcitrante o no biodisponible que los microorganismos no fueron capaces de asimilar. Cabe destacar que, en esta etapa, el cultivo no estaba totalmente adaptado a la composición particularmente compleja de los lixiviados, lo cual pudo influir de igual manera en las remociones alcanzadas.

A pesar de ello, la acumulación de PHA alcanzada por el inóculo fue ligeramente superior a la reportada por Hao et al., (2017), quienes alcanzaron un máximo de 5% durante los primeros 5 ciclos de operación del reactor usando lodos hidrolizados, donde el HV fue el AGV predominante, pero es inferior a lo reportado por Majone et al., (2006) quienes alcanzaron un 11% en el primer día de enriquecimiento, usando una mezcla de AGV: acético, láctico y propiónico en proporciones 40:40:20 y por Sruamsiri et al., (2020), donde la única fuente de carbono fue acetato, logrando una máxima acumulación del 14.4% de PHA a los 8 días del arranque de un reactor de enriquecimiento.

Aunque la acumulación de PHA alcanzada en el presente estudio fue baja, se demostró la capacidad del cultivo mixto para poder acumular este biopolímero a partir de los lixiviados de composteo de la FORSU y aplicando la ADA.

6.2.2 Identificación de PHA por microscopia de fluorescencia.

Para verificar el proceso de enriquecimiento de la biomasa con microorganismos acumuladores de PHA, se llevó a cabo su detección a partir de tinciones con colorante azul Nilo. Para ello, se tomaron distintas muestras de lodo en distintos días de operación y se prepararon para ser observadas en un microscopio de fluorescencia.

La Figura 6.2, muestra la evolución en la acumulación de PHA durante los primeros 20 días de operación. La muestra de inóculo presentó densidad de gránulos fluorescentes de PHA considerablemente bajas (Figura 6.2a). Sin embargo, conforme transcurrió el tiempo de operación esta fluorescencia se intensificó

(Figuras 6.2b-6.2d). Este análisis permitió confirmar el enriquecimiento de la biomasa en microorganismos acumuladores de PHA durante los primeros 12 días de operación, siendo altamente evidente para el día 20. De acuerdo con Oshiki et al., (2011), existe una estrecha relación entre la cantidad de PHA en el cultivo y la intensidad de fluorescencia de los gránulos teñidos con azul Nilo.

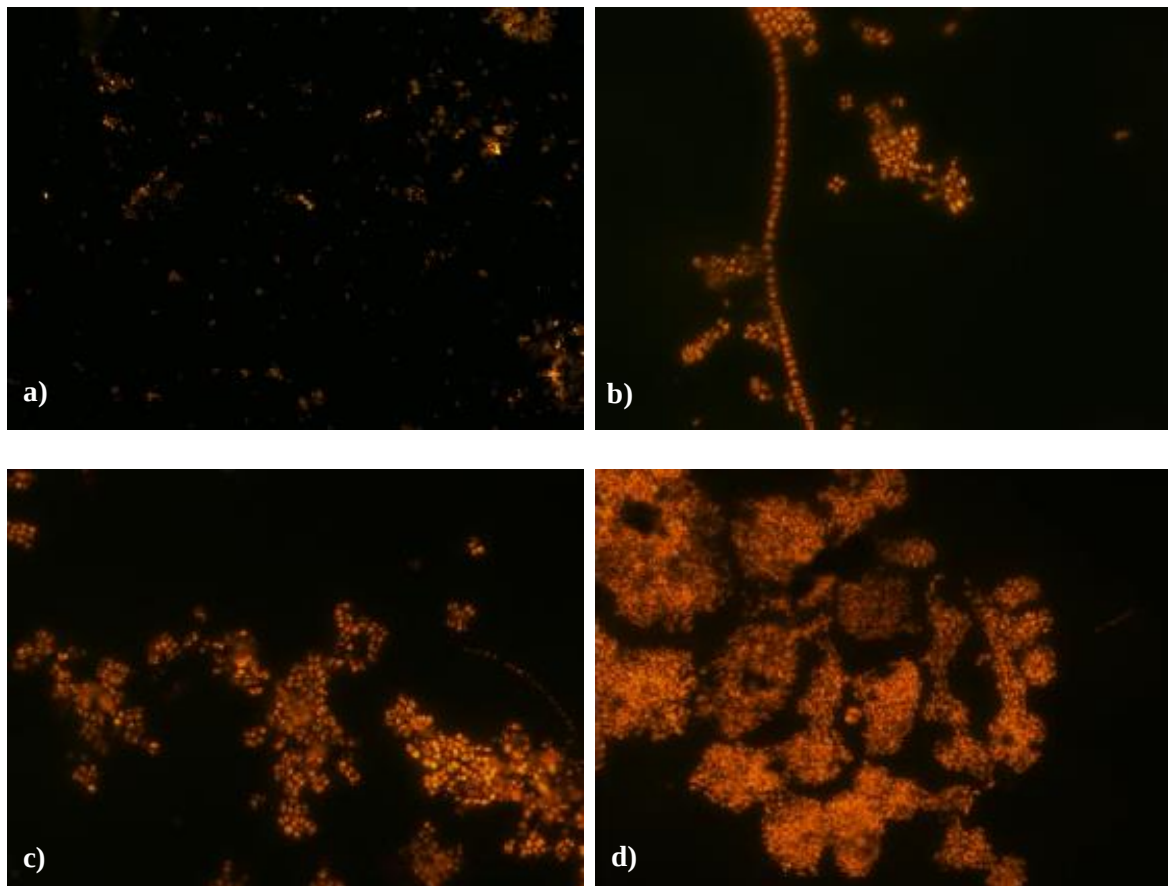


Figura 6.2 Gránulos de PHA observados bajo fluorescencia a 460 nm con aumento de 100X: a) 0, b) 6, c) 12 y d) 20 días.

Considerando el aumento en la fluorescencia en las muestras de biomasa, se puede inferir que la estrategia de operación aplicada (ADA) permitió enriquecer el cultivo mixto en microorganismos con capacidad de acumulación de PHA durante los primeros 20 días de operación del SBR.

6.2.3 Caracterización de los PHA por espectrofotometría UV e infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Una vez identificada la presencia de los gránulos de PHA en la biomasa a partir de la técnica de microscopía de fluorescencia, se procedió a caracterizar el tipo de PHA producido. Para ello, se siguió la metodología propuesta por Hahn et al., (1993) con algunas modificaciones (anexo 2), en la que el PHA se extrae de la biomasa y se hidroliza con H_2SO_4 concentrado, transformando el polímero en ácido crotonico, el cual tiene un pico característico de absorción a los 235 nm.

La Figura 6.3 muestra el espectro de absorción obtenido a partir de un extracto hidrolizado, comparado con un estándar de ácido crotonico. Como se puede observar, ambos espectros tienen un máximo de absorción a 235 nm, por lo cual se confirmó que el PHA formado a partir de lixiviados de composteo de la FORSU fue PHB.

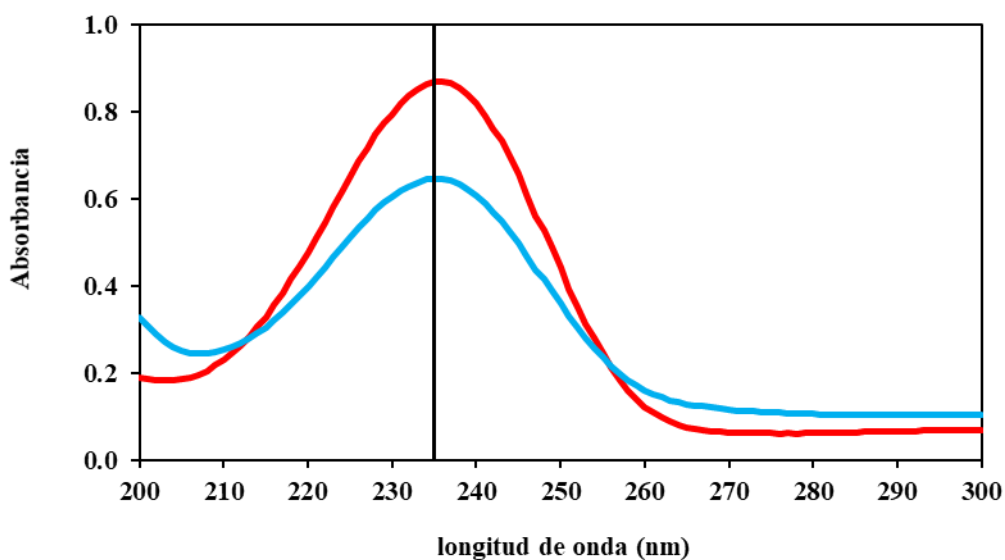


Figura 6.3. Espectro UV: estándar de ácido crotonico (—), muestra problema (—).

Además de la determinación espectrofotométrica, se llevó a cabo el análisis del biopolímero extraído mediante espectrofotometría de infrarrojo (FTIR). El espectro obtenido se presenta en la Figura 6.4, mostrando la presencia de diferentes bandas conformacionales (Lambeck et al., 1995). Los picos en la región $2800-3100\text{ cm}^{-1}$

están relacionados estrechamente a las vibraciones de las bandas del grupo C-H. En particular, la banda de absorción alrededor de 2934 cm^{-1} es comúnmente atribuida a un grupo metilo asimétrico. El pico largo a 1724 cm^{-1} es atribuido a los grupos C=O en el PHA, que fue confirmado por vibraciones del grupo funcional C-O en la banda de 1280 cm^{-1} . La banda a 1185 cm^{-1} está relacionada estrechamente con la vibración del grupo asimétrico característico C-O-C. En conjunto, todos los grupos funcionales identificados se consideran como característicos de la estructura de los PHA.

Arcos-Hernandez et al., (2010), Kansiz et al., (2007) y Misra et al., (2000) detectaron estas bandas de transmitancia con cultivos mixtos, mientras que Ali y Jamil, (2018) y Sawant et al., (2017) y las detectaron para *Saccharophagus* y *Bacillus*, respectivamente. El pico en la región de $1280 - 1300\text{ cm}^{-1}$ corresponde a PHA de cadena corta, como lo es el PHB. Además, las bandas de 1279 , 1228 y 1186 cm^{-1} son sensibles al grado de cristalinidad, la cual es una característica particular del PHB que no presentan otros tipos de PHA. Los picos alrededor de 1185 cm^{-1} reflejan vibraciones de extensión del grupo C-O-C. La ubicación de los grupos anteriores coincide con estudios previos (Huang et al., 2011; Xu et al., 2002), lo que nuevamente confirma el PHB como el biopolímero producido por la biomasa.

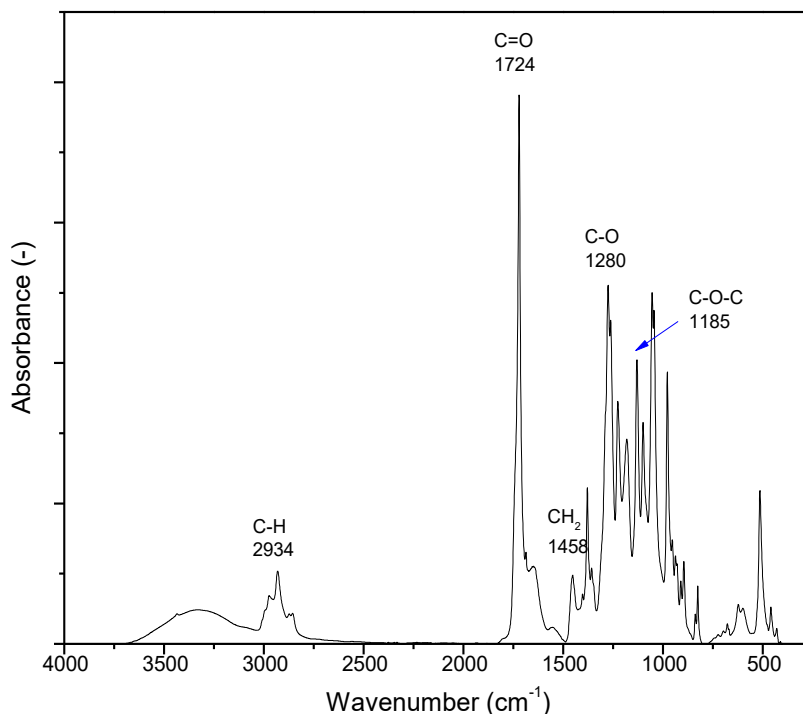


Figura 6.4 Espectro FTIR de PHB.

El análisis por FTIR no mostró evidencias de la presencia del PHV, el cual requiere para su síntesis la presencia de ácido propiónico y valérico (Ciesielski y Przybylek, 2014; Wang et al., 2013; Kemavongse et al., 2008), los cuales se encontraban en concentraciones menores a las de los ácidos acético y propiónico en los lixiviados de la FORSU. En este sentido, la predominancia de HA en los lixiviados favoreció la selección de microorganismos acumuladores de PHB, eliminando del reactor aquellos con la capacidad de acumular otros PHA.

Koch et al., (2020) y Serafim et al., (2004) reportaron la producción de PHB cuando el HA es usado como fuente de carbono, mientras que Ramírez, (2009) consiguieron la síntesis de PHB usando una mezcla de acetato y propionato en proporción 70:30, Marang et al., (2013) y Albuquerque et al., (2011) produjeron PHB a partir de una mezcla de HA y HB.

6.2.4 Evolución de los periodos de saciedad/ayuno a lo largo del tiempo

Durante la operación del SBR se monitoreó la duración de las etapas de saciedad y ayuno. Esto se consideró relevante debido a que durante la etapa de saciedad la fuente de carbono es consumida y acumulada como PHA, mientras que durante la etapa de ayuno el sustrato se agota y los PHA son empleados como reserva de carbono. De esta forma, la aplicación de la ADA y las consecuentes condiciones alternantes de saciedad/ayuno en los ciclos de operación permite seleccionar aquellos microorganismos con la capacidad de acumulación de PHA (Kourmentza et al., 2017).

La duración de las etapas de saciedad y ayuno se determinaron a partir del OD, debido a la estrecha relación entre la concentración de sustrato presente en el medio y el comportamiento del OD (DIAZ 2018).

En la Figura 6.5 se muestran las cinéticas de OD llevadas a cabo en diferentes días de operación. Se puede observar la disminución en el periodo de saciedad con respecto al tiempo de operación, indicando un incremento en la tasa de consumo de sustrato debido a la adaptación del cultivo a la fuente de carbono.

A los 7 días de operación, la etapa de saciedad duró 100 minutos y, posteriormente, la duración de esta etapa fue disminuyendo, registrando el valor más bajo de 43 minutos en el día 210.

La reducción en la duración de los periodos de saciedad provocó una disminución continua en la relación saciedad/ayuno (F/F, por sus siglas en inglés), alcanzando un valor de 0.11 en el día 30 y de 0.04 en los últimos días de operación. Estos valores están dentro del intervalo de 0.03 – 0.15 (h/h), recomendada por algunos autores para la selección de biomasa acumuladora de PHA (Morgan-Sagastume et al., 2019; Colombo et al., 2017).

En este sentido, se considera que la aplicación de periodos de ayuno prolongados favorece la selección de microorganismos acumuladores de PHA, de tal forma que relaciones F/F mayores a 0.3 provocan un efecto adverso en el proceso de almacenamiento de PHA (Oliveira et al., 2017). Por su parte, Queirós et al., (2017)

reportó que la disminución en la relación F/F coincide con la proliferación de microorganismos acumuladores de PHA.

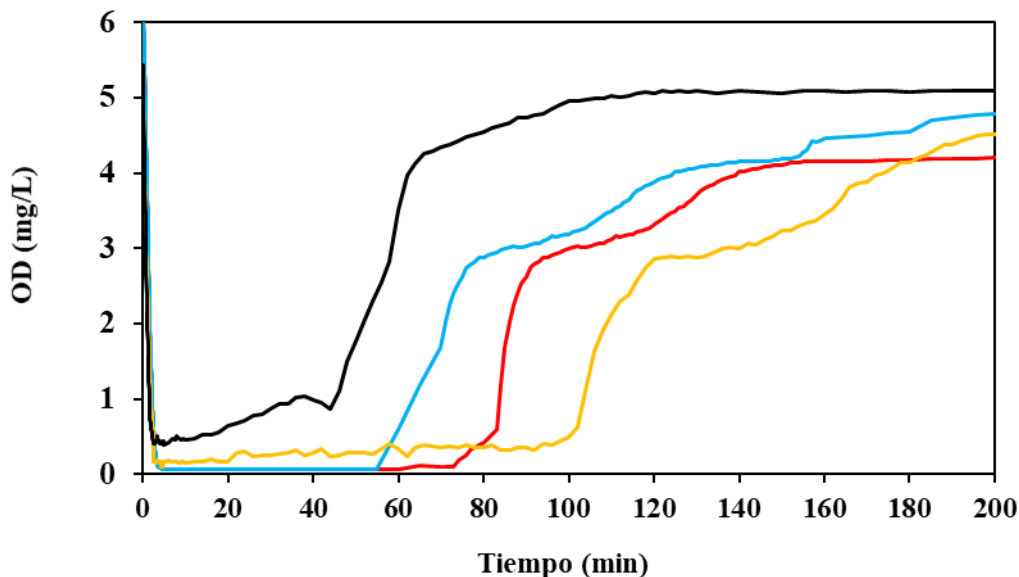


Figura 6.5 Cinéticas de consumo de OD en distintos días de operación: — día 7, — día 50, — día 120, — día 210.

