



Universidad Autónoma Metropolitana



Unidad Iztapalapa

---

---

División de Ciencias Biológicas y de la salud  
Departamento de Biotecnología

“PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS POLIHIDROXIALCANOATOS  
(PHB) A PARTIR DE LIXIVIADOS DE BASURA ORGÁNICA”

T E S I S

Para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

IBI Sánchez Valencia Angel Iván

DIRECTORA

Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz (UAM-I)

ASESORA

Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez (UAM-I)

ASESOR EXTERNO

Dr. Ricardo Beristain Cardoso (UAM-L)

Julio 2016

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

México D.F. a 22 de Julio del 2016

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

“PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHB) A PARTIR DE  
LIXIVIADOS DE BASURA ORGÁNICA”

Presenta

Angel Iván Sánchez Valencia

Comité Tutorial:

Directora: María del Carmen Fajardo Ortiz

Asesora: Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Asesor: Ricardo Beristain Cardoso

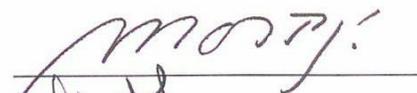
Jurado:

Presidenta: Mónica Alicia Meraz Rodríguez

Secretario: Ricardo Beristain Cardoso

Vocal: Mónica Liliana Salazar Pereira

Vocal: Ulises Durán Hinojosa

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de tesis, así como a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por abrirme sus puertas al aceptarme para realizar mis estudios a nivel maestría, mismos que enriquecieron mi persona tanto profesional como académicamente, de igual manera a sus docentes los cuales con sus enseñanzas contribuyeron a que esto fuera posible.

A mi familia por apoyarme en todo momento, en las buenas y en las malas, por creer en mí aun cuando yo mismo no creía que podría lograr tanto, por aconsejarme y darme esas palabras de aliento que muchas veces me impulsaron a seguir adelante, en especial a mi madre y tía, las cuales con su cariño y amor fueron formando la persona que soy ahora.

A mi directora de tesis la Doctora María del Carmen Fajardo Ortiz, por su dedicación, apoyo, confianza, enseñanzas, consejos y que junto a mi persona sufrimos durante la realización de la tesis, por todo el esfuerzo que pone en realizar su trabajo siendo un ejemplo a seguir.

A la Doctora Mónica Alicia Meraz Rodríguez, por su apoyo, guía y colaboración.

A mis compañeros de laboratorio en especial a Vianka Celina Hernandez Fydrych por brindarme su amistad, apoyarme y asesorarme en la parte experimental.

A David Alejandro Contreras Guerrero amigo y hermano, con el cual nuevamente compartí momentos divertidos, por estar siempre en las buenas y en las malas, durante la licenciatura y ahora en maestría.

A todos mis compañeros de la generación de maestría en biotecnología 2014-2016.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis.

## RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son plásticos biodegradables sintetizados por microorganismos, estos bioplásticos poseen propiedades similares a las de algunos plásticos derivados del petróleo, por lo cual presentan una alternativa bastante atractiva desde el punto de vista ecológico. Sin embargo, una de las limitantes para la producción de estos bioplásticos es el costo de su producción. Actualmente los estudios están dirigidos a la disminución de dichos costos, centrándose en la búsqueda de sustratos más económicos, para tal fin se han utilizado distintos residuos como: efluentes residuales industriales y municipales, residuos agrícolas, entre otros. En este trabajo la producción de polihidroxialcanoatos, específicamente polihidroxibutirato (PHB), fue llevada a cabo usando un cultivo mixto, proveniente de los lodos activados secundarios de la planta de tratamiento de agua residual municipal "Cerro de la Estrella" y como sustrato se usaron lixiviados de basura orgánica, los cuales tienen un alto contenido de AGV, sustrato indispensable para producción de PHA.

La producción de PHB se llevó a cabo en 2 etapas: en la primera se procedió a enriquecer biomasa productora de PHB, en un reactor lote secuenciado (SBR) a concentraciones de 1.8 a 8.35 g DQO<sub>T</sub>/L. En la segunda etapa se utilizó un reactor continuo de 1 L a pH de 7.0 -7.5, temperatura ambiente, agitación de 220 rpm, TRH de 1 día y flujo de aire de 1.7 L/min a concentraciones de 5.6 y 9.09 g DQO<sub>T</sub>/L.

A partir del día 29 de la etapa de enriquecimiento se logró detectar mediante microscopía de fluorescencia, la presencia de bacterias productoras de PHB para la cual se determinó un acumulación máxima de PHB de 56.2 % a 6.1 g DQO<sub>T</sub>/L. Sin embargo en la etapa de producción en el reactor continuo, se observó una desestabilización disminuyendo la producción a 10%. Con la finalidad de recuperar la producción de PHB, se regresó a la operación del reactor en modo secuencial. Bajo estas condiciones se observó una recuperación en la producción de PHB alcanzando una producción máxima de 17.8 % a 5.6 g DQO<sub>T</sub>/L.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable plastics, synthesized by microorganisms. These plastics have similar properties to some of those petroleum-based plastics, so bioplastics are an attractive alternative from the ecological point of view. However, one of the limitations for bioplastics production is their production cost.

Currently, the studies are oriented to the reduction of such costs, focusing on the search of cheaper substrates, using in some cases wastes such as industrial or municipal wastewaters or agricultural wastes, among others. In this work polyhydroxyalkanoates production, specifically polyhydroxybutyrate (PHB) was carried out using a secondary activated sludge mixed culture of the wastewater treatment plant "Cerro de la Estrella" and as a substrate using organic wastes leachates, which in addition to being highly polluting due to its high COD concentration, are rich in VFA as well.

PHB production was conducted in 2 stages, in the first one an enrichment of PHB producing biomass in a reactor sequencing batch (SBR) with concentrations of 1.8 to 8.35 g TCOD/L was carried out. In the second stage a continuous reactor of 1 L at pH of 7-7.5, environmental temperature, 220 rpm shaking, TRH of 1 day, airflow of 1.7 L/min, was used and PHB production was carried out at 5.6 to 9.09 g TCOD/L.

During the enrichment stage and from day 29 of operation the presence of PHB producing bacteria was detected with a maximum PHB accumulation of 56.2% at 6.1 g COD<sub>T</sub>/L. However during the production stage a destabilization was observed and production decreased to 10%. To recover PHB production levels, reactor operation was returned to sequential mode. Under these conditions there was a recovery in PHB production of 17.8% at 5.6 g TCOD/L.

## INDICE

	pp.
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
1. Marco teórico.....	1
1.1 Problemática.....	1
1.2 Bioplásticos.....	2
1.3 Clasificación de PHA.....	3
1.4 Propiedades y aplicaciones de PHA.....	4
1.5 Microbiología de la producción de PHA.....	6
1.6 Síntesis biológica de PHA.....	9
1.6.1 Síntesis a partir de azúcares.....	9
1.6.2 Síntesis a partir de la $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.....	10
1.6.3 Síntesis desde a biosíntesis de novo de los ácidos grasos.....	10
1.7 Degradación de PHA.....	12
1.8 Factores ambientales para la producción de PHA.....	12
1.8.1 Temperatura.....	13
1.8.2 pH.....	13
1.9 Sustratos empleados en la producción de PHA.....	13
1.10 Producción de PHA.....	14
1.11 Antecedentes directos.....	16
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general.....	19

4.1 Objetivos particulares.....	19
5. Metodología.....	20
5.1 Técnicas analíticas.....	20
5.1.1 pH.....	20
5.1.2 DQO total y soluble.....	20
5.1.3 Amonio.....	20
5.1.4. Sólidos totales.....	20
5.1.5 Ácidos grasos volátiles (AGV's).....	21
5.1.6 Identificación de PHB por microscopia.....	21
5.1.7 Cuantificación de PHA por gravimetría.....	21
5.1.8 Cuantificación de PHB por espectrometría.....	21
5.2 Muestreo y caracterización del lixiviado.....	21
5.3 Producción de PHB a partir de lixiviados de basura orgánica.....	21
6. Resultados.....	24
6.1 Técnicas analíticas.....	24
6.2 Muestreo y caracterización de lixiviados.....	24
6.3 Puesta en marcha del reactor.....	26
6.3.1 DQO.....	26
6.3.2 Amonio.....	30
6.3.3 AGVs.....	31
6.3.4 Identificación de PHB por microscopía.....	36
6.3.5 Cuantificación de PHB por gravimetría.....	36
6.3.6 Cuantificación de PHB por espectrometría.....	37
6.3.7 Perfil cinético de un ciclo de operación.....	42

7. Conclusiones.....	45
8. Referencias.....	46
9. Anexos.....	51

## INDICE DE TABLAS

	pp.
Tabla 1. Propiedades físicas de los polímeros propileno (PP) y polihidroxitirato PHB.....	4
Tabla 2. Microorganismos productores de PHA y substratos utilizados.....	8
Tabla 3. Tiempo que tardan los PHA en degradarse en diferentes ambientes.....	12
Tabla 4. Producción de PHA a partir de distintos residuos industriales.....	14
Tabla 5. Etapas de operación del reactor de enriquecimiento y producción.....	22
Tabla 6. Ciclo de operación del reactor SBR para el enriquecimiento de biomasa productora de PHB.....	22
Tabla 7. Ciclo de operación en modo secuencial en la etapa de producción.....	23
Tabla 8. Caracterización de lotes de lixiviados.....	25
Tabla 9. Eficiencias de remoción de DQO.....	29
Tabla 10. Contenido de sólidos en el reactor.....	30
Tabla 11. Concentración promedio de $AGV_T$ y eficiencia de remoción.....	32
Tabla 12. Identificación y cuantificación de PHB.....	38
Tabla 13. Comparación de los resultados obtenidos en este estudio con lo reportado en la bibliografía, utilizando lodos activados como inóculo.....	42
Tabla 14. Ecuación de la recta y coeficientes de variación para las técnicas analíticas.	51