De esta manera, se puede inferir que la disminución en la etapa de saciedad, así como en la relación F/F a valores dentro de lo reportado por algunos autores, es debida a la aclimatación del cultivo a los lixiviados de la FORSU como fuente de sustrato y al enriquecimiento del cultivo en microorganismos acumuladores de PHA.

6.2.5 Disminución en la actividad respiratoria.

Además de los tiempos de saciedad/ayuno, también se analizó la evolución en la tasa de consumo de oxígeno, expresada como qO_2 , y la constante de consumo de primer orden k durante el periodo de operación del SBR (Figura 6.6).

La qO_2 mostró un comportamiento variable durante los primeros 15 días, indicando la aclimatación del cultivo a las condiciones de operación y a la fuente de sustrato. Esta alcanzó un valor máximo de 3.49 mg/L·min en el segundo mes de operación,

para posteriormente decaer hasta un valor mínimo de 1.91 mg/L·min en el cuarto mes. Este comportamiento puede ser atribuido a que durante este periodo se llevaron a cabo experimentos para evaluar el efecto de la relación C/N sobre la producción de PHB, lo cual provocó cambios operacionales que posiblemente resultaron en la caída de la actividad respiratoria de la biomasa.

Una vez concluido el experimento mencionado, el reactor se operó bajo las condiciones operacionales iniciales con el objetivo de inducir la recuperación en las propiedades respiratorias de la biomasa, de tal forma que para el quinto mes su capacidad respiratoria fue similar a la reportada en el primer mes de operación. Sin embargo, después de la recuperación, la biomasa comenzó a perder de nueva cuenta su capacidad respiratoria hasta alcanzar un mínimo absoluto de 0.89 ± 0.14 mg/L·min en el octavo mes.

La k siguió un comportamiento similar, con una disminución de un valor promedio de 0.57 min^{-1} en el primer mes a 0.14 min^{-1} en el último mes de operación. Esta tendencia decreciente en la qO_2 y k durante la operación del reactor indica la pérdida de la capacidad respiratoria del cultivo.

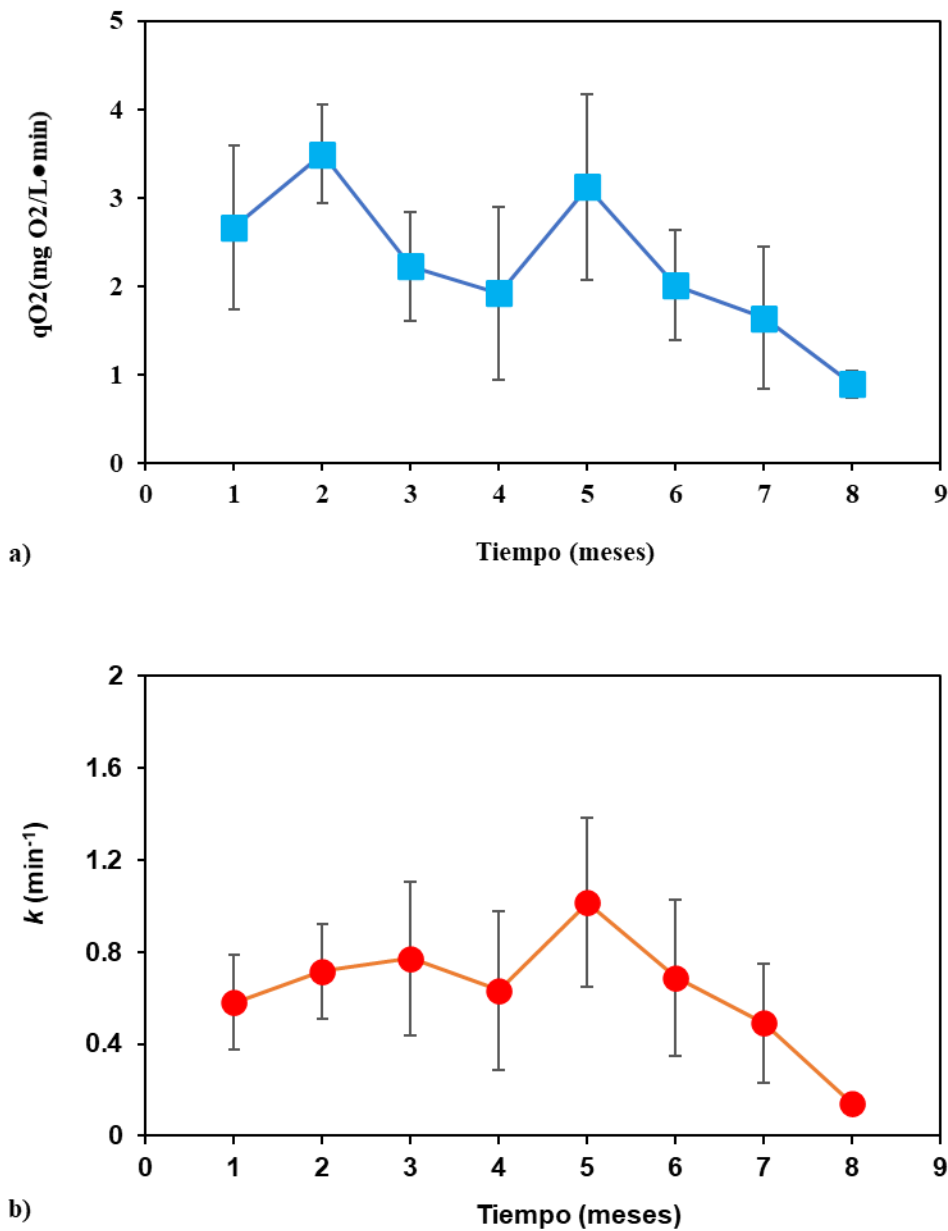


Figura 6.6 Actividad respiratoria del cultivo durante el monitoreo del SBR ■ qO₂ y ● k.

En este sentido, Ramírez, (2009) reportó una disminución en la qO₂ usando medio mineral y una mezcla de HA y HP (70/30), como fuente de carbono. Encontrando un valor inicial para la qO₂ de 0.24 mgO₂/L, disminuyendo hasta un valor de a 0.05

mgO₂/L después de 80 días de operación, atribuyendo este fenómeno al envejecimiento de la biomasa.

En el presente estudio la pérdida en la capacidad respiratoria fue atribuida a la exposición prolongada del cultivo a extensos periodos de ayuno, lo cual pudo haber derivado en la continua pérdida de viabilidad de los microorganismos. Así mismo, la compleja composición de los lixiviados pudo haber sido un factor que contribuyó a dicho fenómeno. En ese sentido, Korkakaki et al., (2016) evaluaron el efecto de distintas proporciones de lixiviados/medio mineral sobre el crecimiento de *Pseudomonas acidovorans*, observando que a una proporción del 25% del lixiviado la tasa específica de consumo de oxígeno disminuye casi en un 50%, estos autores atribuyen este comportamiento a la composición del lixiviado con el cual trabajaron.

6.2.6 Desempeño del SBR

Durante el periodo de operación se monitoreó el desempeño del reactor con respecto a la eficiencia de remoción de los contaminantes contenidos en el lixiviado (Figura 6.7). Las eficiencias promedio de remoción de DQOt y DQOs fueron de 68.3 ± 12.0 y 82.2 ± 5.6 %, respectivamente. Estos valores de remoción de DQOs son comparables a lo reportado por Ahmadi et al., (2019), Bengtsson et al., (2008a) y Liu et al., (2008) quienes alcanzaron eficiencias de remoción de DQOs 89, 90 y 84% usando agua residual de industria de refrescos, agua residual prefermentada de la industria de papel y agua residual de la industria del tomate, respectivamente. Adicionalmente, los residuos anteriormente mencionados son menos complejos en comparación a los lixiviados de la FORSU, lo que permite inferir que la operación de un SBR de enriquecimiento en biomasa acumuladora de PHA es capaz de remover materia orgánica de manera similar a otros sistemas que emplearon otros residuos.

En cuanto al comportamiento de los nutrientes, las eficiencias de remoción de NH₄⁺ y PO₄³⁻ fueron de 99.5 ± 0.3 , y 79.6 ± 8.9 %, respectivamente, siendo similares a las de Liu et al., (2008); por su parte, el consumo completo de NH₄⁺ era de esperarse

ya que Johnson et al., (2010) emplearon concentraciones más altas, registrando un consumo total del mismo.

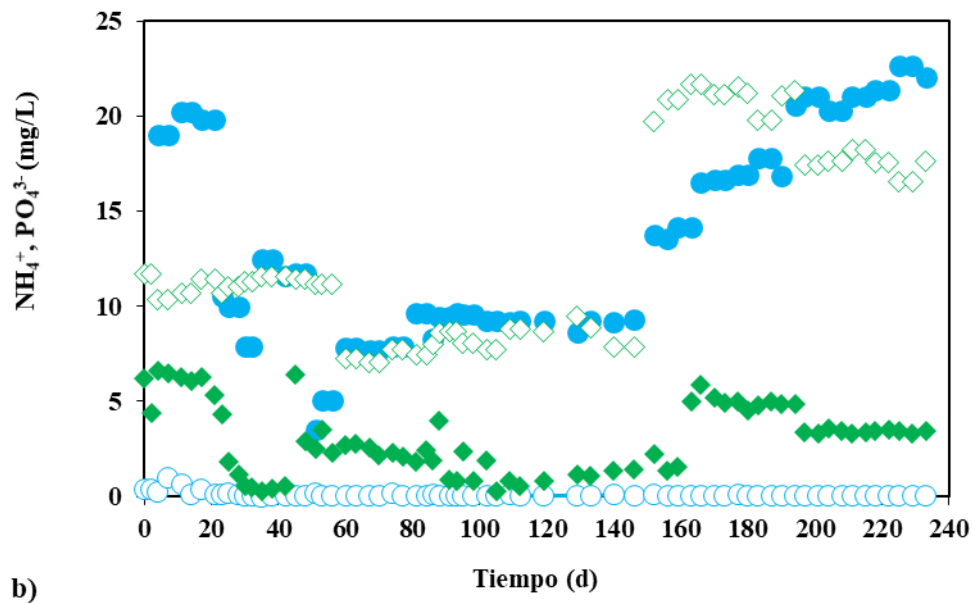
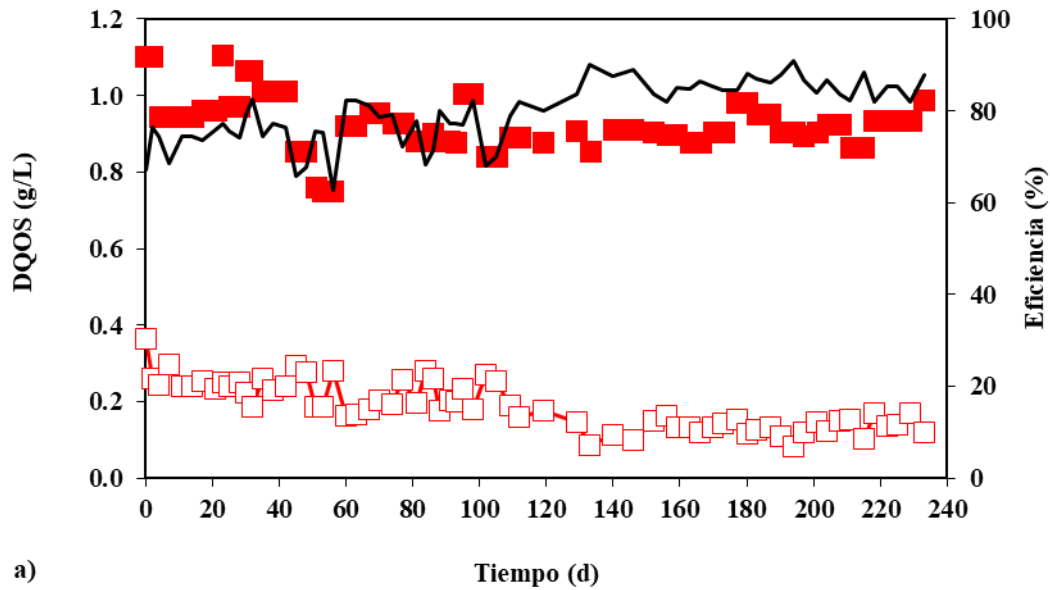


Figura 6.7 Perfil de enriquecimiento del SBR durante la operación: a) DQOs: □ influente, ■ efluente; b) NH_4^+ : ● influente, ○ efluente y PO_4^{3-} : ◇ influente, ◆ efluente.

Se calculó el coeficiente de rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$ promedio durante el periodo de operación, obteniéndose un valor de 0.58 ± 0.39 g SSVLM/g DQOs, siendo superior a las reportadas en reactores de enriquecimiento por Korkakaki et al., (2016) quienes obtuvieron una $Y_{x/s}$ de 0.2 g SSVLM/g DQO, mientras que Johnson et al., (2010) reportaron $Y_{x/s}$ de 0.19 a 0.42 mmol C/mmol C de acetato. Estos últimos autores realizaron un balance global de masa, donde la mayoría del carbono fue dirigido a CO_2 , siendo esta última la ruta seguida más probable en el presente trabajo.

El valor obtenido en el presente estudio indicó que más del 50% del sustrato consumido fue usado para crecimiento, lo que condujo a una tasa alta de crecimiento de biomasa típica de reactores aerobios. Debido a ello, durante la operación del reactor se observó el crecimiento continuo en la concentración de biomasa, por lo que el exceso de sólidos fue purgado cada día para mantener una concentración de sólidos constante de alrededor de 2.0 g SSVLM/L (2.13 ± 0.35 g SSVLM/L), lo que resultó en un tiempo de retención celular (TRC) promedio de 3.8 días.

A pesar del bajo tiempo de retención de los microorganismos dentro del sistema, se considera que este factor no fue un parámetro limitante para la acumulación de PHA, pues los Organismos Acumuladores de Fosfato (PAO por sus siglas en inglés) capaces de acumular PHA, tienen un tiempo de duplicación de 1.25 d (Lopez-Vazquez et al., 2009). En este sentido, Coats et al., (2016) y Albuquerque et al., (2011) reportaron la producción de PHA con valores de TRC de 1, 4 y 10 días, mientras que Chua et al., (2003) reportó una alta acumulación de PHA con un TRC de 3 días, por lo que se infiere que el TRC mínimo necesario para la selección de microorganismos acumuladores de PHA se encuentra por debajo de los TRC observado en el presente trabajo.

6.2.7 Efecto de la relación C/N sobre la acumulación de PHB de un cultivo mixto

Se evaluó el efecto de la relación C/N sobre la acumulación de PHB en el cultivo mixto aclimatado (13.3; 25.2; 35.1 y 41.2), tomando como control la relación C/N utilizada durante el enriquecimiento (23.2).

- Perfil cinético de un ciclo de operación del reactor de enriquecimiento a una C/N de 23.2 (control)

En el día 30, se evaluó la dinámica de consumo de sustrato y producción de PHB en un ciclo de operación. Para este ciclo, la relación C/N del lixiviado alimentado fue de 23.2, la cual se consideró como control al tratarse de un ciclo típico durante el enriquecimiento.

La concentración de OD al inicio del ciclo fue de 6.92 mg O₂/L (Figura 6.8a), la cual decayó considerablemente con la adición del influente hasta un valor de 0.07 mg O₂/L manteniéndose en valores entre 0.07 y 0.18 mg O₂/L por 74 minutos, tiempo en el cual los AGV fueron consumidos. La disminución en la concentración de OD fue debida a la utilización del oxígeno para la oxidación de la materia orgánica, la cual consecuentemente disminuyó de 350 a 200 mg C/L en los primeros 120 minutos, manteniéndose constante hasta los 420 minutos, para disminuir al final del ciclo a 50 mg C/L.

En la etapa de saciedad, el PHB fue acumulado a partir del consumo de los AGV (Figuras 6.8a y b), con un rendimiento (Y_{p/s}) de 0.103 mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido y acumulado a una tasa específica (q_{sPHB}) de 0.066 g PHB/g SSVLM·h y alcanzando una máxima acumulación después de 90 minutos de 16.8% (Figura 6.8a).

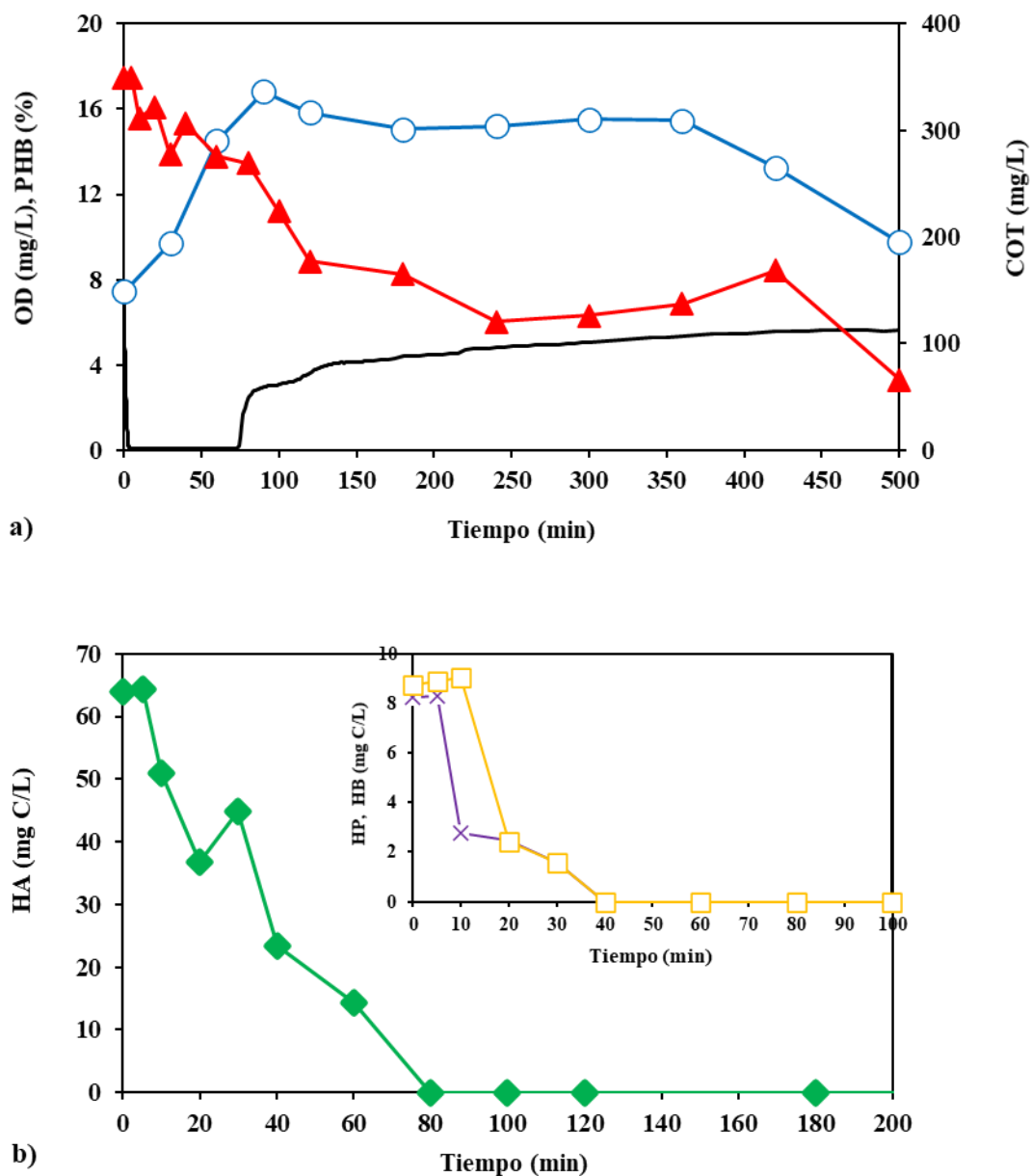


Figura 6.8 Perfil cinético típico de un ciclo de operación a una relación C/N de 23.2.

a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP y □ HB.

Una vez que los AGV fueron consumidos, las actividades metabólica y respiratoria disminuyeron de forma apreciable, lo cual se reflejó en el aumento gradual de la concentración OD después de 75 minutos (Figuras 6.8a y b). Este aumento en la concentración de OD fue el indicador del cambio entre la etapa de saciedad y la de ayuno.

Se pudo observar un residual de COT que corresponde con compuestos orgánicos que no fueron consumidos durante los 500 minutos de aireación. Esta fracción residual se considera materia recalcitrante o, que no puede ser usado para la síntesis de PHA, por lo que su presencia se considera un factor que puede afectar el proceso global de producción a largo plazo o si estos se presentan en una mayor fracción en el influente. En este sentido, Tyrrel et al., (2008) mencionan que ácidos húmicos, además de otros compuestos recalcitrantes pueden formarse durante el proceso de composteo y estar contenidos en los lixiviados; mientras que Liu et al., (2020) y Liao et al., (2018) reportaron que los ácidos húmicos son difícilmente utilizados por un cultivo mixto enriquecido en biomasa acumuladora de PHA.

La acumulación alcanzada en esta cinética fue de más del doble en comparación con la obtenida por el inóculo, lo cual indica que la fracción contenida de estos compuestos no viables para la síntesis de PHA no tuvo un efecto al encontrarse en concentraciones bajas, demostrando que la estrategia de operación aplicada (ADA), en conjunto con el uso de lixiviados de composteo de la FORSU permitió enriquecer el cultivo en microorganismos acumuladores de PHA.

Sin embargo, los resultados de acumulación obtenidos son inferiores a los reportados por Korkakaki et al., (2016), quienes obtuvieron una acumulación del 20.2% de PHA debido a que usaron un lixiviado producido en condiciones controladas.

Concluyendo, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los lixiviados pueden ser utilizados para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA, aunque es necesario identificar que compuestos están presentes que no pueden ser utilizados para la producción de PHA, y que, además, pueden resultar en un efecto negativo para el cultivo, limitando su potencialización.

- Efecto de la variación en la relación C/N sobre la acumulación de PHB

El primer ensayo de variación en la relación C/N se llevó a cabo a partir del aumento en la concentración de amonio, adicionando cloruro de amonio (NH_4Cl) para obtener una relación C/N de 13.3.

Esta cinética se comportó de manera similar al control, en este caso la concentración inicial de OD disminuyó de 5.18 mg O_2/L hasta 0.014 mg O_2/L (Figura 6.9a) en minuto y medio después de iniciado el ciclo, siendo esto debido al consumo del COT, el cual consecuentemente disminuyó de 414.09 mg C/L a 142.67 mg C/L durante los primeros 180 minutos, para mantenerse constante durante el resto del ciclo (Figura 6.9a).

El perfil de consumo del HA nuevamente marcó la transición de la etapa de saciedad a la de ayuno, lo cual ocurrió en el minuto 120 (Figura 6.9b), simultáneamente, se registró la acumulación de PHB, alcanzando su valor máximo valor después del minuto 90, correspondiendo a un 14% acumulado (Figura 6.9a). El rendimiento de PHB (Yp/s) a partir del HA fue de 0.093 mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido y una tasa específica (qsPHB) de 0.042 g PHB/g SSVLM·h.

Los resultados obtenidos sugieren que la disminución en la relación C/N 23.2 a 13.3 no afectó la capacidad de acumulación de PHB del cultivo con respecto al control, el único efecto se reflejó en el perfil de consumo de amonio, ya que, al encontrarse en exceso, este demoró en ser consumido, agotándose hasta la etapa de ayuno. El perfil de consumo de amonio fue similar al observado por Johnson et al., (2010) a relaciones C/N bajas caracterizado por el agotamiento del amonio durante la etapa de ayuno, mientras que en todas las otras relaciones C/N el amonio fue consumido durante los primeros 60 minutos del ciclo.

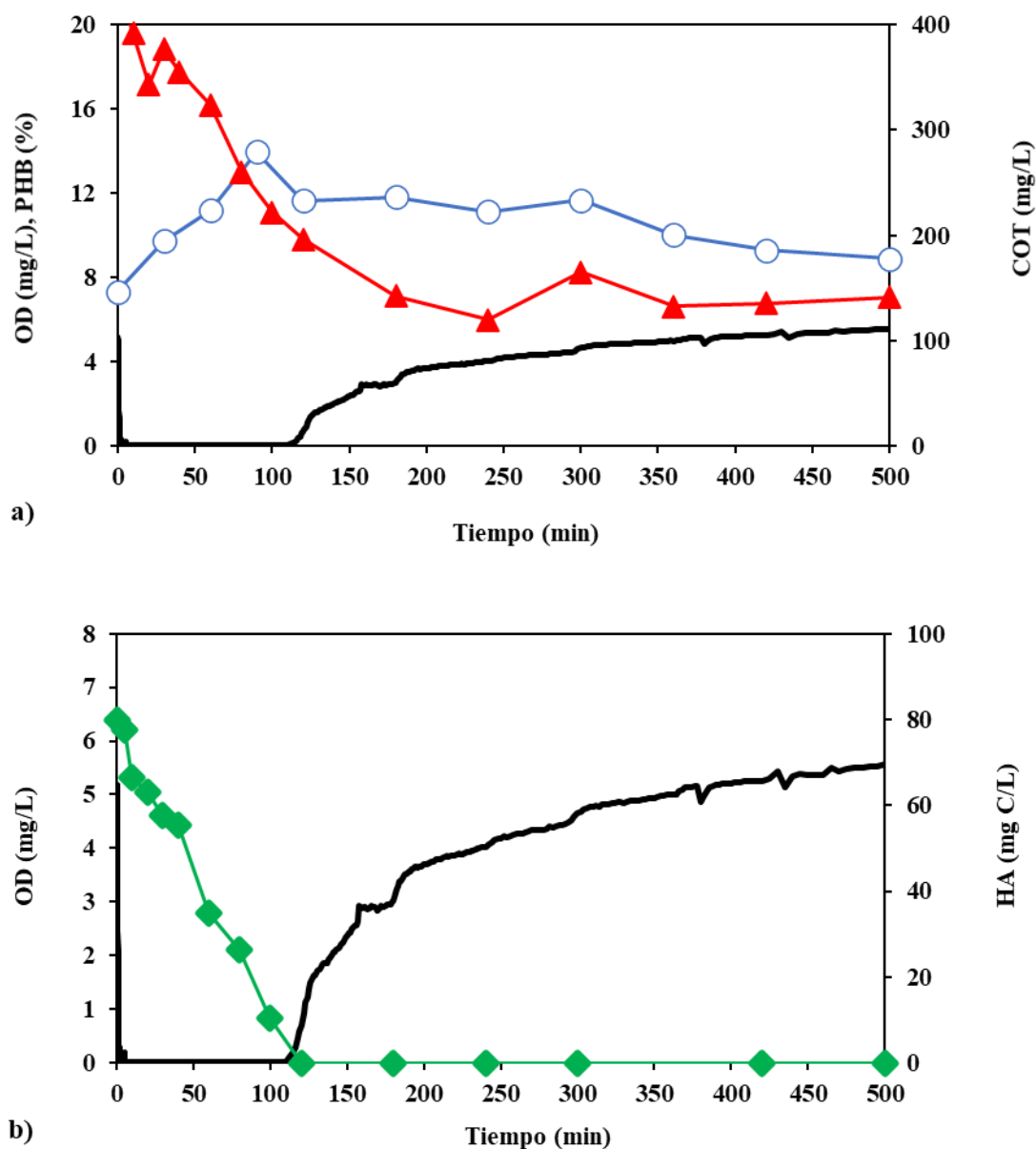


Figura 6.9 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 13.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. B) Perfil de consumo de ♦ HA.

La acumulación obtenida para esta relación C/N fue similar a la de Ramírez, (2009) quien reportó una acumulación de PHB del 15% a una C/N de 7, utilizando como fuente de carbono una mezcla de HA y HP en una proporción 70/30; y ligeramente superior a la de Johnson et al., (2010) quienes reportaron un máximo de acumulación de PHB de 9.1% a una relación C/N de 9.4 usando acetato.

De los resultados obtenidos para esta cinética se puede inferir que mientras el lixiviado presente una relación C/N entre 13.3 y 23.2 puede ser empleado para el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA sin tener efectos adversos durante el proceso, además, permite prescindir de la adición externa de nitrógeno o un previo paso de remoción del mismo.

Una vez analizado el comportamiento del sistema a una C/N de 13.3, se adicionó HA mineral al medio de alimentación para incrementar la relación C/N a valores de 25.2, 35.1 y 41.2, evaluando el efecto de esta variable sobre el proceso de acumulación de PHA.

Para el ensayo cinético de la relación C/N de 25.2 el OD tuvo un comportamiento semejante al de las anteriores relaciones C/N, con la diferencia que la concentración no llegó a un valor cercano a cero (Figura 6.10a), además, se registró un incremento casi inmediato en la concentración de OD, seguido de un comportamiento errático haciendo que la distinción entre la etapa de saciedad y ayuno no fuera posible.

La velocidad de consumo de materia orgánica disminuyó con respecto a los anteriores experimentos, observándose un consumo muy lento al inicio del ciclo (Figura 6.10a). La concentración de COT después de 420 minutos de aireación fue de 95.2 mg/L, quedando este residual sin oxidar.

Otro efecto observado fue en el perfil de consumo del HA y HV, los cuales presentaron una fase lag de 60 minutos en su consumo (Figura 6.10b), provocando que el HA fuera el último AGV en agotarse, tardando 420 minutos.

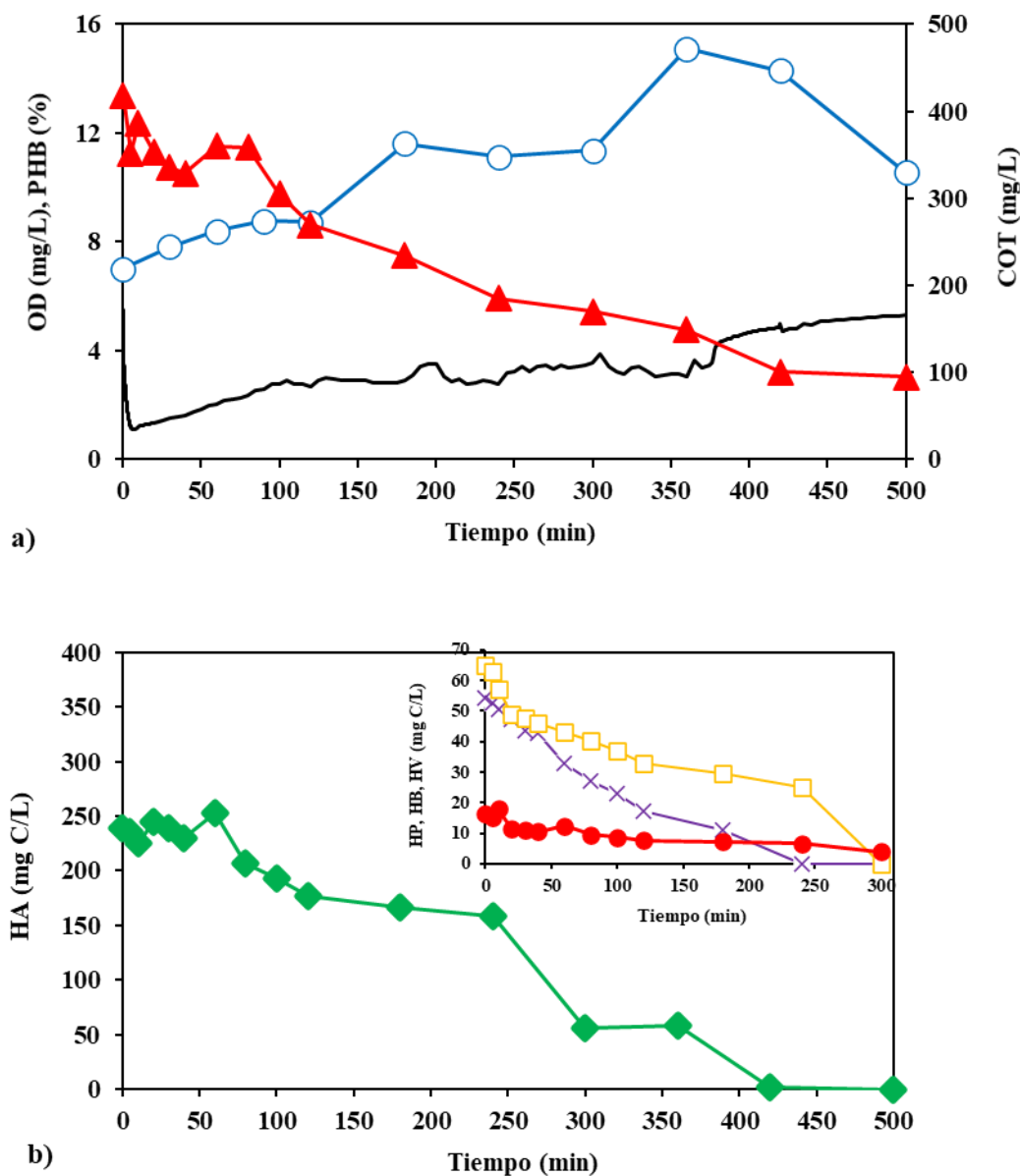


Figura 6.10 Perfil cinético típico de un ciclo de operación a una relación C/N de 25.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. B) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV.