## INDICE DE FIGURAS

	pp.
Figura 1. Estructura general de los PHA.....	5
Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs.....	11
Figura 3. Producción de polímero a partir de AGV.....	17
Figura 4. Perfil de consumo de materia orgánica, a) DQO total, b) DQO soluble, (♦) Influyente, (■) Efluente y (o) Eficiencia.....	27
Figura 5. Perfil de consumo de Amonio (♦) Influyente, (□) Efluente.....	31
Figura 6. Perfil de AGV <sub>T</sub> (o) Influyente, (■) Efluente.....	32
Figura 7. Perfil de consumo de AGV por ácido: a) acético, b) propiónico, c) butírico, d) valérico, o) Influyente, (■) Efluente.....	34
Figura 8. Perfil cinético de un ciclo de 7 horas de operación del reactor en la etapa de producción. a) (▲) SV, (□) OD y (O) DQOs, b) (♦) N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	44
Figura 9. Curva de calibración de DQO a 620 nm.....	52
Figura 10. Curva de calibración para NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> medida a 640m,.....	53
Figura 11. Curvas de calibración para AGVs, b) Acético. B) Propiónico, C) Butírico y d) Valérico.....	55
Figura 12. Espectro de Ácido crotónico.....	57
Figura 13. Curva de calibración para Ácido crotónico a 235 nm.....	57

## NOMENCLATURA

**AGV:** Ácidos Grasos Volátiles

**CG:** Cromatografía de Gases

**FID:** Detector de Ionización de Flama

**OD:** Oxígeno Disuelto

**PHA:** Polihidroxicanoatos

**PHA SCL:** PHA Short-Chain-Lenght

**PHB:** Polihidroxi butirato

**PLA:** Polímeros del ácido láctico

**PCL:** Policaprolactonas

**P(3HV):** Poli-3-hidroxi valerato

**P(3HBco3HV):** Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)

**Poli(3HB-co-3HV-co-3HHx):** Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato-co-3 hidroxi hexanoato)

**PP:** Polipropileno

**TCA:** Tricarboxílicos

**TRH:** Tiempo de Retención Hidráulica

**DQO:** Demanda Química de Oxígeno

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SBR:** Secuencial Batch Reactor

**SF:** Sólidos Fijos

**ST:** Sólidos Totales

**SV:** Sólidos Volátiles

**UV:** Ultravioleta

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 PROBLEMÁTICA

El problema de la contaminación ambiental causado por el vertido indiscriminado de residuos de plástico sintéticos ha adquirido proporciones mundiales, estos son derivados del petróleo y de difícil biodegradación, además son considerados como desechos ambientales perjudiciales. La degradación de los plásticos sintéticos es muy lenta. Como ejemplo, la descomposición de productos orgánicos tarda entre 3 y 4 semanas, la de telas de algodón 5 meses, mientras que la del plástico puede tardar 500 años. Además, en buena medida la “degradación” de estos plásticos simplemente genera partículas de plástico más pequeñas que, a pesar de ya no ser evidentes, se acumulan en los ecosistemas (recuperado de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_31.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf)).

Recientemente se han realizado estudios sobre la presencia de microplásticos o fragmentos de plástico de tamaño inferior a 5 milímetros, y se ha demostrado que éstos se están acumulando de forma considerable en los mares y en la arena de las playas. Los más abundantes son los microfragmentos de acrílico, polipropileno, polietileno, poliamida (nylon), poliéster entre otros (Ortiz, 2009).

Toda la materia plástica derivada del petróleo es de por sí reciclable: sin embargo el proceso de reciclaje de plásticos sintéticos es lento y el producto a reciclar debe tener ciertas características que sería una gran desventaja del proceso. (Cerrone, 2011). La estrategia de manejo de residuos plásticos consisten en: incineración, reciclaje o reuso, sin embargo, estas medidas presentan desventajas, en el caso de la incineración se genera ácido clorhídrico el cual es dañino para la salud. Por otro lado, el reciclaje es complicado, ya que involucra una serie de etapas como son recolección y procesamiento, limpieza, separación adecuada de los diferentes materiales a reciclar, lo cual en la mayoría de los casos no sucede. Además, los artículos plásticos no se pueden reciclar indefinidamente, es decir, sólo se pueden reciclar tantas veces como lo permitan las condiciones físicas y químicas en las que queda el material después de su procesamiento (Ortiz, 2009).

En vista de esta situación, la síntesis y uso de plásticos biodegradables en lugar de los derivados del petróleo presenta una solución efectiva a esta problemática. En la búsqueda de materiales amigables con el ambiente, se han desarrollado diferentes plásticos

biodegradables a partir de polímeros naturales, formulados de manera convencional, por síntesis química, o por fermentaciones microbianas (Kumar y col., 2004).

Entre los plásticos biodegradables, los más prometedores desde el punto de vista comercial son los derivados del almidón y la celulosa, y los polímeros producidos por microorganismos, como por ejemplo los polihidroxialcanoatos (PHA), los polímeros del ácido láctico (PLA), las policaprolactonas (PCL) y los polialquilensuccinatos. Entre todos los polímeros biodegradables con aplicación industrial anteriormente citados, los PHAs, particularmente el Poli-3-Hidroxi-Butirato (P3HB) y el polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (P(3HBco3HV)), han despertado un creciente interés tanto a nivel científico como comercial, debido a que presentan propiedades similares a los termoplásticos convencionales y son completamente biodegradables siempre que se encuentren en el ambiente adecuado. Además y a diferencia de los polímeros del ácido láctico (PLA) cuya producción supera actualmente a la de los PHAs, los PHAs son polímeros susceptibles de ser sintetizados mediante metabolismo bacteriano a partir de fuentes de carbono renovables, y por lo tanto con un coste cero desde el punto de vista económico y ambiental en cuanto a la materia prima se refiere. Es debido a esto que se buscan fuentes de sustrato económicas o de desecho con el fin de minimizar los costos de producción de los cuales entre el 30 y 40% corresponde a la fuente de carbono. Por el contrario, la producción de PLA conlleva el uso de recursos agrícolas (caso de plantas de maíz, por ejemplo) para obtener el almidón y posteriormente PLA, con el consiguiente agotamiento de los recursos naturales (Cerrone, 2011; González y col., 2012).

## 1.2 Bioplásticos

Los bioplásticos han ganado considerable atención debido a que son amigables con el medio ambiente y pueden ser producidos usando fuentes renovables como aguas residuales agroindustriales y lodos activados (Chakravarty y col., 2010).

Por lo que se consideran como un conjunto de materiales que pueden contribuir de manera efectiva tanto a la protección del ambiente como al desarrollo de la industria del plástico (recuperado de <http://www.anipac.com/bioplasticos.pdf>).

Según la norma mexicana PROY-NMX-E-260-CNCP-2013 para la Industria del Plástico que establece los términos relacionados con materiales bioplásticos, con el objeto de unificar la

terminología empleada en esta área, los materiales bioplásticos son aquellos que provienen de:

- a) Materias primas de origen renovable y son biodegradables.
- b) Materias primas de origen renovable y no son biodegradables.
- c) Materias primas de origen petroquímico y biodegradables.

Los PoliHidroxiAlcanoatos (PHA), son bioplásticos conocidos también como son biopoliésteres sintetizados intracelularmente por algunos microorganismos como reserva de carbono y energía que, una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas similares a plásticos derivados del petróleo. A partir de la década de 1980 han sido estudiados intensamente y actualmente siguen siendo un tema de investigación importante, sobre todo como sustitutos de los plásticos de origen petroquímico, ya que los PHA son completamente biodegradables y se producen a partir de fuentes de carbono renovables (González y col., 2012).

### **1.3 Clasificación de PHA**

Los PHAs se clasifican de acuerdo a la composición en carbonos de sus monómeros: (a) PHA de cadena corta (PHA SCL, Short-Chain-Lenght), conformados por monómeros de 3 a átomos de 5 carbonos, como el Poli-3-hidroxi valerato (P(3HV)) y el Poli-3-hidroxi butirato (P(3HB)) que está formado por unidades de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico son considerados como termoplásticos. (b) De cadena mediana (PHA MCL, Medium-Chain-Lenght), constituidos por monómeros de 6 a 14 carbonos como el co-polímero P(3HBcoHV) considerados elastómeros y cauchos. Y (c) de cadena mixta (PHA MCM), que combinan los dos anteriores y que por tanto, constan de monómeros entre 3 y 14 carbonos, como es el caso del Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato-co-3-hidroxi hexanoato (Poli(3HB-co-3HV-co-3HHx)). Dependiendo del número de carbonos, los PHA presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad, siendo dichas propiedades clave para sus aplicaciones en los campos industriales, farmacéuticos, médicos y agrícolas. Desde el punto de vista industrial, se destacan el PHB y el Poli 3(HB-co-HV) (Sánchez y col., 2012; Cardoba y col., 2013).

### 1.4 Propiedades y aplicaciones de PHAs

Los PHA tienen pesos moleculares altos, características termoplásticas o elastoméricas y otras propiedades físicas y mecánicas que los hacen adecuados para varias aplicaciones en la industria de empaques, medicina, farmacia, agricultura y alimentos (González y col., 2012). Los PHA más utilizados en la industria son los de cadena corta (PHA-SCL) tal es el caso de P3HB, que es un termoplástico con propiedades similares al polipropileno (PP), uno de los plásticos más usados de la industria petroquímica y en técnicas de moldeo. En la tabla 1 se muestra una comparación entre estos dos polímeros. Otro PHA de cadena corta ampliamente usado es el P(3HBco3HV), el cual tiene aplicaciones como material de empaque, por su baja difusividad de oxígeno, productos higiénicos, agrícolas y biomédicos.

Tabla 1. Propiedades físicas del propileno (PP) y polihidroxibutirato PHB (Andler, 2013)

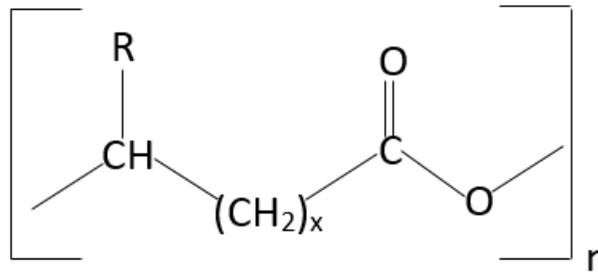
Parámetro	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea (°C)	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50-70
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

La aplicación más conocida de estos biopolímeros de cadena corta es la fabricación de botellas desechables para champú, contenedores para productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos. También es posible usarlos en la forma de látex acuoso para cubiertas de materiales como papel o cartón. Debido a su resistencia al agua, ésta cubierta protege al papel o cartón contra el deterioro causado por la humedad (Cerrone, 2011).

Las propiedades físicas y mecánicas de estos materiales dependen de su composición monomérica, peso molecular y la distribución del peso molecular del polímero, siendo las dos últimas características las más importantes para su comercialización adecuada (Ortiz, 2009). Los monómeros están conectados por enlaces éster, formando el polímero PHB, y estos polímeros se agregan en gránulos (Brock y col., 1987).

El peso molecular de estos polímeros, varía de  $2 \times 10^5$  a  $6 \times 10^3$  Daltones, y en consecuencia sus características físicas dependen de los microorganismos que los producen, de las

condiciones de crecimiento, de la posición del radical R o del grupo hidroxilo, así como del grado de polimerización (Ortiz, 2009).



**Figura 1.** Estructura polimérica general de los PHA.

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3 hidroxiaácidos, en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente, el grupo radical R puede ser CH<sub>3</sub>, el cual da como resultante el PHB, mientras que si R es CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> el PHA será el PHV. (Almeida y col., 2004)

En cuanto a las aplicaciones de los PHA de cadena corta, se han utilizados intensamente en la agricultura, en macetas biodegradables, tubos de irrigación y matrices para la liberación controlada de factores de crecimiento, pesticidas y herbicidas. Una ventaja en este campo de aplicación es que el polímero no requiere un grado de purificación muy alto, lo cual puede facilitar el proceso de extracción y hacerlo más económico (González y col., 2012; Gómez, 2013).

La biocompatibilidad de los PHA con el tejido humano y reabsorbidos a baja velocidad, los han convertido en una alternativa en la fabricación de implantes, suturas, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos, ya que en el cuerpo son hidrolizados en metabolitos biocompatibles no tóxicos. También se ha propuesto usarlos para fabricar jeringas desechables y lubricantes para guantes de cirugía (González y col., 2012).

Actualmente el 65% de los bioplásticos se utiliza en envases y productos de vida corta, aunque ha aumentado su empleo en medicina, agricultura, fabricación de juguetes, electrónicos, herramientas y autopartes, y farmacéutica (González y col., 2012).

## 1.5 Microbiología de la producción de PHA

Varios estudios han demostrado la producción de PHAs por una amplia variedad de microorganismos, así como algunas plantas y animales. Sin embargo, sólo los microorganismos acumulan PHAs de peso molecular alto, esta capacidad de acumular PHAs favorece su establecimiento y sobrevivencia bajo condiciones de estrés.

Tanto las células procariotas como las eucariotas poseen la capacidad de acumular lípidos como fuente de energía, con alto valor calórico superior a los carbohidratos y las proteínas. La mayoría de las bacterias acumulan lípidos especializados, como por ejemplo los (PHA), entre los cuales, el más común es el (PHB) (Alvarez y col., 2000).

Las células bacterianas presentan en su citoplasma inclusiones de distinta naturaleza, casi siempre la función que desempeña es el almacenamiento de energía o estructural, estos frecuentemente se depositan dentro de las células en forma de grandes gránulos de polímero. Con frecuencia las inclusiones pueden verse directamente con el microscopio de luz sin tinciones especiales, pero puede aumentarse su contraste empleando colorantes (Brock y col., 1987; Gómez, 2013).

Los polímeros de glucosa, almidón y glucógeno, son producidos por muchos procariontes. En ausencia de una fuente externa de energía las células pueden oxidar esta sustancia de almacenamiento energético y ser capaces de mantenerse, aun en condiciones de decaimiento endógeno (Brock y col., 1987).

La formación del polímero tiene una doble ventaja para las células, ya que no solamente es una forma de almacenamiento de energía estable, sino que también los polímeros tienen muy poco efecto sobre la presión osmótica interna de las células (Brock y col., 1987).

Cierta cantidad de energía se pierde cuando se forma un polímero a partir de su monómero, pero la desventaja se recupera gracias a los beneficios que le proporciona a la célula (Brock y col., 1987).

En las algas y las cianobacterias, los productos de almacenamiento son generalmente carbohidratos, como la sacarosa o el almidón, mientras que en las bacterias púrpuras y verdes el producto principal de almacenamiento es el PHB (Brock y col., 1987).

En los organismos procariotes, uno de los cuerpos de inclusiones más común es el PHB, compuesto (Brock y col., 1987).

Los PHA de origen bacteriano son sintetizados intracelularmente como inclusiones citoplasmáticas formando gránulos de naturaleza hidrofóbica, rodeados por una monocapa de fosfolípidos y por proteínas implicadas en el metabolismo del polímero, esto sucede generalmente en presencia de una fuente de carbono en exceso, o cuando hay deficiencia de algún otro nutriente esencial como O, N, P, S o Mg. (Gómez, 2013; Martínez, 2012). Los biopolímeros se encuentran en cualquier organismo y poseen un amplio rango de funciones esenciales y/o benéficas, por ejemplo: conservación y expresión de la información genética; catálisis de reacciones; reserva de Carbono, Nitrógeno, Fosforo y otros nutrientes. Además, de actuar como fuente de energía, protegen la célula contra los ataques de otras células y de factores ambientales peligrosos o intrínsecos. Sin embargo, algunas bacterias son capaces de producirlos incluso sin estar sujetas a cualquier tipo de limitación nutricional (Gómez, 2013).

El número y tamaño de los gránulos, así como su disposición y estructura macromolecular dependen del organismo productor y de las condiciones de producción (Martínez, 2012).

Hasta el momento, se conocen aproximadamente 300 especies bacterianas productoras de PHAs, incluyendo diversas bacterias Gram negativas y Gram positivas, pero solo unas pocas se utilizan industrialmente, dadas sus altas eficiencias en la transformación de los sustratos y concentración final del biopolímero en sus células (Sánchez y col., 2012).

En la tabla 2 se muestran algunos microorganismos puros y consorcios productores de PHA, cultivados en diferentes sistemas, a partir de diversos sustratos, se tabulan los porcentajes de PHA producidos (expresados en base seca).

Tabla 2. Microorganismos productores de PHA y sustratos utilizados (González y col., 2013)

Microorganismo	Sustrato	PHA (%)	Referencia
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Ácido láurico, 1,4 butanediol Dodecanoato, propionato, gluconato	23.6-44.7	Xie y chen (2007), Zhao y col. (2007), Qin y col. (2007)
<i>Alcaligenes latus</i>	Residuos de malta, jugo de maple, sacarosa + propiónico, sacarosa	43-88	Cai y col (2008), Yezza y col (2007), Ramsay y col (1990), Wang y Lee (1997), Yamane y col (1996).
<i>Azetobacter</i>	Glucosa, almidón, alpechín, glucosa + peptona pescado, sacarosa, melazas,	46-85	Stockdale y col (1968), Kim y Chang (1998), Gonzáles López (1996), Page y col (1997), Page y Comish (1993), Page (1992).
<i>Bacillus</i>	Glucosa, residuos lácteos, sacarosa, hidrolizado de semillas, decaonato	66.6-80	Porwal y col (2008), Pandian y col. (2010), Borah y col. (2002), Ramadas y col. (2009), Valappil y col. (2007).
<i>Burkholderia</i>	Hidrolizado hemicelulosas, sacarosa	40-42	Keenan y col. (2006), de Cruz Pradella y col. (2010).
<i>Cupriavidus</i>	Glucosa, residuos líquidos de alimentos, aceite vegetal y propanol, ácidos grasos volátiles, aceite de plantas, glicerol crudo, gama butirólactona	48-87	Atlic y col. (2011), Hafuka y col. (2011), Obruca y col. (2010), Wang y col. (2010), Ng y col. (2010), Mothes y col. (2007), Amirui y col. (2008)
<i>Pseudomonas</i>	Agua residual de Cassava, aceite de copra, suero de leche, octano, glucosa, pentosas, aceite de maíz, dodecanoato, gluconato, metanol.	12-149.1	Costa y col. (2009), Simon-Colin y col. (2008), Koller y col. (2008), Brandl y col. (1988), Huang D-H y col. (2006), Bertrand y col. (1990), Shang y col. (2007), Suzuki y col. (1986).
<i>Ralstonia eutropha</i>	Aceite de soya, glucosa, glucosa/propiónico, tapioca hidrolizada, glucosa, bagazo caña hidrolizada, gluconato, octanoato, fructosa	40.9-86	Park y Kim (2011), Kim y col. (1994a,1994b), Kim y Chang (1995), Ryu y col. (1997), Yu y col. (2008), Chen y col. (2007), Zheng y col. (2006).
<i>Wautersia eutropha</i>	Gluconato de sodio, aceite de canola, fructosa	90	Isemori y col. (2006), López-Cuéllar y col. (2011), Patwardhan y Srivastava (2008).
<i>Halomonas boliviensis</i>	Almidón hidrolizado, sacarosa, maltosa, glucosa	45-80	Quillaguaman y col. (2005; 2007), Kulkarni y col. (2010), Tan y col. (2011).
<i>Saccharophagus degradans</i>	Almidón	25	Gonzáles-García y col. (2010)
Lodos activados aerobios	Aguas residuales	48.2	Bengtsson y Werker (2008)
Lodos anaerobios	Efluentes industriales	58	Khardenavis y col. (2009)
<i>Haloferax mediterranei</i>	Glucosa, almidón hidrolizado	31-56	Garcia Lillo y col. (1990), Huang y col. (2006).

## 1.6 Síntesis biológica de PHA

Numerosas bacterias tienen la capacidad de sintetizar PHAs como material de reserva y fuente de poder reductor (Tabla 2). A pesar de conseguir un biopolímero parecido y almacenable, las rutas metabólicas implicadas difieren por el tipo de bacteria así como por el sustrato utilizado (Cerrone, 2011).