Debido al lento consumo de HA registrado, también la síntesis de PHB fue más lenta, resultando en una tasa específica (q_s PHB) de 0.012 g PHB/g SSV·h, siendo este valor más bajo que el reportado para las anteriores relaciones C/N, mientras que la máxima acumulación de PHB fue de 15.1%, la cual se logró cuatro veces más tarde con respecto al ensayo control, es decir 270 minutos más tarde (Figura

6.10a). Este comportamiento fue reportado por Ahn et al., (2015) quienes observaron que los perfiles de acumulación y el tiempo en que se alcanza el máximo contenido de PHA dependen de la relación C/N.

A pesar del aumento en la relación C/N, el máximo de PHB acumulado fue similar al reportado para las relaciones C/N de 23.2 y 13.3; sin embargo, el exceso en la fuente de carbono tuvo un efecto desfavorable sobre el rendimiento ($Y_{p/s}$) a partir de HA, disminuyendo a un valor de 0.036 mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido. Adicionalmente, este experimento permitió concluir que el uso de una relación C/N de 25.2 en el influente puede ser empleada durante el enriquecimiento, con la ventaja de poder operar con una cantidad significativamente mayor de fuente de carbono, sin afectar la máxima acumulación de PHB alcanzada por el cultivo, siendo el tiempo requerido el inconveniente.

Al incrementar la relación C/N a 38.1 se observó un comportamiento del OD visiblemente más errático que el encontrado con la relación 25.2, así como la ausencia de una distinción entre la etapa de saciedad y la de ayuno (Figura 6.11a).

El efecto observado en la relación C/N de 25.2 se vio intensificado haciendo más notoria la fase tardía de consumo del COT, HA y HV (Figuras 6.11a y b), además, se registró un residual del carbono del HA de 101.1 mg/L al final del ciclo (Figura 6.11b). Esto parece indicar que la concentración de carbono en este ensayo se encontraba en exceso, provocando un retraso considerable en los periodos de consumo de sustrato, además que el cultivo fue incapaz de consumir en su totalidad el HA.

Así mismo, este exceso de carbono, influyó en el máximo de acumulación de PHB, ya que fue alcanzado a los 420 minutos, con un valor de 10.5% (Figura 6.11a), siendo este inferior al reportado por las cinéticas anteriores, además, el retardo en la síntesis de PHB fue más de 4 veces con respecto al control, resultando en un valor en la q_s PHB de 0.006 g PHB/g SSVLM·h, y un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.017 mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido.

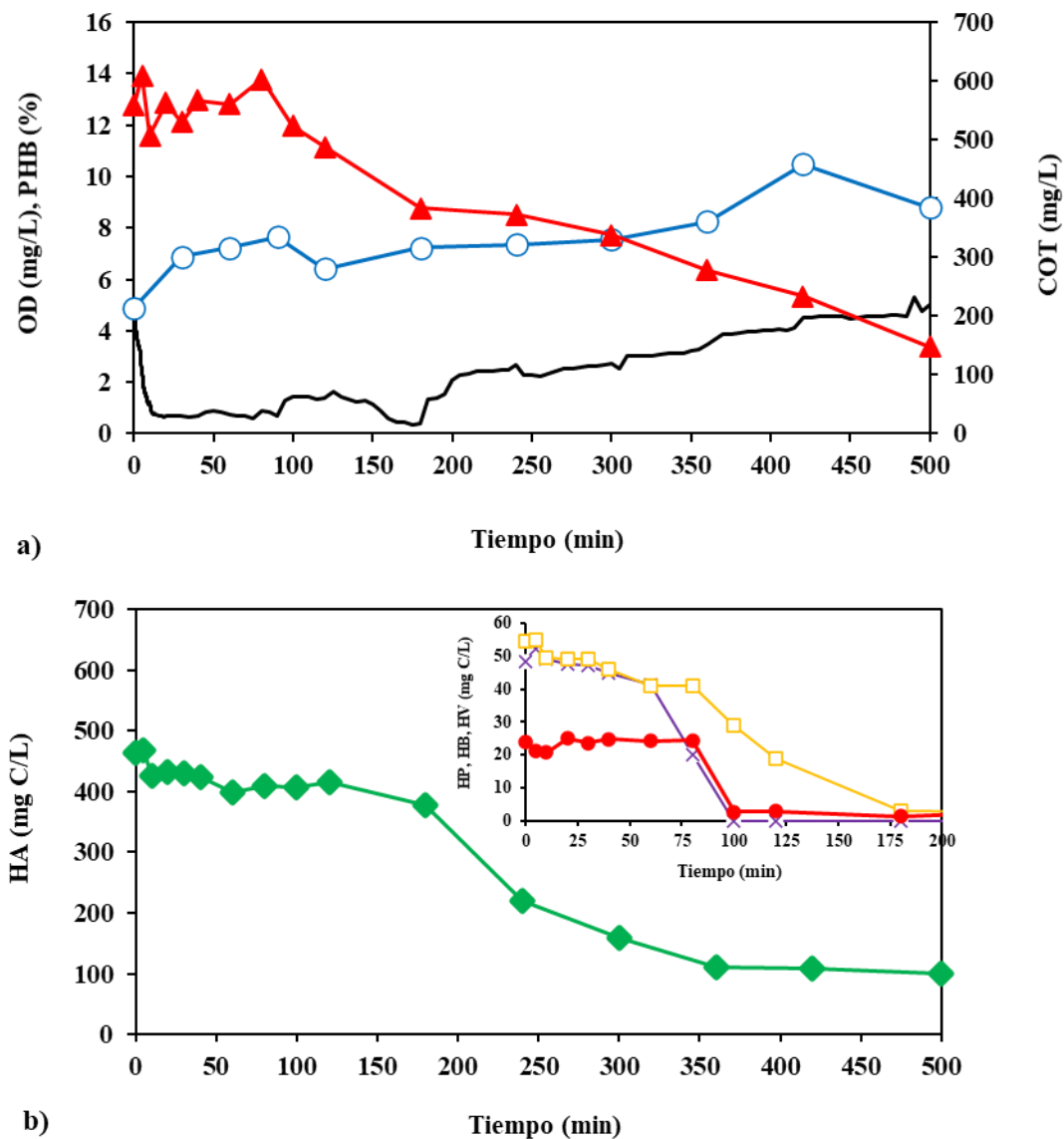


Figura 6.11 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 38.1. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV.

Diversos autores (Monroy y Buitrón, 2020; Molina, 2016; Kumar et al., 2004) han reportado una relación directa entre el aumento en la relación C/N y la acumulación de PHA; sin embargo, los resultados del presente estudio entran en contradicción con estos hallazgos, probablemente debido al aumento significativo entre la relación F/M empleada durante el enriquecimiento (0.48) en comparación a la alcanzada para esta relación F/M (0.85) causando un efecto negativo en la biomasa

consecuencia del aumento en la relación C/N. Este factor determinó que una fracción de carbono no fuera asimilada, afectando la capacidad de acumulación de PHB. En este sentido, Qu y Liu, (2009) reportaron que la alta concentración de sustrato inhibe su propio consumo, resultando en una disminución de los rendimientos de PHB, mientras que Albuquerque et al., (2007) indican que un cultivo mixto de microorganismos acumuladores de PHA, enriquecido usando melazas fermentadas, fue susceptible a la inhibición cuando se alimentó con HA a altas concentraciones, fenómeno que pudo presentarse en el presente trabajo derivado del aumento en la relación C/N.

Finalmente, en la relación C/N de 41.2 el OD se comportó como en las cinéticas con relaciones C/N de 25.2 y 38.1, donde la etapa de ayuno estuvo ausente. La concentración de OD disminuyó con la adición de la fuente de sustrato, aumentando de manera casi inmediata (Figura 6.12a).

Nuevamente se registró una fase lag en el perfil de consumo de COT al igual que en las cinéticas a C/N de 25.2 y 38.1, quedando esta vez un residual de 244.5 mg/L al final del ciclo (Figura 6.12a), siendo este más del doble registrado para la relación C/N de 38.1. Como resultado del exceso en la fuente de carbono, el HA se consumió en un 52% con respecto al valor de su concentración inicial (Figura 6.12a).

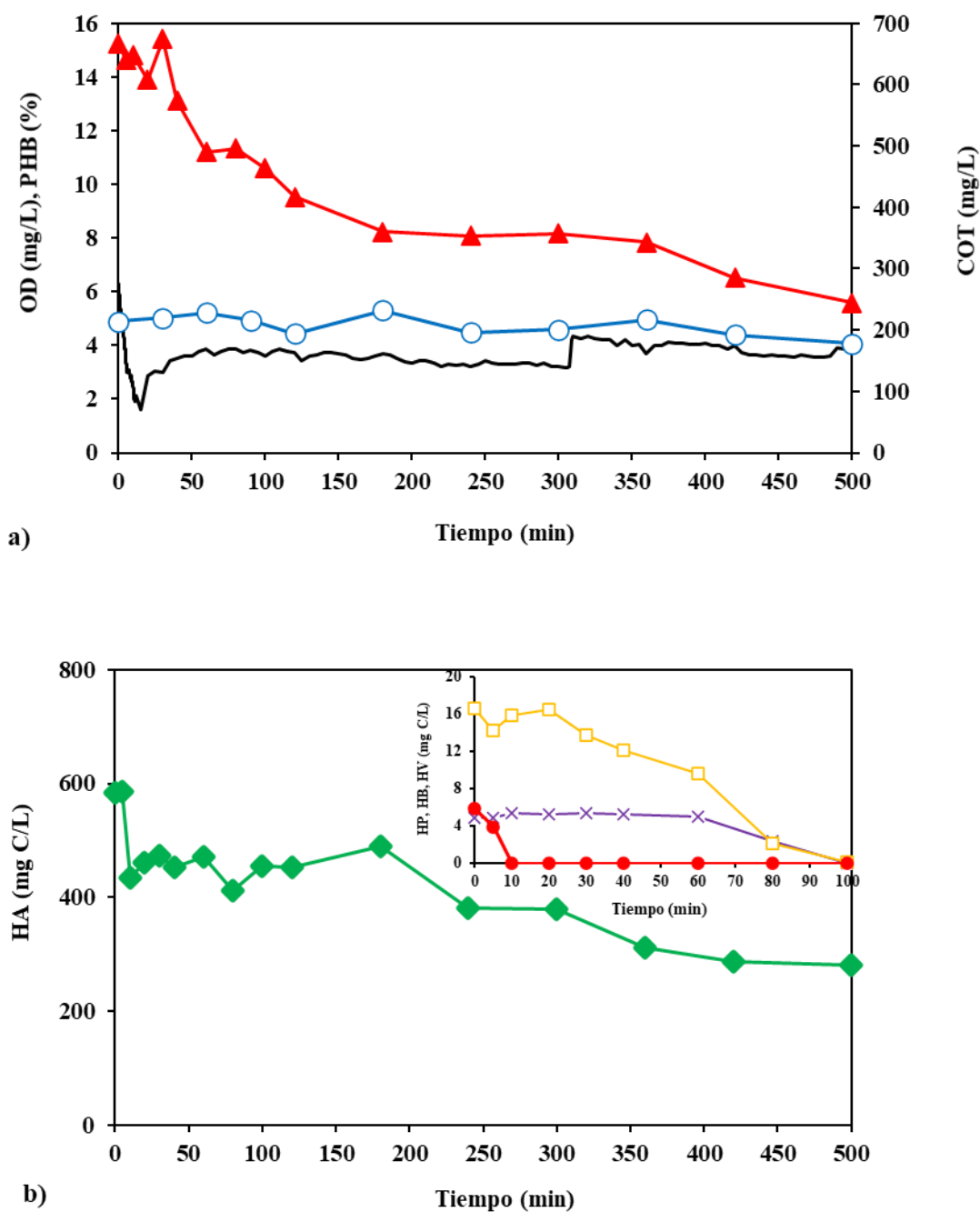


Figura 6.12 Perfil cinético de un ciclo de operación a una relación C/N de 41.2. a) — OD, ▲ COT, ○ PHB. b) Perfil de consumo de AGV, ◆ HA, × HP, □ HB y ● HV.

Debido al exceso de carbono, no se observó una diferencia en el máximo de PHB acumulado con respecto al inicial siendo de 5.71 y 4.9%, respectivamente (Figura 6.12a), resultando en que la tasa específica (q_s PHB), así como el rendimiento de PHB (Y_p/s) disminuyeran a cero, la máxima acumulación fue considerablemente inferior al ensayo control e incluso al obtenido con el inóculo (6.61%).

Esta baja acumulación confirma la inhibición en la biomasa causada por el aumento en la relación C/N, la cual pudo ser inducida por condiciones de estrés producidas por la sobrecarga de materia orgánica, derivada del aumento de la relación F/M, ya que la F/M aplicada para la relación C/N de 41.2 fue de 0.93, siendo casi del doble que la aplicada en el ensayo control (0.48), misma que fue utilizada durante la operación del SBR en la etapa de enriquecimiento.

Comparando las cinéticas obtenidas en el presente estudio se pudo observar que las relaciones C/N de 13.3 a 25.2 tuvieron un comportamiento similar con respecto a la cinética control (C/N de 23.2), con un consumo de HA durante las primeras horas del ciclo (Figura 6.13a) y la simultánea acumulación de PHB. Sin embargo, en la relación de 25.2, se observó un retardo para alcanzar la máxima acumulación de PHB, tardando 4 veces más con respecto a la cinética control (Figura 6.13b).

Al incrementar la relación C/N a 38.1 y 41.2 el carbono del ácido acético (C_{HA}) no fue completamente consumido (Figura 6.13a). Esto afectó la capacidad del cultivo de acumular PHB, así como su rendimiento, los cuales disminuyeron hasta un valor de cero para la C/N más alta. Este comportamiento sugiere que la fuente de carbono en las relaciones C/N de 38.1 y 41.2 estaba presente en exceso, induciendo la inhibición de la ruta de síntesis de PHB, así como la extensión de la fase de saciedad resultando en la ausencia de la etapa de ayuno.

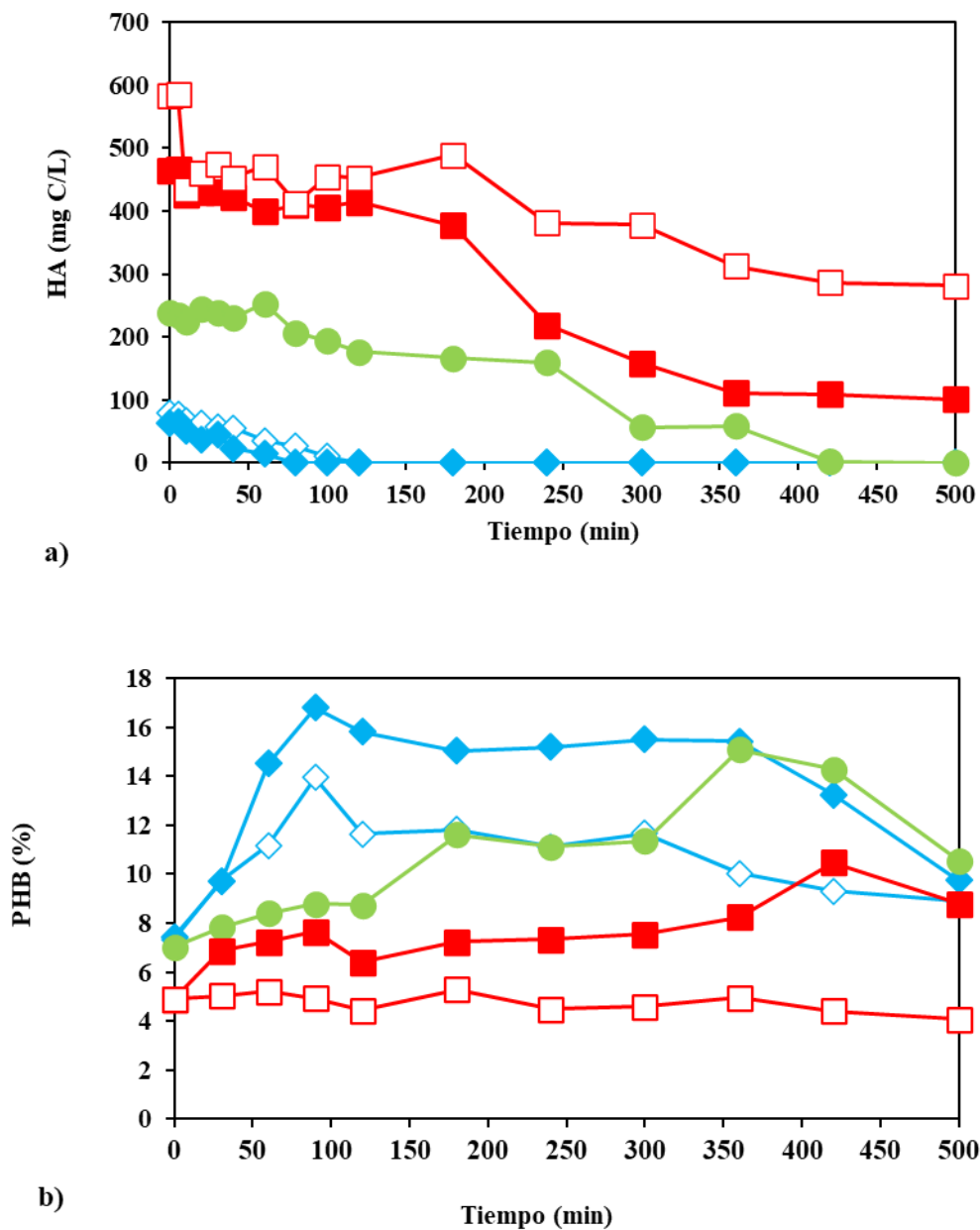


Figura 6.13 Perfil de relaciones C/N: ◇ 13.3, ◆ 23.2, ● 25.2, ■ 38.1, □ 41.2. figura a) HA, en figura b) PHB.