Existen tres grandes rutas metabólicas, con diferente grado de interconexión:

- Síntesis directa desde los azúcares.
- Síntesis a partir de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.
- Síntesis desde la biosíntesis de *novo* de los ácidos grasos.

Las 3 rutas coinciden en crear un intermediario metabólico (3-hidroxiacil-CoA), sustrato que será incorporado, gracias a una PHA sintasa (polimerasa), en un biopolímero, y almacenado gracias a una serie de proteínas con diferentes funciones (Cerrone, 2011) (figura 2).

### 1.6.1 Síntesis a partir de azúcares

En esta ruta los azúcares siguen la ruta convencional de glucólisis hasta piruvato, sin embargo, este no sigue el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA), se desvía hacia la formación del Acetil-CoA. A continuación, la ruta utiliza 3 enzimas en secuencia:  $\beta$  cetotiolasa, una enzima que provoca la condensación de una molécula de Acetil-CoA en una de acetoacetyl-CoA, la hidrolasa o acetoacetylCoA reductasa-NADPH dependiente, que mediante la pérdida de una molécula de agua provoca la incorporación de un radical  $-OH$  y la formación del intermediario (R)-3-hidroxiacilCoA, y finalmente la PHA sintasa (polimerasa) une en cadenas los (R)-3-hidroxiacilCoA sintetizados (figura 2).

### **1.6.2 Síntesis a partir de la $\beta$ -oxidación de ácidos grasos**

Mediante una  $\beta$ -oxidación, los ácidos grasos son oxidados hasta acetyl-CoA, la cual no entra al ciclo del ácido cítrico, se desvía para formar (R)-3-hidroxiacilCoA por medio de cuatro enzimas: la acil-CoA transferasa genera la formación de una molécula de acil-CoA, esta molécula será reducida por la acil-CoA deshidrogenasa a trans-2-enoil-CoA, mediante la liberación de una molécula de agua, para dejar actuar a la enoil-CoA hidratasa que generará el intermediario (S)-3-hidroxiacilCoA y finalmente la epimerasa cambia la conformación de esta última para dar lugar a (R)-3-hidroxiacilCoA (figura 2), el cual es el intermediario metabólico sobre el cual la PHA sintasa actuará para formar el PHA.

### **1.6.3 Síntesis desde la biosíntesis de novo de los ácidos grasos**

Representa un desvío desde la ruta de síntesis de los ácidos grasos, hacia la obtención del monómero necesario para la polimerización en PHAs; el comienzo de la ruta involucra el acetylCoA, que gracias a la AcetylCoA carboxilasa se convierte en Malonil-Coa, el cual gracias a la ACP-maloniltransferasa obtiene la adición al grupo ACP convirtiéndose en Malonil-ACP, siendo así transformado en 3-ketoacil-ACP por la 3-cetoacil-ACP sintasa-dependiente de NADPH, y gracias a una final reducción por la 3-cetoacil-ACP reductasa se genera el (R)-3-hidroxiacil-ACP, liberándose el grupo ACP, gracias a la acción de la 3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilasa generando (R)-3-hidroxiacilCoA y permitiendo la polimerización en PHAs (figura 2).

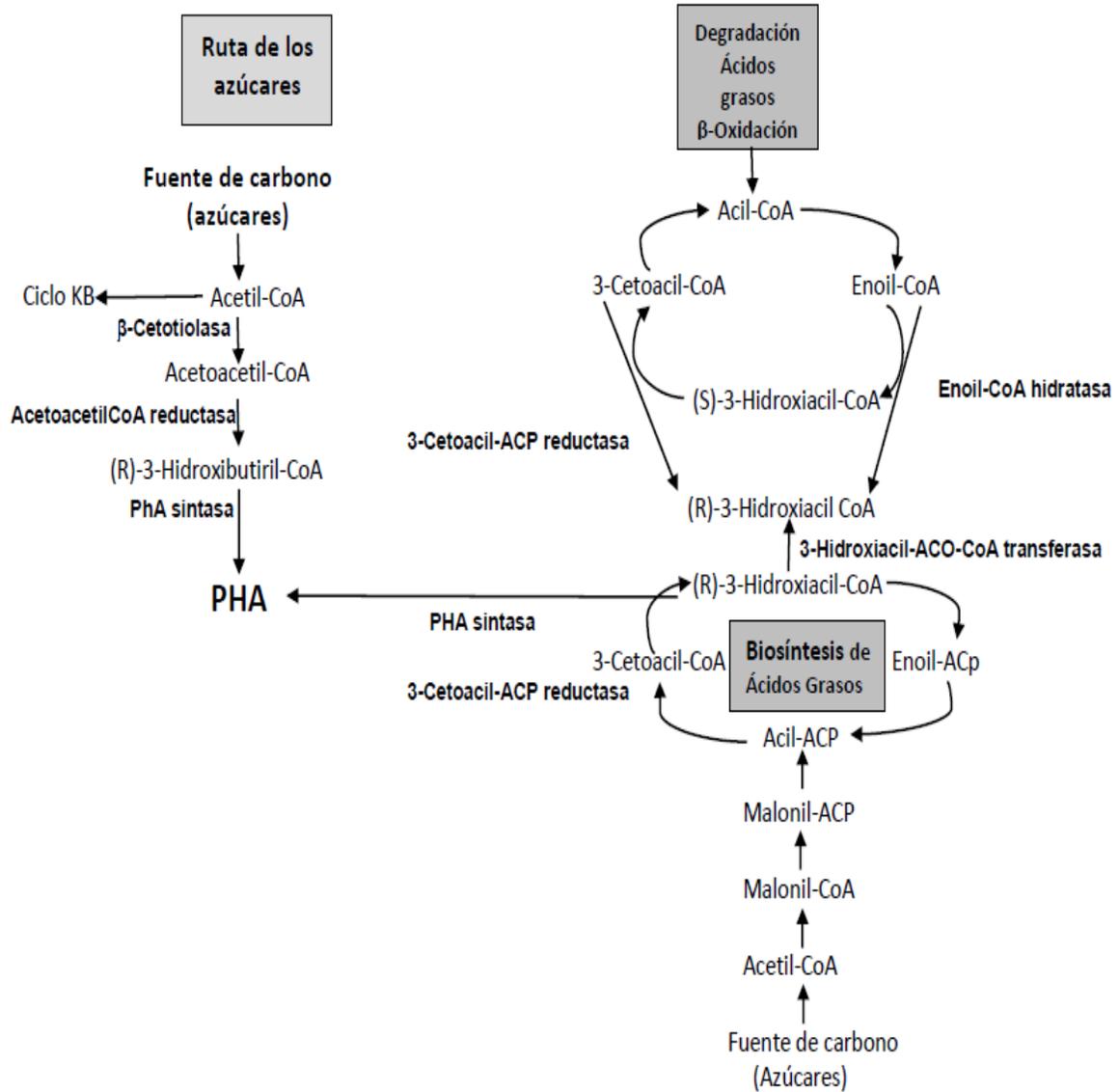


Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs (Tsuge, 2002)

### 1.7 Degradación de PHA

Los PHA se consideran buenos sustitutos de los plásticos derivados del petróleo por ser completamente biodegradables después de desecharlos una vez de haber sido utilizados (Ortiz, 2009).

En la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradarlos hasta CO<sub>2</sub> y agua, en condiciones aerobias, y hasta metano, en condiciones anaerobias, por acción de las enzimas PHA despolimerasas y PHA hidrolasas. Los tiempos de degradación de los PHA varían de acuerdo a las condiciones ambientales, bajo condiciones anaerobias la degradación se da en 6 semanas, mientras que en aeróbiosis la degradación ocurre en 60 semanas, en la tabla 3 se muestran los diferentes tiempos de degradación de PHA en distintos ambientes (Ortiz, 2009).

Tabla 3. Tiempo que tardan los PHA en degradarse en diferentes ambientes  
(Lucier, 1992).

Ambiente	100% de pérdida de masa (semanas)
Ambiente anaerobio	6
Sedimentos de estuarios	40
Ambiente aerobio	60
Suelo	75
Agua de mar	350

### 1.8 Factores ambientales para la producción de PHA

Los factores que afectan el contenido de monómeros incluyen: el tipo de microorganismos, los ingredientes del medio de cultivo, las condiciones de fermentación, los tipos de fermentación (por lotes y continuos) y el método de recuperación de los mismos una vez extraídos de la célula (Gómez, 2013).

Se requiere establecer los valores óptimos para cada uno de los parámetros operacionales involucrados en el proceso fermentativo. Los de mayor incidencia son: la temperatura, pH y el tiempo de fermentación (Gómez, 2013).

### **1.8.1 Temperatura**

La temperatura es una variable de gran interés en la mayoría de los procesos que involucran metabolismo microbiano para la producción de biopolímeros. La gran mayoría de investigaciones han desarrollado sus experimentos a 30°C, sin embargo, se tienen reportes donde han trabajado entre 22°C y 37°C, independientemente del microorganismo empleado en el proceso fermentativo. (Gómez, 2013; Lemos y col., 2006; Bengtsson y col., 2008)

### **1.8.2 pH**

El pH es tan importante como la temperatura en los procesos biológicos, por esta razón algunos autores han investigado tanto su efecto individual, como el efecto combinado con otras variables como la temperatura y el tipo de sustrato, sobre el proceso de producción de PHA. El intervalo de pH utilizado para la producción de PHA es muy amplio desde pH 2.0 hasta 11.0, siendo 7 el más utilizado (Gómez, 2013).

## **1.9 Sustratos empleados en la producción de PHA**

La fuente de carbono preferente para la producción de PHA son los azúcares como la glucosa, sacarosa y ciertos ácidos grasos de cadena corta, lo cual hace el proceso costoso. Una alternativa para reducir los costos en la producción de PHA, es sustituir estos sustratos por residuos con un alto contenido de materia orgánica, como los desechos agrícolas, aguas residuales, lodos de purga, residuos sólidos entre otros, con la finalidad de usar estas fuentes de desechos y obtener un valor agregado del mismo (Cerrone, 2011; Albuquerque y col., 2011). La tabla 4 muestra algunos residuos utilizados para la producción de PHA.