La acumulación de PHB para las relaciones C/N de 13.3, 23.2 y 25.2 fueron de 14.0, 16.8 y 15.1%, siendo ligeramente superiores a las reportadas por Bengtsson, et al., (2008), quienes alcanzaron 11% de acumulación de PHA usando agua residual fermentada de la industria del papel, con una composición predominante en acetato. Del mismo modo, Liu et al., (2008) alcanzaron el 11% de acumulación de PHA

usando agua residual cruda de la industria del tomate, mientras que Morgan-Sagastume et al., (2015) obtuvieron un 8.7% usando lodos fermentados provenientes de una planta de desechos de estabilización de lodos.

Otros autores como Korkakaki et al., (2016) y Colombo et al., (2017) alcanzaron acumulaciones de 20.2 y 36.3%, respectivamente, utilizando lixiviados de la FORSU, producidos bajo condiciones controladas. Korkakaki et al., (2016) operaron un reactor hidrolítico y un UASB en serie, con recirculación del efluente metanogénico al hidrolítico. Adicionalmente, las condiciones operacionales del SBR de enriquecimiento fueron temperatura controlada a 30 °C, la cual favorece la actividad de bacterias mesofílicas y una agitación de 750 rpm, mejorando la superficie de contacto sustrato/microorganismos.

Por su parte, Colombo et al., (2017) mejoraron considerablemente el proceso de obtención de lixiviados a partir de FORSU empleando dos reactores en serie. El efluente del primer reactor (digestor anaerobio completamente agitado), fue empleado para humedecer la FORSU del reactor acidogénico (segundo reactor). El lixiviado resultante, con un alto contenido de AGV, fue centrifugado y el sobrenadante fue sometido a un tratamiento para eliminar el NH_4^+ , obteniendo así un sustrato limitado en nitrógeno idóneo para el enriquecimiento y la producción de PHA.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio, indican que la capacidad de acumulación de PHB de un cultivo mixto enriquecido es dependiente de la composición del medio de alimentación, la cual puede afectar considerablemente el proceso cuando se presentan condiciones de desbalance entre el nitrógeno y la fuente de carbono, siendo la presencia de este último en exceso, la causante de la inhibición en la síntesis de PHB y de consumo de la misma fuente de carbono.

Con respecto a la remoción de PO_4^{3-} , la Figura 6.14 muestra los perfiles de consumo para las distintas relaciones C/N probadas, los cuales se caracterizaron por presentar una fase inicial de retardo promedio de 30.4 ± 9.52 minutos, para después ser consumido con una eficiencia de remoción máxima de 75.3% para la relación C/N de 38.1. En estos perfiles se observó un consumo preferente de materia

orgánica al inicio del ciclo y, una vez agotados los compuestos orgánicos, se observó la absorción del fósforo. Rodgers y Wu, (2010) reportaron este comportamiento mencionando que, en condiciones aerobias, el fósforo no es absorbido si hay un exceso de carbono orgánico disponible.

Se confirmó que el fósforo removido fue utilizado para la síntesis de PHB, ya que los ATP necesarios para el transporte del acetato al interior de la célula y su posterior activación a acetil-CoA provienen del fósforo inorgánico absorbido del medio en presencia de O_2 (Pereira et al., 1996; Satoh et al., 1992).

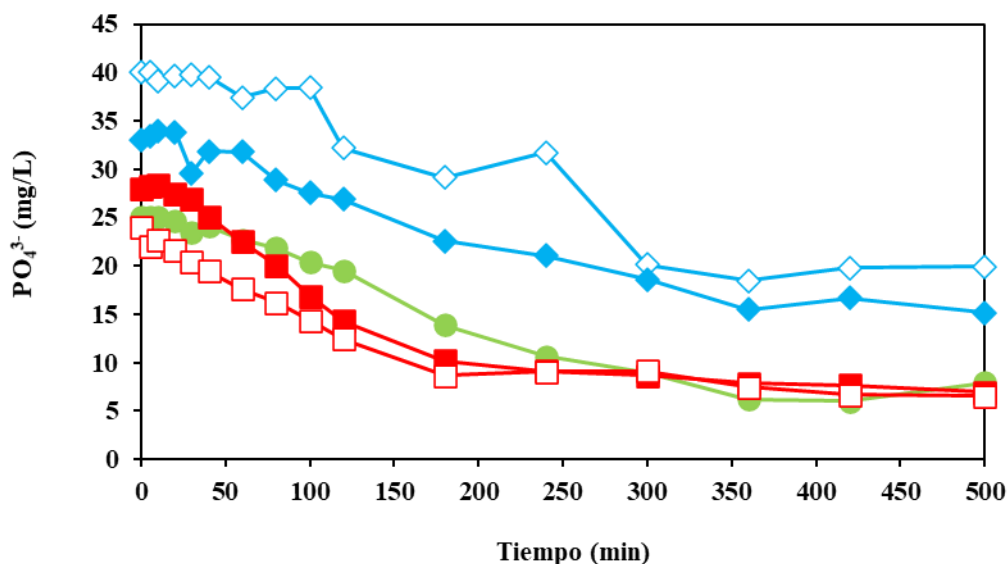


Figura 6.14 Perfil de consumo de PO_4^{3-} para las relaciones C/N: $\diamond$ 13.3, $\blacklozenge$ 23.2, $\bullet$ 25.2, $\blacksquare$ 38.1, $\square$ 41.2.

- ANOVA análisis estadístico del efecto de la relación C/N sobre la acumulación de PHB

Se realizó la prueba de Shapiro–Wilk para verificar la normalidad de los datos obtenidos, posteriormente se analizaron estadísticamente para validar que la variación en los resultados de acumulación de PHB se debió a un efecto real del cambio en la relación C/N. Para ello se compararon los valores promedio de PHB para las diferentes relaciones C/N a partir de un ANOVA, (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 ANOVA para la comparación de medias del PHB a diferentes relaciones C/N mediante una prueba de Tukey.

Relación	Datos	Subconjunto para alfa = 0.05		
C/N	N	1	2	3
41.2	2	5.325		
38.1	2	10.510	10.510	
13.3	2		13.980	13.980
25.2	2		15.100	15.100
23.2	2			16.805

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Los resultados obtenidos del análisis muestran que relaciones C/N superiores a 25.2, como por ejemplo 38.1 y 41.2, afectaron negativamente la capacidad de acumulación de PHB, siendo inversamente proporcional, al aumento en la relación C/N. Además, no se observó una diferencia significativa en la capacidad de acumulación de PHB para las relaciones C/N de 13.3, 23.2 y 25.2 ($P > 0.05$). En este caso, se debe tomar en cuenta que para la relación de 13.3 se adicionó cloruro de amonio, mientras que para la de 25.2 se adicionó acetato de sodio, lo cual implica un gasto extra desde el punto de vista económico, por lo que alimentar el cultivo con los lixiviados sin suplementar (C/N 23.2) permite la mayor acumulación de PHB sin incrementar los costos.

- Balance de carbono

El cultivo mixto aclimatado mostró tener una alta capacidad de remoción de AGV, alcanzando un valor de 100% para las relaciones C/N de 13.3, 23.2 y 25.3. A pesar de ello, el máximo porcentaje de acumulación de PHB fue de sólo el 16.8%, lo que indica que sólo una fracción los AGV consumidos fueron dirigidos a la acumulación de PHB.

Con base en lo anterior, se realizó el balance de carbono para cada relación C/N aplicada, con la finalidad de hacer un bosquejo de las rutas metabólicas seguidas por el carbono (Tabla 6.3).

El balance para las diferentes relaciones C/N evaluadas, muestra que el C_{HA} y el de otros AGV fueron consumidos, pero no incorporados a PHB. En este sentido, la máxima fracción de carbono de AGV (C_{AGV}) incorporada a PHB fue observada en la relación C/N de 13.3, con un 9.4%; sin embargo, con el incremento en la concentración de la fuente de carbono, la fracción de C_{AGV} incorporado a PHB disminuyó, alcanzando un valor cercano a cero con la C/N de 41.2 (Tabla 6.3).

Tabla 6.3 Balance de carbono incorporado a PHB para cada relación C/N

C/N	C_{AGV} Inicial (mg/L)	Total Consumido (mg C_{AGV})	PHB formado (mg C-PHB)	C_{AGV} Incorporado a PHB (%)
13.3	79.9	79.92	7.5	9.38
23.2	80.9	80.91	6.63	8.69
25.2	190.0	361.01	8.78	2.43
38.1	168.5	479.01	6.43	1.34
41.2	116.6	323.33	0.056	0.01

El resumen de los datos indicó que la mayor parte de los AGV fueron consumidos para crecimiento y mantenimiento celular, siendo mínima la fracción dirigida a la síntesis de PHB. Estos resultados son similares a los reportados por Narancic et al., (2016), quienes emplearon *Rhodospirillum rubrum* como cepa para la síntesis de PHB, identificando que únicamente el 15% del acetato consumido fue incorporado en PHB y el resto se asimiló como biomasa bacteriana. Este fenómeno se confirma en el presente estudio a partir del alto valor del coeficiente de rendimiento celular ($Y_{x/s}$) obtenido durante la etapa de enriquecimiento, con un valor de 0.58 (g SSVLM/g DQOs). En este caso, se considera que el consumo de HA condujo a la formación de acetyl-CoA, la cual se desvió al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para mantenimiento celular, así como también a la formación de CO_2 en lugar de la ruta formación de PHB (Johnson et al., 2010; Lemos et al., 1998; Satoh et al., 1992). Este desvío en las rutas metabólicas se intensificó con el incremento en la relación C/N a 41.2.

Además de los efectos en los parámetros anteriormente mencionados, la modificación en la relación C/N, basada en el incremento en la concentración de HA, indujo un cambio en la proporción de las especies de AGV (HA; HP, HB y HV). Esto produjo una condición desbalanceada en las proporciones de AGV que afectó la fracción incorporada como PHB, así como el polímero producido, dado que algunas de las otras especies de AGV también están asociadas a la síntesis de otros PHA. (Ciesielski y Przybylek, 2014; Wang et al., 2013; Kemavongse et al., 2008).

- Parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos a las distintas relaciones C/N aplicadas, con el fin de determinar el efecto de esta variable en el proceso de acumulación de carbono orgánico en forma de PHB.

En lo que respecta a la capacidad respiratoria del cultivo, lo cual se analizó midiendo la qO_2 , se puede apreciar que la mayor tasa de consumo de oxígeno se obtuvo con la relación C/N 13.3, con un valor de 4.99 mg O_2 /L·min. Este parámetro fue disminuyendo hasta un valor de 0.37 mg O_2 /L·min a una C/N de 38.1. Por su parte, la constante de primer orden de oxígeno k tuvo un comportamiento similar, disminuyendo de 1.89 a 0.09 min⁻¹ cuando la relación C/N aumentó de 13.3 a 41.2 (Tabla 6.4). Estos dos parámetros demuestran el efecto negativo que se presentó con el exceso en la fuente de carbono al aumentar la relación C/N.

Tabla 6.4 Parámetros cinéticos para las relaciones C/N.

C/N	qO ₂	k	qC-AGV	qC-A	kC-A	q _s PHB	Yp/s	% PHB
13.3	4.99	1.89	0.66	0.66	0.018	0.042	0.093	14.0
23.2*	2.48	0.80	0.98	0.85	0.026	0.066	0.103	16.8
25.2	0.68	0.30	0.90	0.62	0.009	0.012	0.036	15.1
38.1	0.37	0.09	1.35	0.95	0.004	0.006	0.017	10.5
41.2	0.51	0.12	0.56	0.50	0.0	0.0	0.0	5.3

HA: Ac. acético, mg/L.

COT: Carbono Orgánico Total, mg/L.

k: tasa de consumo de primer orden de oxígeno, min⁻¹.

PHB: polihidroxibutirato or poli-3-hidroxibutirato.

q: tasa de consumo volumétrica, mg/L·min.

q_s: Tasa específica de acumulación, g PHB/g VSS·h.

AGV: ácidos grasos volátiles (HA, HP, HB y HV), mg/L.

Yp/s: coeficiente de rendimiento, mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido.

Para la velocidad de consumo de carbono de AGV (qC-AGV) se puede apreciar que conforme se incrementó la C/N, este parámetro aumentó de 0.66 para la C/N de 13.3, a 1.35 mg C-AGV/L·min para la C/N de 38.1. Sin embargo, cuando se incrementó la C/N a 41.2, este parámetro disminuyó por debajo del encontrado para la C/N de 13.3 Tabla 6.4. Este comportamiento es semejante al reportado por Bengtsson, et al., (2008) quienes usando agua residual pre-fermentada de la industria del papel sin limitación de nutrientes obtuvieron una qAGV de 0.191 C-mol/C-mol·h; en contraste, cuando la C/N del medio de alimentación se incrementó, la velocidad se vio afectada, disminuyendo a 0.104 C-mol/C-mol·h.

Con respecto a la tasa específica de acumulación de PHB (q_sPHB) se observó un valor de 0.042 g PHB/ g VSS·h a la relación C/N más baja (13.3), la cual incrementó por arriba del 50% cuando la C/N fue de 23.2 (0.066 g PHB/ g VSS·h) (Tabla 6.4). Este comportamiento coincide con lo reportado por Serafim et al., (2004), quienes usando un medio sintético observan que la q_sPHB se incrementa conforme aumenta la C/N. Sin embargo, cuando la C/N se incrementó hasta 41.2, este parámetro disminuyó significativamente hasta cero.

Los coeficientes de rendimiento $Y_{p/s}$ más altos fueron alcanzados por las relaciones C/N de 13.3 y 23.2, con un valor de 0.093 y 0.103 mg C-PHB producido/mg C_{HA} consumido, respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Serafim et al., (2004), quienes utilizando un medio mineral rico en acetato observaron un incremento en el rendimiento de 0.49 a 0.68 mmol C-PHB/mmol acetato cuando a relación C/N aumentó de 10.71 a 42.85, respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 6.4 la mayoría de los parámetros obtenidos fueron afectados de forma negativa cuando la relación C/N fue mayor a 25.2, es decir, el exceso de fuente de carbono resultó en una inhibición en su propio consumo, así como en capacidad del cultivo para almacenar PHB.

6.3 Efecto de la carga orgánica volumétrica sobre la acumulación de PHB en un SBR a escala laboratorio.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la carga orgánica volumétrica, sobre la acumulación de PHB, se operó un SBR bajo la misma configuración operacional empleada durante la etapa de enriquecimiento y usando un inóculo fresco. Para llevar a cabo este experimento se utilizó un lote de lixiviados con un contenido de materia orgánica soluble de 65.18 ± 0.18 g/L, la cual representó el 89% con respecto a la total, el único AGV detectado en este lote fue el HA con una concentración de 4.83 ± 0.23 g/L.

6.3.1 Desempeño del SBR a diferentes cargas orgánicas

Debido a la contingencia sanitaria producida por la propagación en el contagio del virus SARS-COV-2, que impidió el acceso al laboratorio para el desarrollo de actividades experimentales, solo fue posible operar el SBR durante 38 días a dos cargas orgánicas diferentes. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Durante la primera etapa de operación (21 días), el SBR fue alimentado a una carga orgánica de 2.01 ± 0.12 g DQOs/L·d. Bajo estas condiciones de operación el reactor

registró una eficiencia de remoción promedio de la materia orgánica soluble de $67.83 \pm 4.83\%$ (Figura 6.15).