Tabla 4. Producción de PHA a partir de distintos residuos industriales

(Yang y col. 2013)

Tipo de Agua Residual	AGV (%)	Máximo contenido de PHA (%)	Referencia
Melaza de caña de azúcar	85	>30	Albuquerque y col., 2007
Melaza de caña de azúcar	75	75	Albuquerque y col., 2010
Melaza de caña de azúcar	ND	56	Albuquerque y col., 2011
Procesado de madera Suero	37-42 84-97	29 ND	Ben y col., 2011
Industria de papel Industria de pulpa	75-100 55	ND ND	Bengtsson y col., 2008
Industria de papel	74	42	Bengtsson y col., 2008c
Industria de papel	74	48	Bengtsson y col., 2008b
Melazas de caña de azúcar	ND	37	Bengtsson y col., 2010
Industria de aceite de oliva	22-44	55	Dionisi y col., 2005
Industria de madera	37	25	Mato y col., 2010
Corriente de desechos de lodos	60	21	Morgan-Sagastume y col., 2010
Desechos de comida	53	40	Reddy y Mohan., 2012

### 1.10 Producción de PHA

Los PHAs han sido industrialmente producidos por cultivos puros como *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, recombinantes de *Alcaligenes eutrophus* y *Escherichia coli*. Sin embargo, uno de los inconvenientes más grandes de este proceso es el alto costo de operación, donde el 11% incluye inversión en cultivos puros y sustratos, un ambiente completamente estéril y el mantenimiento del reactor (Albuquerque y col., 2011), esto incrementa sus costos cerca de 4 a 9 veces con respecto a los plásticos convencionales.

La forma más simple para la producción de PHA implica usar cultivos puros se realiza en 2 etapas en un sistema por lotes. En una primera etapa se enriquece el inóculo de la cepa microbiana, en un medio estéril que contiene: solución de elementos traza, con una fuente de carbono (glucosa) y nutrientes disponibles (P, N, O<sub>2</sub>). En la segunda etapa se limita de forma deliberada algunos de los nutrientes esenciales, llevándose a cabo la acumulación de PHA. Este mismo principio es empleado en los procesos por lotes alimentados y en continuo, solo que las escalas varían y la productividad se incrementa hasta 1.7 veces más que en los procesos por lotes.

Comparado con un cultivo puro, los cultivos mixtos son una alternativa más económica, su control es simple, no se necesitan condiciones estériles y debido a lo complejo de la microflora se pueden utilizar una gran diversidad de residuos, como las melazas, residuos de la industria de papel o residuos lácteos (Venkateswar y Venkata., 2012).

El uso de cultivos donde la biomasa es un consorcio de microorganismos, como los lodos activados de plantas de tratamiento, ha sido propuesto recientemente. Esto reduce el costo de la materia prima y por lo tanto del proceso en general, y además representa un valor agregado al poder obtener un producto de alto valor a partir de desechos (Arcos, 2007).

El almacenamiento de PHA en cultivos mixtos es particularmente importante, si el lodo es sometido a períodos consecutivos de disponibilidad de sustrato (abundancia) y periodos de ausencia de sustrato (ayuno). Este proceso se conoce como Alimentación Dinámica Aerobia o de Ayuno y Abundancia. Bajo estas condiciones dinámicas, cuando hay un exceso de la fuente de carbono la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para crecimiento y para acumulación de polímero, y cuando el sustrato es agotado, es decir cuando se presentan condiciones de limitación por carbono, el PHA acumulado por la célula puede ser hidrolizado y empleado como fuente de carbono y energía (Arcos, 2007; Martínez, 2012).

La clave para la efectividad, en términos de capacidad de almacenamiento y productividad de PHA en cultivos mixtos microbianos, se basa en el enriquecimiento de organismos acumuladores de PHA. Los rendimientos obtenidos con cultivos mixtos son semejantes a los obtenidos con cultivos puros, pero tienen la ventaja de no requerir condiciones estériles (Serafim y col., 2004).

Anshuman y col. (2007) reportaron la producción de PHB en un reactor quimiostato agitado a 150 rpm, alimentado con aguas residuales del tratamiento de residuos

agroindustriales, obtuvieron un porcentaje de PHB del 40.9%, y un rendimiento de 0.212 g PHB/g DQO removida.

Lemos P. y col. (2005) sintetizaron PHA en un reactor SBR (Secuencial Batch Reactor) aerobio, inoculado con lodos activados, a un TRH de 1 día, y una aireación de 1 vvm (volumen aire/volumen reactor min), una temperatura de 22 °C y una agitación de 250 rpm. Obteniendo un rendimiento de 0.45 Cmmol PHA/Cmmol S usando butirato como fuente de carbono, mientras que con valerato como fuente de carbono se obtuvo 0.38 Cmmol PHA/Cmmol S.

Phasakanon y col. (2014) emplearon un reactor SBR alimentado con una mezcla de aguas residuales domésticas y residuos de glicerol, operado en ciclos óxico/anóxico, obteniendo un rendimiento de PHA de 1.8687 g/L equivalente a 61.42% en peso seco.

### 1.11 Antecedentes directos

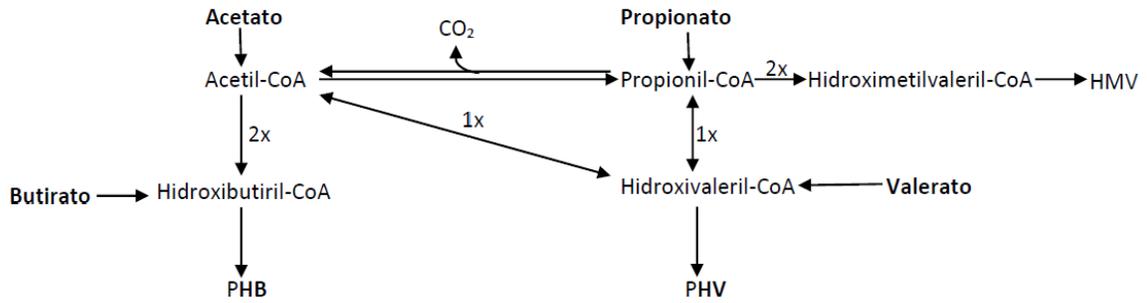
Johnson y col. (2010a) menciona, que para la producción de PHA utilizando cultivos mixtos generalmente se requieren 3 pasos. 1) Fermentación de fuentes de desecho para producir AGV's, 2) Selección del cultivo (enriquecimiento de biomasa) y 3) producción de PHA.

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son los precursores inmediatos para la producción de polihidroxicanoatos PHA por la vía de la beta oxidación, la composición del monómero de PHA depende del tipo de AGV presente, el acetato y butirato tienden a formar Hidroxibutirato (HB) mientras que propionato y valerato tienden a formar Hidroxivalerato, (HV) (figura 3) (Lemos y col., 2006).

Una fermentación acidogénica puede servir como pretratamiento de sustratos carbonados para la producción de PHA debido a que el producto final son AGV's. Bengtsson y col. (2008) utilizaron un reactor quimiostato acidogénico (pH 6) para la producción de AGV, alimentado con efluentes industriales (industria del papel). Obteniendo como AGV mayoritarios acético y propiónico; y en menor concentración butírico y valérico.

Marang y col. (2013), enriquecieron biomasa acumuladora de PHA utilizando ácido acético como fuente de carbono, esta biomasa fue empleada para estudiar el efecto del butirato y una mezcla de butirato/acetato para la producción de PHA. Los resultados obtenidos mostraron que el rendimiento de PHA con butirato como única fuente de carbono fue de 0.94 Cmmol/mmol, 40% superior al rendimiento obtenido con acetato. Con

la mezcla acético/butírico se obtuvieron resultados similares a los encontrados cuando se empleó butírico como única fuente de carbono.



**Figura 3.** Producción de polímero a partir de AGV (Lemos y col., 2006).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Una fracción importante de los residuos sólidos urbanos es la materia orgánica, la cual puede ser tratada en condiciones aerobias (compostaje) o anaerobias (biometanización), que tienen como finalidad la conversión de la fracción biodegradable en fertilizantes en el primer caso y la producción de biogás en el segundo caso. El compostaje se basa en la descomposición biológica de la materia orgánica con la subsecuente producción de un residuo líquido denominado lixiviado. Este residuo contiene altas concentraciones de materia orgánica, 100 a 130 gDQO/L, ST 68-75 g/L, pH ácido (4.0 – 5.0),  $\text{NH}_4^+$  (1.188 g/L) y ácidos grasos volátiles (acético 10.0 gDQO-AGV/L, propiónico 2.32 gDQO-AGV/L, butírico 4.42 gDQO-AGV/L y valérico 0.79 gDQO-AGV/L) (Cárdenas, 2013).

La producción de polihidroxicanoato (PHA) basada en fuentes de desecho por enriquecimientos bacterianos generalmente es llevada a cabo en tres pasos:

1. La fuente de desecho es convertida en ácidos grasos volátiles.
2. Un reactor donde se enriquecerán las bacterias productoras de PHA es establecido.
3. Un reactor donde el contenido del biopolímero de la comunidad bacteriana es maximizado (Moralejo y col., 2014).

El lixiviado de basura orgánica posee altos contenidos de AGV's, motivo por el cual, el paso 1 es evitado. Debido a las características antes mencionadas, los lixiviados procedentes del composteo de basura orgánica son una buena fuente de sustratos para las bacterias productoras de PHA.

### **3. HIPÓTESIS**

Los lixiviados de basura orgánica, serán una fuente de carbono susceptible a ser utilizada como sustrato para la producción de PHB, en un sistema aerobio inoculado con lodos activados.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la obtención de PHB a partir de lixiviados provenientes de desechos sólidos urbanos, usando como inóculo un cultivo mixto de lodos activados.

#### **4.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

Enriquecer biomasa productora de PHB a partir de lodos activados, alimentados con lixiviados de basura orgánica en un reactor SBR.