En el día 22 de operación la carga orgánica fue incrementada a 3.88 ± 0.19 g DQOs/L·d, con el cambio en la carga orgánica se observó una pérdida en la eficiencia de remoción de la DQOs, la cual disminuyó a un valor promedio de $39.71 \pm 11.04\%$ (Figura 6.15).

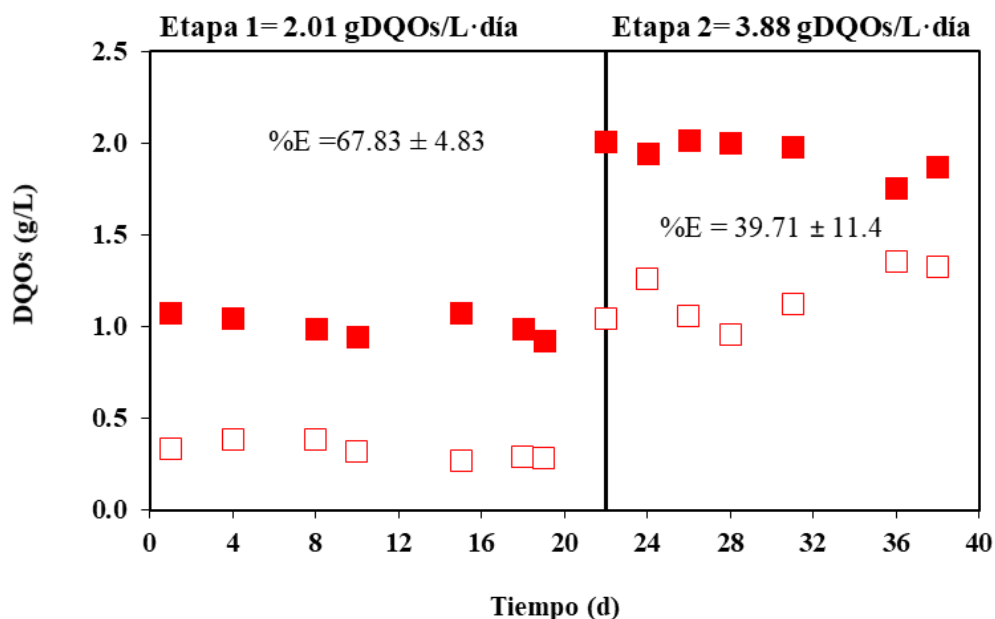


Figura 6.15. Perfil de DQOs del reactor SBR con aumento de cargas:

■ Influyente, □ efluente.

Los resultados obtenidos en este experimento indican que el cultivo mixto enriquecido fue afectado negativamente con el aumento en la carga orgánica, observándose una pérdida paulatina en la capacidad de asimilación del sustrato (Tabla 6.5), causada por la exposición a una mayor concentración de lixiviados de composteo de la FORSU, como resultado del cambio entre la etapa uno a la dos. Como se mencionó en la sección 6.2.5, autores como Liu et al., 2020; Liao et al., 2018 y Tyrrel et al., 2008 mencionan que los lixiviados de composteo de la FORSU pueden contener ácidos húmicos u otros compuestos, los cuales no son utilizados por el cultivo o se usan muy poco, lo que puede resultar en una acumulación de estos en el sistema.

Respecto al perfil del HA se registró una concentración promedio en el influente para la etapa 1 y 2 de 41.35 ± 3.59 y 82.72 ± 6.87 mg C_{HA} /L respectivamente, el cual fue consumido completamente en ambas etapas debido a la biodisponibilidad de esta fuente de carbono (Tabla 6.5), adicionalmente, en los experimentos del efecto de la variación en la relación C/N, revelaron que el cultivo mixto empleado demostró ser capaz de remover 239 mg C_{HA} /L (C/N 25.2) a lo largo del ciclo de operación, por lo que el aumento en su concentración como resultado del cambio en la carga orgánica, no presentó un problema en la remoción de este compuesto.

Tabla 6.5 Parámetros obtenidos para las cargas orgánicas probadas.

Día	Etapas	EF de DQO (%)	EF de HA (%)	% PHB	C_{HA} incorporado a PHB (%)	Saciedad (h)	qO_2 (mg/L)
1	1	68.90	100.00	6.49	1.53	2.23	3.68
8		60.93	100.00	8.24	5.23	1.97	3.57
15		75.38	100.00	11.84	14.11	1.63	1.95
19		69.57	100.00	14.35	25.49	1.22	3.41
26	2	48.11	100.00	15.26	12.09	2.73	2.58
31		43.34	100.00	10.63	5.49	2.22	1.82
38		28.92	100.00	7.52	0.86	1.23	1.41

Yp/s: coeficiente de rendimiento, mg C-PHB producido C_{HA} consumido

De igual manera, también se determinó la acumulación de PHB durante la operación del SBR. Para su extracción y posterior cuantificación, se tomaron muestras al final de la etapa de saciedad que coincide con el inicio en el incremento en la saturación de OD en el licor mezclado. Esto permitió determinar el PHB acumulado en el punto máximo, antes de ser consumido por los microorganismos debido a una deficiencia de carbono biodisponible en el medio líquido.

En la Figura 6.16 se muestra el perfil de acumulación de PHB durante la operación del reactor. Al inicio de la operación del SBR (día 1), la máxima acumulación de PHB alcanzada fue de 6.49%, la cual es comparable con la reportada para el inóculo

utilizado para el arranque del SBR de enriquecimiento (6.61%) (Figura 6.16), este resultado muestra que el cultivo aún no estaba enriquecido con microorganismos acumuladores de PHB.

La acumulación de PHB fue aumentando a lo largo del tiempo de operación, alcanzado un valor de 14.36% en el día 19 de la primera etapa (Tabla 6.5), siendo este valor similar al reportado por la cinética control (C/N 23.2) realizada a los 30 días de operación, confirmando que un cultivo mixto fresco puede ser aclimatado con microorganismos acumuladores de PHB en un periodo corto usando lixiviados de composteo de la FORSU como sustrato.

Durante los primeros días de operación de la segunda etapa, la acumulación de PHB se incrementó hasta alcanzar un valor máximo de 15.26% (Tabla 6.5). Sin embargo, la tendencia creciente en la acumulación de PHB se detuvo en el día 26 (Figura 6.16), de tal forma que la capacidad de acumulación de biopolímeros comenzó a disminuir durante el transcurso de la segunda etapa, alcanzando un valor mínimo de 7.52% al final del experimento (Tabla 6.5), siendo este valor ligeramente superior al reportado al inicio de la operación del reactor.

La disminución en la acumulación de PHB fue confirmada mediante el balance de carbono de HA, donde la fracción incorporada disminuyó de 25.5% (al final de la primera etapa) a 0.9% al concluir la segunda (Tabla 6.5). Estos datos indican que a pesar de que el carbono de HA fue consumido, este fue dirigido a otra ruta metabólica siendo la formación de biomasa y CO₂ las más probables, este fenómeno fue posiblemente causado por la presencia de los compuestos contenidos en el lixiviado que pudieron afectar la actividad microbiana, causando una inhibición en la ruta de síntesis de PHB al encontrarse en mayores proporciones.

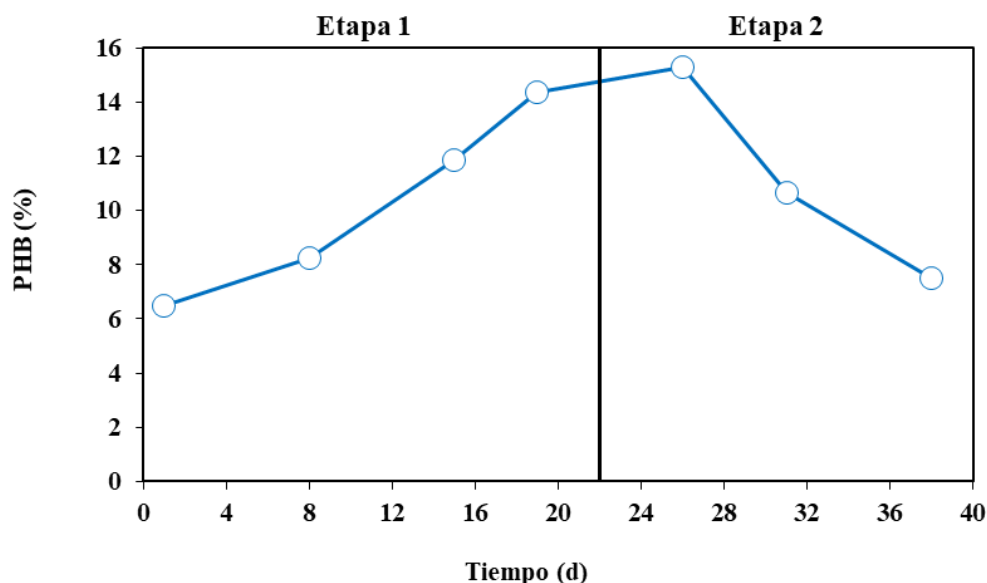


Figura 6.16. Perfil de acumulación de PHB en el SBR durante las etapas con aumento de carga: ○ %PHB.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son contradictorios a los reportados por Wen et al., (2021) quienes usaron glicerol crudo como fuente de sustrato, detectando un aumento en la máxima acumulación de PHA derivado del aumento en la carga orgánica aplicada en el influente, alcanzando 23.1, 28.41 y 32.89% de PHA acumulado, con cargas orgánicas de 1.2, 2 y 2.8 g DQO/L·d, esta contradicción puede ser explicada mediante la complejidad que presenta la composición de los lixiviados, ya que al aumentar la proporción del mismo en la alimentación, indujo un efecto negativo en la síntesis de PHB.

Comparando la acumulación de PHB obtenida en este trabajo con otros autores que también usaron lixiviados de la FORSU, se observa que fueron inferiores. Colombo et al., (2017) alcanzaron una acumulación de PHA del 36.3%, usando una carga orgánica de 1.3 g DQO/L·d. Sin embargo, su lixiviado fue el resultado de diversos tratamientos para remover componentes que interfieren en el proceso de síntesis de PHA, una centrifugación para eliminar sólidos, remoción del NH_4^+ por adición KOH, lo cual representa más operaciones unitarias que incrementan los costos y consumos energéticos. Similarmente, Korkakaki et al., (2016) registraron un 20.2%

de acumulación de PHA a una carga de 8.1 g DQO/L·d, con un lixiviado de la FORSU proveniente de un proceso controlado como se describió anteriormente.

Otro de los parámetros que resultó afectado con el aumento en la carga orgánica, fue la capacidad respiratoria (qO_2), la Figura 6.17 muestra su perfil, así como la constante de consumo de oxígeno de primer orden (k) durante la operación del reactor.

La qO_2 mostró una tendencia a mantenerse constante, con un valor promedio de 3.15 ± 0.8 mg O_2 /L, con excepción del día 15 donde se registró una disminución o un dato atípico (Figura 6.17). Sin embargo, con el aumento en la carga orgánica se observó un efecto inmediato sobre este parámetro teniendo una tendencia decreciente, llegando a un valor de 1.40 mg O_2 /L en el día 38 de operación (Tabla 6.5), este comportamiento es atribuido al incremento en el carbono orgánico contenido de los lixiviados donde algunos compuestos pudieron ser inhibitorios.

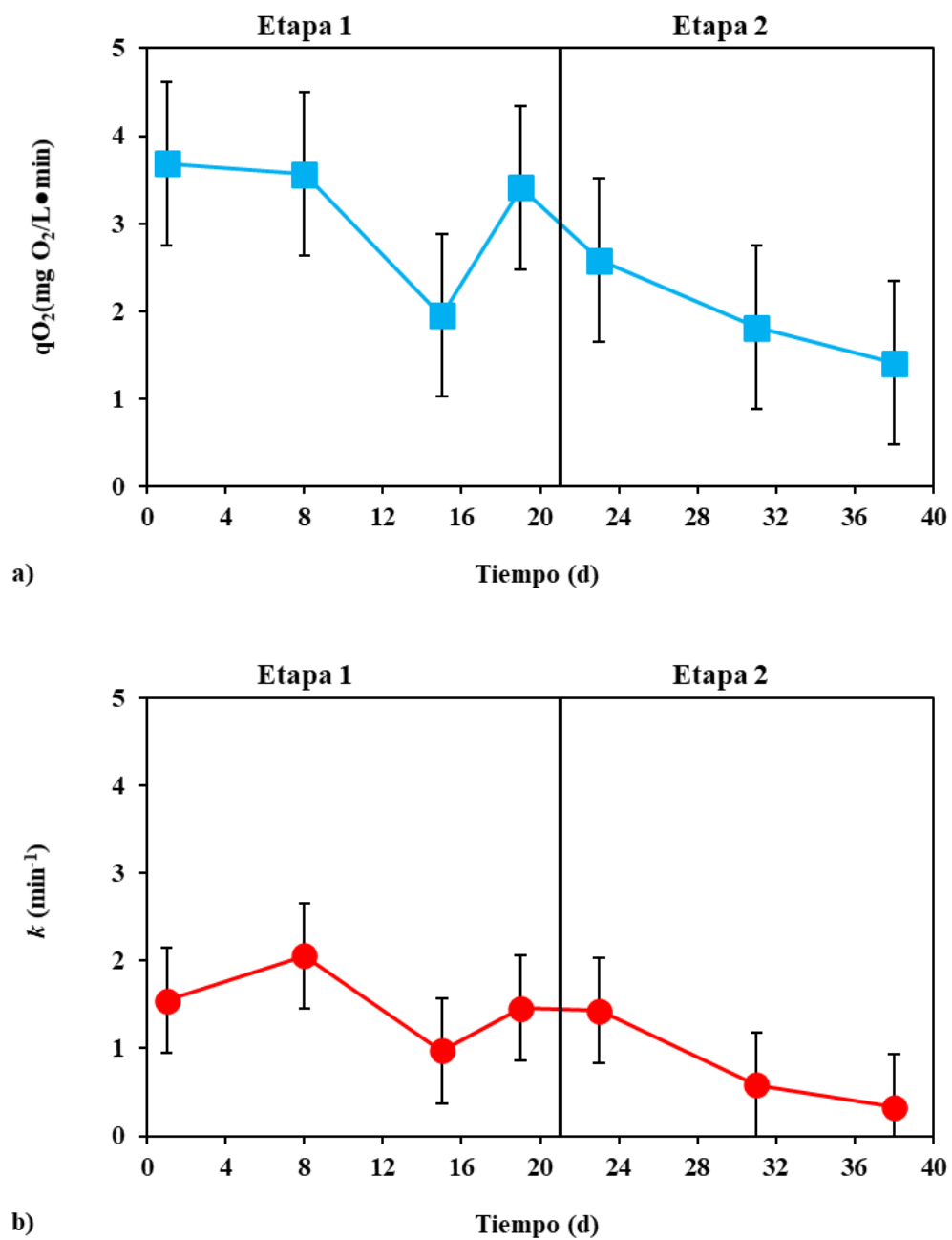


Figura 6.17 Actividad respiratoria del cultivo durante el monitoreo del SBR con aumento de cargas: a) $\blacksquare$ qO_2 y b) $\bullet$ k .

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

- Mediante esta tesis doctoral, se pudo corroborar que las propiedades fisicoquímicas del lixiviado hacen factible su uso como fuente de sustrato en el enriquecimiento de un cultivo mixto acumulador de PHA.
- El uso de lixiviados de la FORSU, y ADA permitieron enriquecer el cultivo mixto con microorganismos acumuladores de PHA. El polímero producido fue identificado como PHB alcanzando una máxima acumulación del 16.8% a los 30 días de aclimatación, brindando así un valor agregado a los lixiviados.
- La mayor acumulación de PHB en un SBR de enriquecimiento se encontró con la aplicación de relaciones C/N iguales o menores a 25.2 logrando un valor máximo de 16.8% (C/N 23.2), mientras que un aumento en la relación C/N a más de 25.2, tuvo un efecto adverso sobre la acumulación del polímero, debido al exceso de carbono, lo cual provocó una inhibición en la síntesis del polímero, esto se verificó mediante el balance de carbono y con la disminución de diversos parámetros cinéticos, promoviendo rutas metabólicas que conducen al crecimiento de biomasa y formación de CO₂ frente a la ruta metabólica de síntesis de PHB.
- El análisis de la actividad respiratoria permitió inferir que la causa de la pérdida de la misma fue consecuencia de la continua exposición a largos periodos de ayuno.
- El SBR enriquecido con biomasa acumuladora de PHB obtuvo eficiencias de remoción de DQOt, DQOs, NH₄⁺ y PO₄³⁻ de 68.3, 82.2, 99.5 y 79.6% respectivamente.
- Los lixiviados demostraron ser un sustrato alternativo para el enriquecimiento en biomasa acumuladora de PHB; sin embargo, altas cargas orgánicas de estos resultan en una disminución en la capacidad de asimilación de sustrato, una rápida pérdida en la capacidad respiratoria, así como un bloqueo en la ruta de síntesis de PHB.