Detectar la presencia de PHB en la biomasa enriquecida.

Evaluar la producción de PHB en modo continuo.

## **5. Metodología**

### **5.1 Técnicas analíticas**

Para la caracterización de lixiviados, monitoreo de la operación del reactor, identificación y cuantificación de PHB se pusieron a punto las siguientes técnicas analíticas:

#### **5.1.1 pH**

La medición de pH se realizó mediante un electrodo marca Thermo SCIENTIFIC, modelo ORION STAR A215, electrodo ORION 8157BNUMD.

#### **5.1.2 DQO total y soluble**

Se determinó el contenido de materia orgánica en los lixiviados, influente y efluente del reactor por medio del método de reflujo cerrado, el cual cuantifica la DQO como la cantidad de oxígeno equivalente a la materia orgánica contenida en una muestra que es susceptible a oxidación (APHA, 2005). (ver Anexos)

#### **5.1.3 Amonio**

La determinación está basada en la reacción de hipoclorito de sodio en presencia de fenol, formando primero monocloramina y en presencia de cantidades catalíticas de Nitroprusiato de sodio, la monocloramina se transforma en un compuesto azul de indofenol a un pH mayor de 9.6, el cual se absorbe a 640 nm (APHA 2005).

El análisis se realizó al influente y efluente del SBR, para la y caracterización del lixiviado (Anexos).

#### **5.1.4 Sólidos Totales**

El contenido de sólidos totales en las muestras de lixiviado, influente, efluente y reactor fueron analizadas por el método gravimétrico (APHA 2005).

Los sólidos totales están compuestos de material suspendido, sedimentable, coloidal y disuelto (Metccalf y Eddy., 1991).

Sólidos totales es la expresión que se aplica a la cantidad de materia que permanece como residuo después de la evaporación de la muestra, a una temperatura definida (103 y 105 °C), mientras que los sólidos fijos es el residuo obtenido después de la calcinación a 550 °C donde se encuentra el contenido mineral, y los volátiles son la diferencia entre los totales y los fijos (Anexos).

### **5.1.5 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's)**

La determinación de AGV's, se realizó para el lixiviado, influente y efluente del reactor por medio de cromatografía de gases en un equipo Hewlett Packard 5890 Serie II, con una columna AT-1000, y detector FID, las condiciones de trabajo se muestran en los Anexos.

### **5.1.6 Identificación de PHB por microscopía**

Debido a su naturaleza lipídica, la detección y aislamiento de bacterias productoras de PHBs se fundamenta en la utilización de colorantes lipofílicos como el negro Sudán, el azul Nilo y rojo Nilo, siendo azul Nilo el colorante más empleado (Cardoba y col., 2013). Se determinó la presencia de PHB 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.

### **5.1.7 Cuantificación de PHA por gravimetría**

El contenido de PHA se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Gómez, 2013 (Anexos). El precipitado obtenido tiene una coloración blanquecina.

### **5.1.8 Cuantificación de PHB por espectrometría**

Este ensayo fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito por Peña y col. (1997), en este método el PHB es transformado a ácido crotónico mediante una acidificación con  $H_2SO_4$ , para posteriormente ser medido en un espectrofotómetro a 235 nm. (Anexos).

## **5.2 Muestreo y caracterización del lixiviado**

Se realizaron 6 muestreos en la planta de composteo "Bordo Poniente" entre los meses de abril 2015 a abril 2016 (tabla 8), los cuales se almacenaron en refrigeración para su posterior caracterización.

## **5.3 Producción de PHB a partir de lixiviados de basura orgánica**

Se llevó a cabo el enriquecimiento de biomasa productora de PHB en un reactor SBR de 1 L, el cual operó en ciclos de saciedad/ayuno, para favorecer la acumulación de biomasa productora de PHBs.

EL reactor fue inoculado con 1 L lodos activados provenientes de la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” con un contenido de SV de 3.35 g/L.

En la etapa de enriquecimiento, el SBR se operó durante 243 días, dividido en 6 etapas (tabla 5). El reactor fue alimentado con lixiviado de basura orgánica diluido con agua residual del campus universitario (UAM-I. Para el arranque el pH fue ajustado a 7 con NaOH 1 M o HCl 1 M).

Tabla 5. Etapas de operación del reactor de enriquecimiento y producción.

ETAPA	DÍAS DE OPERACIÓN	DQO <sub>T</sub> (g/L)	DQO <sub>S</sub> (g/L)
1	19	1.8 ± 0.2	1.52 ± 0.23
2	19	6.82 ± 0.67	5.49 ± 0.48
3	83	6.13 ± 0.61	4.93 ± 0.44
4	48	7.34 ± 0.51	5.93 ± 0.31
5	42	6.09 ± 0.83	5.10 ± 0.65
6	32	8.35 ± 0.7	7.01 ± 0.86
P1	34	9.09 ± 0.4	8.1 ± 0.3
P2	55	5.6 ± 1.33	5.06 ± 1.07

Las condiciones de operación fueron: un volumen de intercambio del 25%, un TRH de 1 día, distribuido en dos ciclos de 12 horas, cada ciclo contaba con las fases mostradas en la tabla 6. Los ciclos fueron controlados por medio de un DATA LOGGER MONITORING SYSTEM (DATA LOGGER), una agitación de 220 rpm, temperatura ambiente, y el flujo de aire de 1.7 L/min.

Tabla 6. Ciclo de operación del reactor SBR para el enriquecimiento de biomasa productora de PHB.

Alimentación	5´	
Agitación, aireación (reacción)		655´
Sedimentación		45´
Drenado		10´

Durante la etapa de enriquecimiento se siguieron al influente y efluente los siguientes parámetros: DQOt, DQOs, pH, AGV's, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sólidos totales, así como identificación y cuantificación de PHB.

Una vez que la biomasa fue enriquecida con bacterias acumuladoras de PHB, esta se transfirió a un reactor tubular de 1.5 L, se alimentó con lixiviados de basura orgánica diluidos con agua residual a una concentración promedio de  $8.81 \pm 1.4$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $7.85 \pm 1.056$  gDQO<sub>S</sub>/L. El reactor fue operado durante 89 días, en dos distintas modalidades, a) en modo continuo a un TRH de 1 día, aireación y agitación continua (P1) y b) modo secuencial con las siguientes condiciones operación fueron: 25% de volumen de intercambio, 250 rpm, y TRH de 1 día, distribuido en: alimentación (5 minutos), reacción (700 minutos) y drenado (10 minutos) (tabla 7).

Los parámetros a analizar para la producción fueron los mismos empleados en la etapa de enriquecimiento.

Tabla 7: Ciclo de operación en modo secuencial en la etapa de producción.

Alimentación	5'	
Agitación, aireación (reacción)		700'
Drenado		10'

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Técnicas analíticas.

Se pusieron a punto las técnicas analíticas necesarias para la realización de este estudio, las ecuaciones lineales, así como sus respectivos coeficientes de variación se presentan en los Anexos.

### 6.2 Muestreo y caracterización de lixiviados

Se llevó a cabo el muestreo en la planta de composteo “Bordo Poniente” en diferentes fechas entre el 2015 y 2016 para su posterior caracterización. Los resultados de las propiedades fisicoquímicas caracterizadas se muestran en la tabla 8.

Con respecto al pH este se encuentra en un intervalo de 4.39-5.3, una DQO total de 72.41-123.94 gDQO<sub>T</sub>/L y soluble de 61.69-99.56 gDQO<sub>S</sub>/L, estos resultados son semejantes a los reportados por Cárdenas (2013) quién realizó una caracterización de lixiviados generados en Bordo Poniente durante todo un año, con una DQO<sub>T</sub> de 89.8 a 132.5 gDQO/L y DQO<sub>S</sub> de 80.5 a 121.7 gDQO/L. La DQO soluble representa entre el 80 y 88% de la DQO total, el contenido de AGV representa entre el 60 y 96% de la DQO soluble.

En cuanto al contenido de ST estos se encuentran entre 56.8 - 85.23 g/L, mientras que el contenido de SV representan entre el 58 – 69% de los ST, con excepción del lote muestreado en el mes de agosto. Estos resultados son semejantes a los reportados por Cárdenas, (2013) quien realiza un muestreo en distintas épocas del año y la variabilidad se debe en este parámetro a la época del año.

Tabla 8: Caracterización de lotes de lixiviados

Parámetro	Febrero	Junio	Agosto	Octubre	Enero	Abril
pH	5.3	5.2	4.48	5.3	4.6	4.39
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg/L	1.38 ± 0.003	1.13 ± 0.003	0.65 ± 0.01	2.17 ± 0.01	1.47 ± 0.001	1.48 ± 0.0
DQOT g/L	100.3 ± 0.009	93.2 ± 0.007	75.4 ± 0.007	72.4 ± 0.007	99.4 ± 0.006	123.9 ± 0.002
DQOs g/L	81.9 ± 0.004	82.9 ± 0.002	61.7 ± 0.002	61.8 ± 0.001	84.7 ± 0.0007	99.6 ± 0.001
ST g/L	63.2 ± 1.3	56.8 ± 1.8	72.5 ± 0.9	66.1 ± 1.7	49.9 ± 1.3	85.2 ± 1.5
SF g/L	25.5 ± 0.1	23.4 ± 0.16	46.9 ± 0.5	22.9 ± 0.03	15.4 ± 0.2	27.6 ± 0.3
SV g/L	37.68 ± 1.3	33.3 ± 1.7	25.5 ± 0.4	43.1 ± 1.7	34.5 ± 1.5	57.6 ± 1.2
AGVs g/L	36.4 ± 0.4	41.4 ± 0.002	37.5 ± 0.14	59.6 ± 1.0	30.7 ± 0.3	31.9 ± 0.3

### 6.3 Puesta en marcha del reactor.

Se puso en marcha un reactor SBR inoculándolo con 1000 mL de lodos activados, procedentes del sedimentador secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Cerro de la Estrella. El lixiviado se diluyó con agua residual procedente de la UAM-I. La operación del reactor tuvo una duración total de 332 días, la cual se dividió en 2 fases, siendo la primera de enriquecimiento de biomasa productora de PHB con una duración de 243 días, la cual se dividió en 6 etapas, mientras que, la fase dos fue para la producción de PHB y se dividió en 2 etapas.