7.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar una caracterización más detallada de los lixiviados, lo cual permitirá conocer los compuestos contenidos en este, además de esclarecer los posibles causantes de la inhibición en la síntesis de PHB causada por estos en altas concentraciones y que además, puedan provocar la disminución en la actividad respiratoria.
- Debido a la pérdida en la capacidad respiratoria causada por los largos periodos de ayuno, se recomienda probar ciclos de operación más cortos, con la finalidad de poder evaluar su efecto sobre el enriquecimiento de un cultivo mixto en biomasa acumuladora de PHA.
- Debido a que únicamente se exploró la etapa de enriquecimiento, queda pendiente diseñar el montaje de un reactor de producción de PHB en continuo que permita llevar la biomasa a una etapa de saciedad prolongada con la finalidad de potenciar y alcanzar la máxima acumulación de PHB.
- Con la finalidad de aumentar la acumulación de PHB, se recomienda evaluar el uso de lixiviados prefermentados, lo cual aumentará los precursores para su síntesis, además, cabe la posibilidad de poder producir un co-opolímero si la especiación de AGV no esta únicamente dirigida a HA.
- La identificación de la dinámica poblacional durante el proceso de enriquecimiento, permitiría esclarecer la conexión entre la disminución y estabilización de la relación F/F, así como el cambio en la población durante el enriquecimiento empleando lixiviados de la FORSU.

8. Referencias

- Abu Bakar, N. F., & Othman, S. A. (2019). Corn Bio-Plastic for Packaging Application. *Journal of Design for Sustainable and Environment*, 1(August), 1–3. <https://fazpublishing.com/jdse/index.php/jdse/article/view/4>
- Adeleye, A. T., Odoh, C. K., Enudi, O. C., Banjoko, O. O., Osiboye, O. O., Toluwalope Odediran, E., & Louis, H. (2020). Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry*, 96(March), 174–193. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>
- Ahmadi, F., Zinatizadeh, A. A., & Asadi, A. (2020). The effect of different operational strategies on polyhydroxyalkanoates (PHAs) production at short-term biomass enrichment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(3), 103531. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103531>
- Ahmadi, F., Zinatizadeh, A. A., Asadi, A., & Younesi, H. (2019). Influence of Different Culture Selection Methods on Polyhydroxyalkanoate Production at Short-term Biomass Enrichment. *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, 32(2), 184–191. <https://doi.org/10.5829/ije.2019.32.02b.01>
- Ahn, J., Jho, E. H., & Nam, K. (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. *Environmental Engineering Research*, 20(3), 246–253. <https://doi.org/10.4491/eer.2015.055>
- Albuquerque, M. G. E., Carvalho, G., Kragelund, C., Silva, A. F., Barreto Crespo, M. T., Reis, M. A. M., & Nielsen, P. H. (2013). Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. *ISME Journal*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.74>
- Albuquerque, M. G. E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B. R., & Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, 130(4), 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.05.011>

- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, 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(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>
- Albuquerque, M. G. E., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, 44(11), 3419–3433. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.021>
- Albuquerque, P. B. S., & Malafaia, C. B. (2018). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(PartA), 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
- Ali, I., & Jamil, N. (2018). Biosynthesis and Characterization of Poly3-hydroxyalkanote (PHA) from Newly Isolated Bacterium *Bacillus* sp. AZR-1. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 42(2), 371–378. <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0132-6>
- Almeida, A., Ruiz, J. A., Lopez, N. I., & Pettinari, M. J. (2004). Bioplasticos: una alternativa ecologica. *Química Viva*, 3(3), 122–133. <http://www.redalyc.org/pdf/863/86330305.pdf>
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Arcos-Hernandez, M. V., Gurieff, N., Pratt, S., Magnusson, P., Werker, A., Vargas, A., & Lant, P. (2010). Rapid quantification of intracellular PHA using infrared spectroscopy: An application in mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 150(3), 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.939>

- Argiz, L., Fra-Vázquez, A., del Río, Á. V., & Mosquera-Corral, A. (2020). Optimization of an enriched mixed culture to increase PHA accumulation using industrial saline complex wastewater as a substrate. *Chemosphere*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125873>
- Ben, M., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2016). Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(11), 2817–2826. <https://doi.org/10.1002/jctb.4891>
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., & Welander, T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.004>
- Bengtsson, S., Karlsson, A., Alexandersson, T., Quadri, L., Hjort, M., Johansson, P., Morgan-Sagastume, F., Anterrieu, S., Arcos-Hernandez, M., Karabegovic, L., Magnusson, P., & Werker, A. (2017). A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnology*, 35, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.11.005>
- Bengtsson, S., Pisco, A. R., Reis, M. A. M., & Lemos, P. C. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. *Journal of Biotechnology*, 145(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.11.016>
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>
- Braaz, R., Handrick, R., & Jendrossek, D. (2003). Identification and characterisation of the catalytic triad of the alkaliphilic thermotolerant PHA depolymerase PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei*. *FEMS Microbiology Letters*, 224(1), 107–112.

[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00425-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00425-7)

- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Cardona, A., Mora, A., & Marín, M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 66(2): 7129-7140, 66(2), 10.
- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M. G. E., & Reis, M. A. M. (2014). The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New Biotechnology*, 31(4), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.010>
- Castilla-Hernández, P., Cárdenas-Medina, K., Hernández-Fydrych, V., Fajardo-Ortiz, C., & Meraz-Rodríguez, M. (2016). Compost leachates treatment in a two-phase acidogenic-methanogenic system for biofuels production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(1), 175–183.
- Cerrone, F. (2011). *Tesis*.
- Chakravarty, P., Mhaisalkar, V., & Chakrabarti, T. (2010). Study on polyhydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresource Technology*, 101(8), 2896–2899. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.097>
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Changwichan, K., Silalertruksa, T., & Gheewala, S. H. (2018). Eco-efficiency assessment of bioplastics production systems and end-of-life options.

- Sustainability (Switzerland)*, 10(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/su10040952>
- Chua, A. S. M., Takabatake, H., Satoh, H., & Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: Effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, 37(15), 3602–3611. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00252-5)
- Ciesielski, S., & Przybylek, G. (2014). Volatile fatty acids influence on the structure of microbial communities producing PHAs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 395–402. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200005>
- Coats, E. R., Watson, B. S., & Brinkman, C. K. (2016). Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. *Water Research*, 106, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.039>
- Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T. P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., & Adani, F. (2017). Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0888-8>
- Colombo, B., Sciarria, T. P., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource Technology*, 218(2016), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.024>
- Emadian, S. M., Onay, T. T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- European Bioplastics and nova-Institute*. (2020). <https://www.european-bioplastics.org/market/>
- Gan, J., Montañó, G., Fajardo, C., Meraz, M., & Castilla, P. (2013). Co-tratamiento

- anaerobio de lixiviados producidos en una planta de composteo de desechos sólidos urbanos biodegradables en la Ciudad de México. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 541–551. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000300016&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Gatea, I. H., Sabr, A. B., Abdul Wahed, E. A., Abbas, A. H., Halob, A. A., & Mahmood, M. S. (2019). Isolation and characterization of local *Azotobacter* isolate) producing bio-plastics and consuming waste vegetable oils. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 388(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/388/1/012082>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made [Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados]. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- González, Y., Meza, J. C., González, O., & Córdova, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 29(1), 77–115.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., Lee, K. M., & Chang, H. N. (1993). The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology Techniques*, 7(3), 209–212. <https://doi.org/10.1007/BF02566149>
- Hao, J., Wang, X., & Wang, H. (2017). Overall process of using a valerate-dominant sludge hydrolysate to produce high-quality polyhydroxyalkanoates (PHA) in a mixed culture. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07154-3>
- Huang, H., Guo, W., & Chen, H. (2011). In situ FTIR and generalized 2D IR correlation spectroscopic studies on the crystallization behavior of solution-cast PHB film. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), 279–288. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4750-8>

- Jendrossek, D. (2007). Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1186–1196. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0860-9>
- Jian, J., Zhang, S. Q., Shi, Z. Y., Wang, W., Chen, G. Q., & Wu, Q. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2247–2256. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2706-0>
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, 44(7), 2141–2152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.031>
- Kansiz, M., Domínguez-Vidal, A., McNaughton, D., & Lendl, B. (2007). Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5–6), 1207–1213. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1337-5>
- Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., & Dimpal Singh, G. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis to commercial production- A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(4), 1098–1106. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.4.1098-1106>
- Kemavongse, K., Prasertsan, P., Upaichit, A., & Methacanon, P. (2008). Poly- β -hydroxyalkanoate production by halotolerant *Rhodobacter sphaeroides* U7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2073–2085. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9712-8>
- Koch, M., Bruckmoser, J., Scholl, J., Hauf, W., Rieger, B., & Forchhammer, K. (2020). Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic engineering strategy based on the regulator PirC. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01491-1>
- Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for

- microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, 37, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Korkakaki, E., Mulders, M., Veeken, A., Rozendal, R., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2016). PHA production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Overcoming the inhibitory matrix. *Water Research*, 96, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.033>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 1–43. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7), 620–634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Lambeck, G., Vorenkamp, E. J., & Schouten, A. J. (1995). Structural Study of Langmuir Blodgett Mono- and Multilayers of Poly(β -hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 28(6), 2023–2032. <https://doi.org/10.1021/ma00110a041>
- LAW, J. H., & SLEPECKY, R. A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1958), 33–36. <https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961>
- Lee, S. H., Kim, J. H., Chung, C. W., Kim, D. Y., & Rhee, Y. H. (2018). Analysis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria in Activated Sludge Samples Enriched by Aerobic Periodic Feeding. *Microbial Ecology*, 75(3), 720–728. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1084-x>
- Lemos, A. C., & Mina, A. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1),

83–101. http://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/139/195

- Lemos, P. ., Viana, C., Salgueiro, E. N., Ramos, A. M. ., Crespo, J. P. S. G., & Reis, M. A. M. (1998). Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(8), 662–671. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00243-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00243-3)
- Lemos, P. C., Serafim, L. S., & Reis, M. A. M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122(2), 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.006>
- Liao, Q., Guo, L., Ran, Y., Gao, M., She, Z., Zhao, Y., & Liu, Y. (2018). Optimization of polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis with heat pretreated waste sludge. *Waste Management*, 82, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.019>
- Liu, H.-Y., Hall, P. V., Darby, J. L., Coats, E. R., Green, P. G., Thompson, D. E., & Loge, F. J. (2008). Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater. *Water Environment Research*, 80(4), 367–372. <https://doi.org/10.2175/106143007x221535>
- Liu, Y., Guo, L., Liao, Q., Ran, Y., Hu, F., Gao, M., She, Z., Zhao, Y., Jin, C., Liu, Y., & Wang, G. (2020). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production with acid or alkali pretreated sludge acidogenic liquid as carbon source: Substrate metabolism and monomer composition. *Process Safety and Environmental Protection*, 142, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.06.015>
- Lopez-Vazquez, C. M., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., & van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Temperature effects on glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 43(11), 2852–2864. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.038>
- Lorini, L., di Re, F., Majone, M., & Valentino, F. (2020). High rate selection of PHA accumulating mixed cultures in sequencing batch reactors with uncoupled carbon and nitrogen feeding. *New Biotechnology*, 56(February), 140–148.

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.01.006>

- Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226–248. <https://doi.org/10.1080/15583720903048243>
- Luzier, W. D. (1992). *Materials derived from biomass / biodegradable materials* NNCH \ O . / H-. 89(February), 839–842.
- Madhavan Nampoothiri, K., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101(22), 8493–8501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, B. H., & Stahl, D. A. (2014). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.).
- Majone, M., Beccari, M., Di Gregorio, S., Dionisi, D., & Vallini, G. (2006). Enrichment of activated sludge in a sequencing batch reactor for polyhydroxyalkanoate production. *Water Science and Technology*, 54(1), 119–128. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.379>
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., & Suárez-Ojeda, M. E. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 297(November 2019), 122478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122478>
- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 142, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.031>
- Micromidas to test sludge-to-plastic tech - CNET*. (n.d.). Retrieved August 13, 2021, from <https://www.cnet.com/news/micromidas-to-test-sludge-to-plastic-tech/>
- Misra, A. K., Thakur, M. S., Srinivas, P., & Karanth, N. G. (2000). Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganisms using fourier transform infrared spectroscopy. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1217–1219. <https://doi.org/10.1023/A:1005602911977>

- Mohapatra, S., Pattnaik, S., Maity, S., Sharma, S., Akhtar, J., Pati, S., Samantaray, D. P., & Varma, A. (2020). Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1242–1250. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.02.001>
- Mokhtarani, N., Bayatfard, A., & Mokhtarani, B. (2012). Full scale performance of compost's leachate treatment by biological anaerobic reactors. *Waste Management and Research*, 30(5), 524–529. <https://doi.org/10.1177/0734242X11411014>
- Molina Viramontes, J. P. (2016). *Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHAs)*.
- Monroy, I., & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology*, 317(December 2019), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.012>
- Moralejo-Gárate, H., Kleerebezem, R., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Palmeiro-Sánchez, T., & van Loosdrecht, M. C. M. (2014). Substrate versatility of polyhydroxyalkanoate producing glycerol grown bacterial enrichment culture. *Water Research*, 66, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.044>
- Morgan-Sagastume, F., Hjort, M., Cirne, D., Gérardin, F., Lacroix, S., Gaval, G., Karabegovic, L., Alexandersson, T., Johansson, P., Karlsson, A., Bengtsson, S., Arcos-Hernández, M. V., Magnusson, P., & Werker, A. (2015). Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresource Technology*, 181, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.046>
- Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Zanaroli, G., Majone, M., & Werker, A. (2019). Acclimation Process for Enhancing Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Activated-Sludge Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 10(4), 1065–1082. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0122-8>

- Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K., & Marciniak, P. (2019). *Pseudomonas* Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>
- Munir, S., & Jamil, N. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *Journal of Basic Microbiology*, 58(3), 247–254. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700276>
- Narancic, T., Scollica, E., Kenny, S. T., Gibbons, H., Carr, E., Brennan, L., Cagney, G., Wynne, K., Murphy, C., Raberg, M., Heinrich, D., Steinbüchel, A., & O'Connor, K. E. (2016). Understanding the physiological roles of polyhydroxybutyrate (PHB) in *Rhodospirillum rubrum* S1 under aerobic chemoheterotrophic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(20), 8901–8912. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7711-5>
- Oliveira, C. S. S., Silva, C. E., Carvalho, G., & Reis, M. A. (2017). Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnology*, 37, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.008>
- Oliveira, C. S. S., Silva, M. O. D., Silva, C. E., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2018). Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/app8101817>
- Ong, S. Y., Chee, J. Y., & Sudesh, K. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 10(2), 21–225. <https://doi.org/10.17516/1997-1389-0024>
- Ortiz, E. (2009). *Obtención, aislamiento e identificación de cepas acterianas presuntas productoras de Poli-β-hidroxicanoatos (PHAs)*.
- Oshiki, M., Satoh, H., & Mino, T. (2011). Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the

- fluorescent dye Nile blue A. *Water Science and Technology*, 64(3), 747–753.
<https://doi.org/10.2166/wst.2011.707>
- Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238–241.
- Pandolfi, D., Pons, M. N., & Motta, M. Da. (2007). Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1263–1269.
<https://doi.org/10.1007/s10529-007-9387-5>
- Pereira, H., Lemos, P. C., Reis, M. A. M., Crespo, J. P. S. G., Carrondo, M. J. T., & Santos, H. (1996). Model for carbon metabolism in biological phosphorus removal processes based on in vivo ¹³C-NMR labelling experiments. *Water Research*, 30(9), 2128–2138. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00035-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00035-8)
- Qu, B., & Liu, J. X. (2009). Determination of optimum operating conditions for production of polyhydroxybutyrate by activated sludge submitted to dynamic feeding regime. *Chinese Science Bulletin*, 54(1), 142–149.
<https://doi.org/10.1007/s11434-008-0566-0>
- Queirós, D., Fonseca, A., Rossetti, S., Serafim, L. S., & Lemos, P. C. (2017). Highly complex substrates lead to dynamic bacterial community for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(8), 1215–1224. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1951-y>
- Qureshi, M. S., Oasmaa, A., Pihkola, H., Deviatkin, I., Tenhunen, A., Mannila, J., Minkkinen, H., Pohjakallio, M., & Laine-Ylijoki, J. (2020). Pyrolysis of plastic waste: Opportunities and challenges. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 152(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2020.104804>
- Rajabi, S., & Vafajoo, L. (2012). Investigating the Treatability of a Compost Leachate in a Hybrid Anaerobic Reactor: An Experimental Study. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 61(1), 1175–1177.
- Ramírez Herrera, N. G. (2009). *Universidad Nacional Autónoma de México*.