#### 6.3.1 DQO

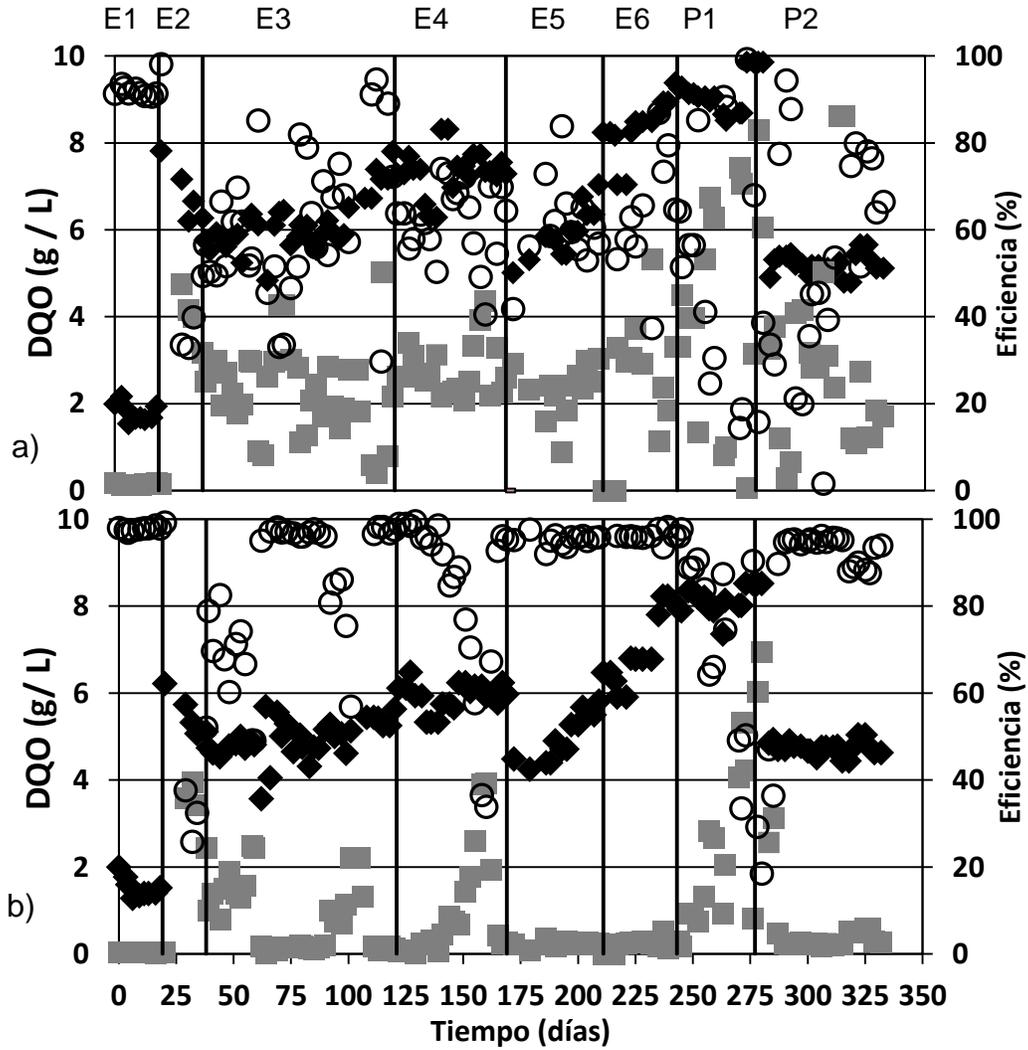
Todas las etapas se caracterizan por cambios en la concentración de materia orgánica, medida como DQO total y soluble en el influente. A continuación se describe cada una de estas. Después de realizar la dilución de lixiviado con agua residual, El pH de la alimentación se ajustó a 7 con NaOH 3N.

ETAPA 1: Se operó el reactor durante 19 días a una concentración promedio de  $1.80 \pm 0.20$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $1.52 \pm 0.23$  gDQO<sub>S</sub>/L, bajo estas condiciones de operación se obtuvieron eficiencias de remoción del 91.77% y de 97.78%, respectivamente (Figura 4). A partir del día 20 de operación, se incrementó la alimentación a  $6.82 \pm 0.67$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $5.48 \pm 0.48$  gDQO<sub>S</sub>/L, respectivamente, la operación bajo estas condiciones duró 19 días, etapa 2. Este cambio en las condiciones de operación provocó la pérdida de sólidos en el reactor (12.42 g/L), traduciéndose en bajas eficiencias de remoción de DQO total y soluble, 50.78% y 49.45%, respectivamente. Debido a la baja eficiencia de remoción en la etapa 2, para la etapa 3 se procedió a disminuir la concentración de DQO, registrándose concentraciones promedio de  $6.13 \pm 0.61$  gDQO<sub>T</sub>/L y de  $4.93 \pm 0.44$  gDQO<sub>S</sub>/L, respectivamente. Bajo estas nuevas condiciones se operó el reactor durante 83 días, alcanzándose eficiencias de remoción de, 61.7% total y 84.48% soluble.

Para la etapa 4, se operó el reactor durante 47 días, a una concentración promedio de  $7.34 \pm 0.51$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $5.93 \pm 0.31$  gDQO<sub>S</sub>/L, con eficiencias de remoción de 61.91% y 83.81%, respectivamente.

La etapa 5 corresponde a la recuperación del proceso después de un periodo vacacional (14 días) donde fue alimentado a 5.0 gDQO<sub>T</sub>/L, transcurrido este tiempo se fue incrementado gradualmente la concentración hasta una concentración promedio de  $6.09 \pm$

0.83 gDQO<sub>7</sub>/L y 5.10 ± 0.65 gDQO<sub>S</sub>/L, las eficiencias obtenidas fueron de 60.93% y 95.31%, respectivamente.



**Figura 4.** Perfil de consumo de materia orgánica, a) DQO total, b) DQO soluble, (♦) Influyente, (■) Efluente y (○) Eficiencia

En la etapa 6 corresponde a la última etapa de enriquecimiento, la cual duró 32 días, en la cual las concentraciones de trabajo fueron  $8.73 \pm 1.53$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $7.32 \pm 1.39$  gDQO<sub>S</sub>/L. Bajo estas condiciones de operación las eficiencias de remoción fueron muy similares a las obtenidas en la etapa previa, 63.78% y 96.2%, respectivamente.

Durante la primer etapa de producción P1, el reactor operó en continuo y se incrementó la concentración a  $9.09 \pm 0.4$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $8.1 \pm 0.3$  gDQO<sub>S</sub>/L, respectivamente, con la finalidad de mejorar la producción de PHB. Con estas condiciones de operación las eficiencias de remoción disminuyeron significativamente a 56.4% y 75.86%, respectivamente. La baja eficiencia de remoción de DQO total se debió al lavado de biomasa del reactor, la cual disminuyó de  $5.57 \pm 1.9$  g a  $4.08 \pm 0.79$  gSV/L, registrándose en el efluente un promedio de  $3.24 \pm 0.5$  gSV/L. Mientras que la baja eficiencia de DQO soluble está estrechamente relacionado con la pérdida de biomasa, ya que al existir menos biomasa en el reactor esta no es suficiente para remover la DQO soluble en el TRH establecido.

Con la finalidad de recuperar el sistema, en la etapa P2 se cambió el modo de operación continuo a secuencial. Esta etapa tuvo una duración 55 días con concentraciones promedio de  $5.6 \pm 1.33$  gDQO<sub>T</sub>/L y  $5.06 \pm 1.07$  gDQO<sub>S</sub>/L. Bajo estas condiciones de operación se recuperó la eficiencia de remoción, de la DQO soluble a 83.08%.

La Tabla 9 muestra las eficiencias de remoción obtenidas en el reactor. Se puede apreciar que a bajas concentraciones en la etapa 1, se obtuvieron eficiencias superiores al 90% para ambas DQO, sin embargo, cuando se incrementó la concentración a  $6.82$  gDQO<sub>T</sub>/L (etapa 2), ambas eficiencias disminuyeron al 50 %. A partir de la etapa 3, el reactor recuperó ambas eficiencias siendo mayor para el caso de la DQO soluble, que alcanzó un máximo del 96.2% al final del enriquecimiento, estos resultados son similares a los reportados por Quin y Liu (2006) quienes utilizaron etanol como fuente de carbono, y Bengtsson (2008) quien uso un efluente de una industria papelera. Ambos casos siendo efluentes altamente contaminantes a los cuales se les puede obtener un valor agregado al usarlo para producción de PHB.

Los sólidos generados en el reactor en cada ciclo, ocasionaron bajas eficiencias de DQO<sub>T</sub> esto debido al contenido de biomasa en el efluente, ya que este sistema cuenta con una etapa de purga donde se acarrea biomasa acumuladora de PHB, los sólidos en el reactor para cada etapa se muestran en la tabla 10, en la cual se observan ligeras variaciones.

La baja eficiencia de remoción de la DQO total es debida a la presencia de sólidos en el efluente que son eliminados del reactor en la etapa de purga, siendo esta biomasa la de interés para identificar y cuantificar la producción de PHB.