- Rodgers, M., & Wu, G. (2010). Production of polyhydroxybutyrate by activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Bioresource Technology*, 101(3), 1049–1053. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.107>
- Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Panti6n, A. A., & Alonso-Fari6nas, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management*, 205, 215–230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- Roohi, Zaheer, M. R., & Kuddus, M. (2018). PHB (poly- β -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(1), 30–40. <https://doi.org/10.1002/pat.4126>
- Roy, D., Aza6s, A., Benkaraache, S., Drogui, P., & Tyagi, R. D. (2018). Composting leachate: characterization, treatment, and future perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 17(2), 323–349. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9462-5>
- Sabapathy, P. C., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zabed, H. M., & Qi, X. (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306(January), 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- S6nchez, S., Mar6n, M., Mora, A., & Yepes, M. (2012). Identificaci6n de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnolog6a*, 14(2), 89–100.
- Sanchez Valencia, A. I. (2016). *Universidad autonoma metropolitana unidad iztapalapa divisi6n de ciencias biol6gicas y de la salud*. Universidad Autonoma Metropolitana.
- Santos, M. D. L. A. M., Rubio, F. M. A., Gonz6les, F. C., & Mart6n, A. M. (2003). UN PROCESO BIOL6GICO MUY FLEXIBLE PARA LA DEPURACI6N BIOL6GICA DE AGUAS RESIDUALES: EL REACTOR SBR. *Almirez*, 15.
- Satoh, H., Mino, T., & Matsuo, T. (1992). Uptake of organic substrates and

- accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes. *Water Science and Technology*, 26(5–6), 933–942. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0535>
- Sawant, S. S., Tran, T. K., Salunke, B. K., & Kim, B. S. (2017). Potential of *Saccharophagus degradans* for production of polyhydroxyalkanoates using cellulose. *Process Biochemistry*, 57(December 2016), 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.016>
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables GacS/A and the Rsm system in *Azotobacter vinelandii* View project. *Bioneconología*, 14, 12. <https://www.researchgate.net/publication/242144167>
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145–160. <https://doi.org/10.1002/bit.20085>
- Shamsuddin, I. M., Jafar, J. A., Shawai, A. S. A., Yusuf, S., Lateefah, M., & Aminu, I. (2017). Bioplastics as Better Alternative to Petroplastics and Their Role in National Sustainability: A Review. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 5(4), 63. <https://doi.org/10.11648/j.abb.20170504.13>
- Sikora, A., Detman, A., Chojnacka, A., & Blaszczyk, M. K. (2017). Anaerobic Digestion: I. A Common Process Ensuring Energy Flow and the Circulation of Matter in Ecosystems. II. A Tool for the Production of Gaseous Biofuels. *Fermentation Processes*, March. <https://doi.org/10.5772/64645>
- Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I. L., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2018). Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1017, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.043>
- Sruamsiri, D., Thayanukul, P., & Suwannasilp, B. B. (2020). In situ identification of

- polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60727-7>
- Suresh Kumar, M., Mudliar, S. N., Reddy, K. M. K., & Chakrabarti, T. (2004). Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 95(3), 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.019>
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.007>
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. K. (2018). Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.013>
- Tipos de bioplásticos: Os polihidroxialcanoatos (PHA's) ~ Bioplastic News.* (n.d.). Retrieved August 15, 2021, from <http://bioplasticnews.blogspot.com/2009/06/tipos-de-bioplásticosos.html>
- Tsuda, H., Shiraki, M., Inoue, E., & Saito, T. (2016). Generation of poly- β -hydroxybutyrate from acetate in higher plants: Detection of acetoacetyl CoA reductase- and PHB synthase- activities in rice. *Journal of Plant Physiology*, 201, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.007>
- Tyrrel, S. F., Seymour, I., & Harris, J. A. (2008). Bioremediation of leachate from a green waste composting facility using waste-derived filter media. *Bioresource Technology*, 99(16), 7657–7664. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.079>
- Venkateswar Reddy, M., & Venkata Mohan, S. (2012). Influence of aerobic and anoxic microenvironments on polyhydroxyalkanoates (PHA) production from food waste and acidogenic effluents using aerobic consortia. *Bioresource Technology*, 103(1), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.040>

- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012a). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377–410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04/MACHINEREADABLECITATION/BIBTEX>
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012b). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377–410. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>
- Vjayan, T., & Vadivelu, V. M. (2017). Effect of famine-phase reduced aeration on polyhydroxyalkanoate accumulation in aerobic granules. *Bioresource Technology*, 245(July), 970–976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.038>
- Wang, X., Oehmen, A., Freitas, E. B., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2017). The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Research*, 112, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.064>
- Wang, Y., Chen, R., Cai, J. Y., Liu, Z., Zheng, Y., Wang, H., Li, Q., & He, N. (2013). Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060318>
- Wen, Q., Liu, S., Liu, Y., & Chen, Z. (2021). Effect of inoculum and organic loading on mixed culture polyhydroxyalkanoate production using crude glycerol as the substrate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1785–1792. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.184>
- Wu, B., Zheng, D., Zhou, Z., Wang, J. L., He, X. L., Li, Z. W., Yang, H. N., Qin, H., Zhang, M., Hu, G. Q., & He, M. X. (2017). The Enrichment of Microbial Community for Accumulating Polyhydroxyalkanoates Using Propionate-Rich Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(2), 755–768. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2359-2>

- Xu, J., Guo, B. H., Yang, R., Wu, Q., Chen, G. Q., & Zhang, Z. M. (2002). In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 43(25), 6893–6899. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00615-8](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00615-8)
- Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., & Chen, G. Q. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering C*, 86(October 2017), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>
- Zhang, X., Lin, Y., Wu, Q., Wang, Y., & Chen, G. Q. (2020). Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.006>

Anexo 1. Síntesis de PHA

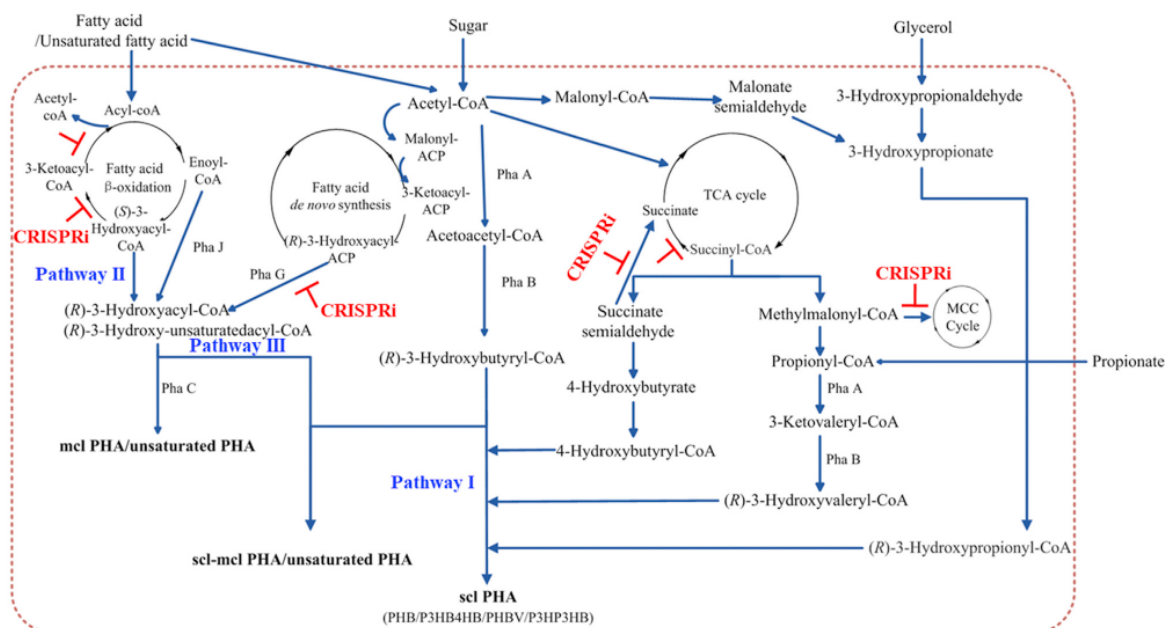


Figura A.1.3 Grandes rutas biosintéticas para la producción de PHA.

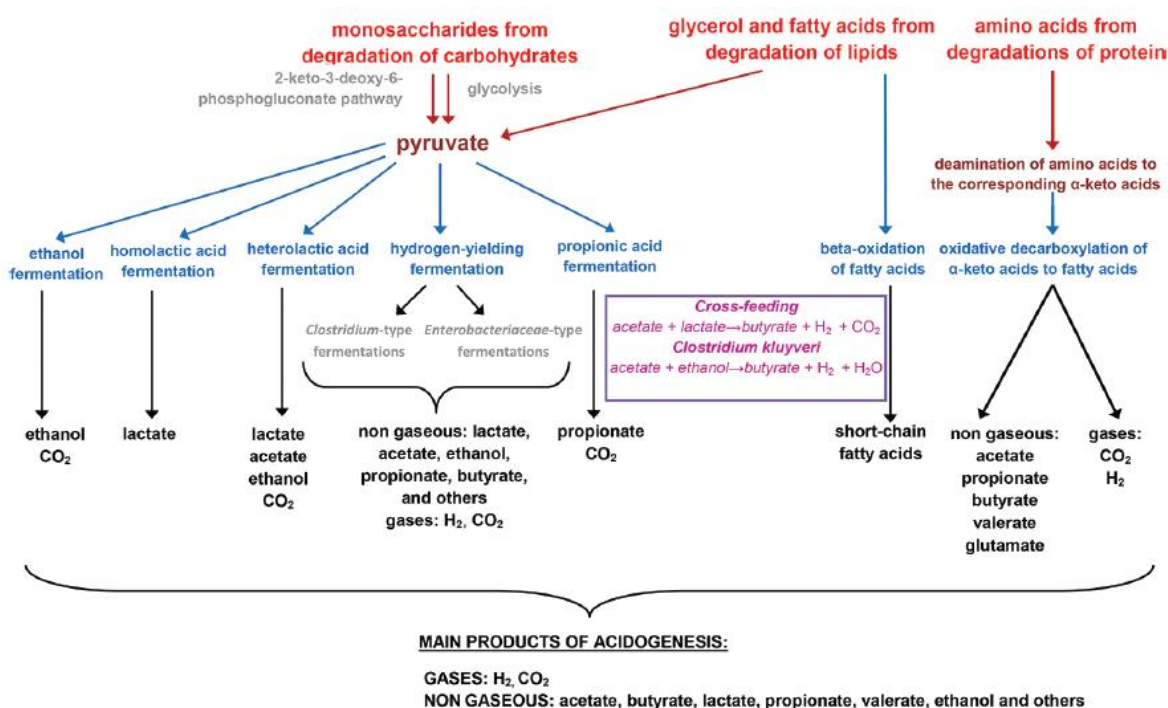


Figura A.2. Rutas metabólicas de la acidogénesis (tomado de Sikora et al., (2017))

Anexo 2. Técnicas analíticas

Ácidos Grasos Volátiles (AGV) por cromatografía de gases

La determinación de AGV, se realizó por medio de cromatografía de gases en un equipo Hewlett Packard 5890 Serie II, con una columna AT-1000 de 10 m de longitud, 0.53 mm de diámetro y 2.5 μ m de película, y detector ionización de flama (FID).

Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Temperatura del detector: 200 °C

Temperatura del inyector: 200 °C

Temperatura de horno: 80 – 200 °C (10°C/min)

Gas acarreador: Nitrógeno, a un flujo de 6.6 mL/min.

Tiempo del análisis: 7 minutos

Volumen de inyección: 0.5 μ L

Identificación de PHA por microscopia

Debido a su naturaleza lipídica, la detección y aislamiento de bacterias productoras de PHA se fundamenta en la utilización de colorantes lipofílicos, como el negro Sudán, el azul Nilo y rojo Nilo, siendo el azul Nilo el colorante más empleado, ya que los otros colorantes pueden dar falsos positivos (Cardona et al., 2013).

De acuerdo con Ostle y Holt, (1982), el azul Nilo (perteneciente a la familia de las oxazinas) debido a su alta afinidad y especificidad por moléculas de naturaleza lipofílica permite la identificación de los microorganismos acumuladores de PHA. Las moléculas de PHA teñidas con Azul Nilo presentan una fluorescencia naranja/rojiza a una longitud de onda de 460 nm.

Se determinó la presencia de PHA en la biomasa del reactor, por microscopía óptica tiñendo las células con azul Nilo II y observando las muestras en un microscopio de

fluorescencia modelo OLYMPUS U-PMTVC, a una longitud de onda de 460 nm, equipado con una cámara AXION Cam ERC5S, y la captura de imágenes se realizó mediante el software Image-Pro 6.3 Plus.

AZUL NILO: se preparó una solución al 1% en agua destilada y se filtró usando un filtro de 0.2 μm , para la tinción se utilizó una dilución de 1:25 en el licor de mezcla, las células se fijaron a un portaobjetos durante 15 minutos a 60 °C, se tiñeron con unas gotas de colorante dejando reaccionar 15 minutos, posteriormente se lavó el exceso de colorante con HA al 8%. Las muestras teñidas y secas se observaron en el microscopio bajo luz fluorescente ($\lambda = 362\text{--}460\text{ nm}$), los gránulos de polímero emiten una fuerte coloración anaranjada (Ostle y Holt, 1982).

Cuantificación de PHA por gravimetría

El contenido de PHA se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Hahn et al., (1993) con ligeras modificaciones.

Por cada 10 mL de licor mezclado se adicionaron 5 gotas de formaldehído (CH_2O) al 7% para inhibir la actividad microbiana y la muestra se secó a 100°C. Posteriormente por cada 2 mg de biomasa seca, se adicionó 1 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) al 4.5% p/v y 1 mL de cloroformo (CHCl_3) al 99% v/v. Cada muestra fue agitada a 200 rpm durante 2.5 horas a una temperatura de 30 °C y subsecuentemente centrifugadas a 6000 rpm por 15 minutos. La fase orgánica que contiene el polímero fue separada, y se adicionó metanol hasta detectar la formación de un precipitado, una vez formado este precipitado la muestra se dejó reposar durante una noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo, la muestra fue evaporada a 60 °C, y se realizaron 3 lavados con metanol teniendo cuidado de no quemar el polímero durante las evaporaciones. Finalmente, el PHA extraído fue secado y pesado reportándose como g PHA/g SSVLM o % PHA. NOTA: El polímero extraído tiene una coloración blanquecina.

Identificación de PHA por espectrofotetría UV

La composici3n del polímero fue determinada de acuerdo con el método de LAW y SLEPECKY, (1961). Para esta determinaci3n se usaron muestras tratadas para la cuantificaci3n gravimétrica de PHA, a la muestra de polímero extraído se le adicionaron 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), posteriormente fueron sometidas a baño maría a $100^{\circ}C$ durante 15 minutos para transformar el polímero a ácido crotónico ($C_4H_6O_2$) el cual es un derivado del PHB. La muestra resultante se dejó enfriar y fueron analizadas mediante espectrometría UV, barrido de 200 a 275 nm con un equipo Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific. El espectro de absorci3n del ácido crotónico presenta un máximo de absorci3n a una longitud de onda de 235 nm.

Identificaci3n de PHA por FTIR

Las muestras secas se equilibraron a humedad de laboratorio (~40% RH) y se colocaron directamente sobre el cristal para mediciones. Los espectros FTIR se registraron en un espectrofot3metro Perkin Elmer (Spectrum 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) equipado con un accesorio de muestreo de diamante de cristal universal ATR. Cada espectro representa un promedio de cuatro escaneos en un rango de $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Todos los espectros se desconvolucionaron utilizando funciones Gaussianas y Lorentzianas. En este caso, la forma de línea supuesta era Lorentziana con un ancho medio de 15 cm^{-1} y un factor de mejora de resoluci3n de 1.5.

Anexo 3. Productos

ORIGINAL PAPER

Journal of Water Process Engineering (2021)

<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101975>

Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00258

Matricula: 2163807843

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)
A PARTIR DE LIXIVIADOS DE
COMPOSTEO DE DESECHOS
ORGÁNICOS CON UN CULTIVO
AEROBIO MIXTO.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 15:00 horas del día 9 del mes de febrero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ
DR. ULISES ROJAS ZAMORA
DR. IVAN MORENO ANDRADE
DRA. MONICA LILIANA SALAZAR PELAEZ

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

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ANGEL IVAN SANCHEZ VALENCIA

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

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Sanchez Valencia Angel Iván
ANGEL IVAN SANCHEZ VALENCIA
ALUMNO

REVISÓ

[Signature]
MTRA. ROSALBA BERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

[Signature]
DRA. MONICA ALICIA MERAZ RODRIGUEZ

VOCAL

[Signature]
DR. ULISES ROJAS ZAMORA

VOCAL

[Signature]
DR. IVAN MORENO ANDRADE

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MONICA LILIANA SALAZAR PELAEZ