Tabla 9. Eficiencias de remoción de DQO

ETAPA	EFICIENCIA TOTAL (%)	EFICIENCIA SOLUBLE (%)
1	91.77	97.78
2	50.78	49.45
3	61.60	84.48
4	61.91	83.81
5	60.93	95.31
6	63.78	96.20
P1	56.40	75.86
P2	51.36	83.08

Tabla 10. Contenido de sólidos en el reactor

Etapa	ST (g/L)	SF (g/L)	SV (g/L)
1	7.15	3.29	3.86
2	9.57	3.84	5.73
3	10.32	4.91	5.40
4	8.91	3.57	5.33
5	6.48	2.95	3.52
6	9.16	4.03	5.12
P1	8.96	4.13	4.82
P2	8.86	4.12	4.73

### 6.3.2 Amonio

El amonio es un nutriente utilizado por microorganismos para el crecimiento celular, sin embargo si este se encuentra en condiciones limitantes, el crecimiento celular se verá afectado lo cual con lleva a una acumulación de PHB optima, este comportamiento es debido a que los microorganismos tendrán prioridad en el consumo de sustrato y síntesis de PHB dejando en segundo plano el crecimiento, por otra parte si el amonio se encuentra en exceso las bacterias se enfocaran en el crecimiento, dejando en segundo plano la acumulación de PHB.

Este comportamiento se ha reportado por Johnson K. y col. (2010a) quienes estudiaron el efecto de la relación C/N (mol C/mol N) sobre la producción de PHB, al ensayar concentraciones de amonio entre 4.0 – 25 mM  $\text{NH}_4^+$ . En la Figura 6, se muestra el perfil de amonio, en la cual se observa que este oscila entre 33 – 280 mg  $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$  (2.5 -20.57 mM de  $\text{NH}_4^+$ ); estas concentraciones coinciden con lo reportado por Johnson y col. (2010a), quienes encuentran porcentajes de acumulación de PHB entre el 5.3% y 39.8%.

La figura 5 muestra el perfil del  $\text{N-NH}_4$  durante la operación del reactor, como se puede apreciar en el influente y efluente tiene una variación debido a la naturaleza de la muestra, desde 25 hasta 300 mg/L en el influente, y en el efluente de 5 hasta 200 mg/L.

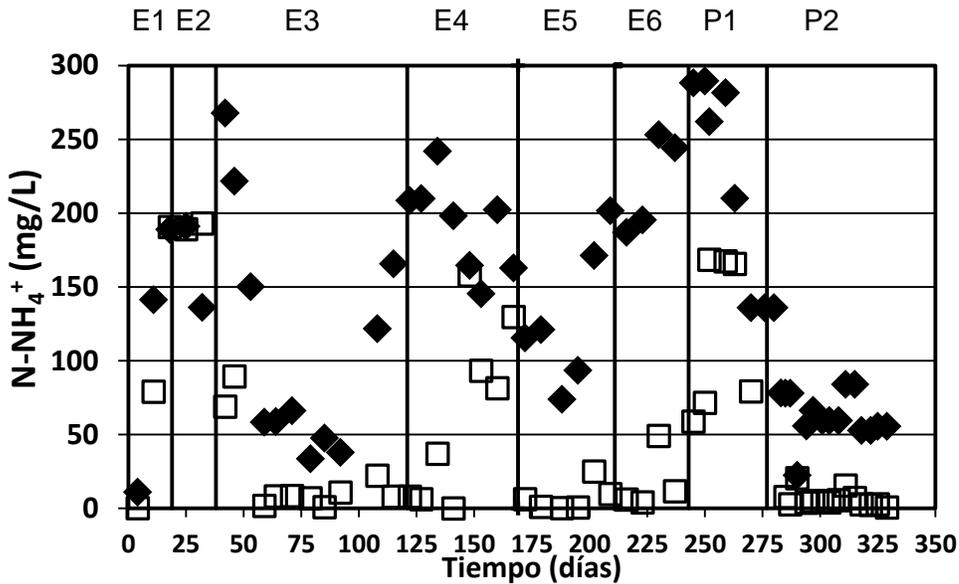


Figura 5. Perfil de consumo de Amonio (◆) Influyente, (□) Efluente.

### 6.3.3 AGVs

Los precursores inmediatos para la síntesis de PHB son los ácidos acético y butírico, principalmente (Figura 3), siendo el butírico el preferido ya que forma parte del PHB (Marang y col., 2013), mientras que el ácido acético tiene que ser transformado primero a Acetil-CoA y después a hidroxibutil-CoA para finalmente formar el PHB.

En la Figura 6 se muestra el perfil de los AGVs totales para el influente como para el efluente, como se puede observar en la tabla 11 las eficiencias de remoción de AGV presentan un comportamiento semejante al observado en la eficiencia de remoción de la DQO soluble (tabla 9), lo cual demuestra que hubo un consumo de AGV para la síntesis de PHB, así mismo se corrobora con la tabla 11, por mencionar un dato en la etapa 5 se tiene una remoción de 98.18% de AGV y una producción del 56.2% de PHB.

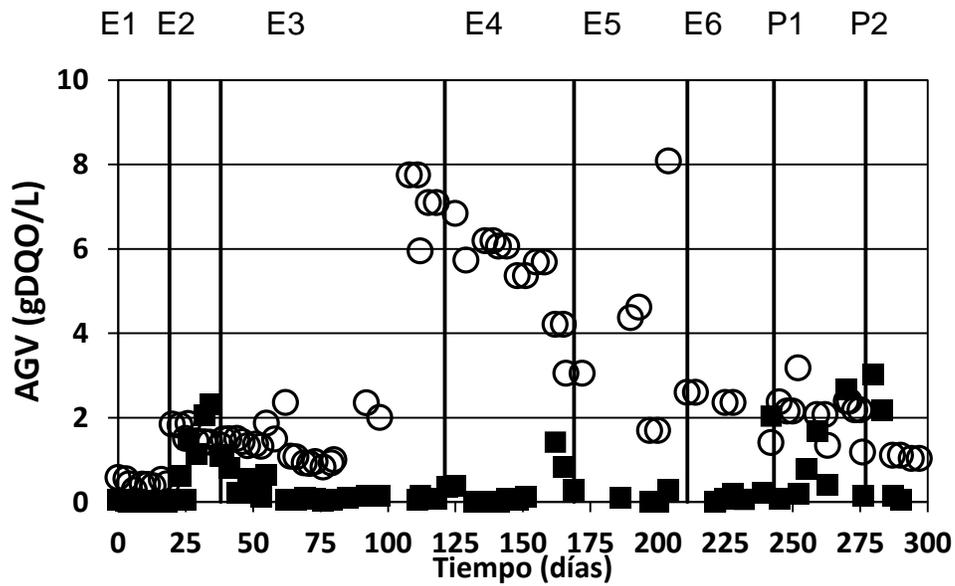


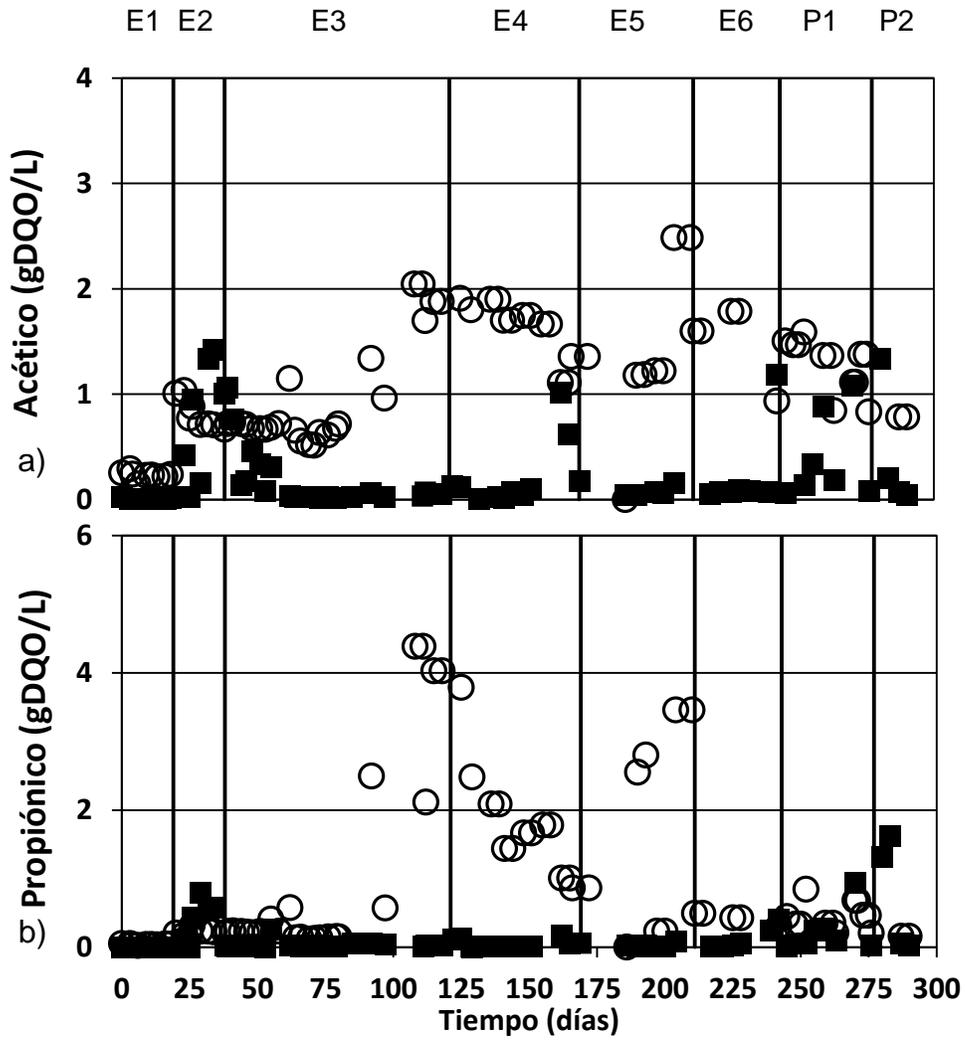
Figura 6. Perfil de  $AGV_T$  (o) Influyente, (■) Efluente

Tabla 11. Concentración promedio de  $AGV_T$  y eficiencia de remoción

Etapa	$AGV_T$ Influyente (gDQO/L)	$AGV_T$ Efluente (gDQO/L)	Eficiencia (%)
1	0.45	0.03	92.33
2	1.59	1.11	52.91
3	2.54	0.25	83.21.
4	5.44	0.30	91.90
5	3.73	0.11	98.18
6	2.18	0.44	93.82
P1	2.14	0.86	72.84
P2	1.05	1.36	89.95

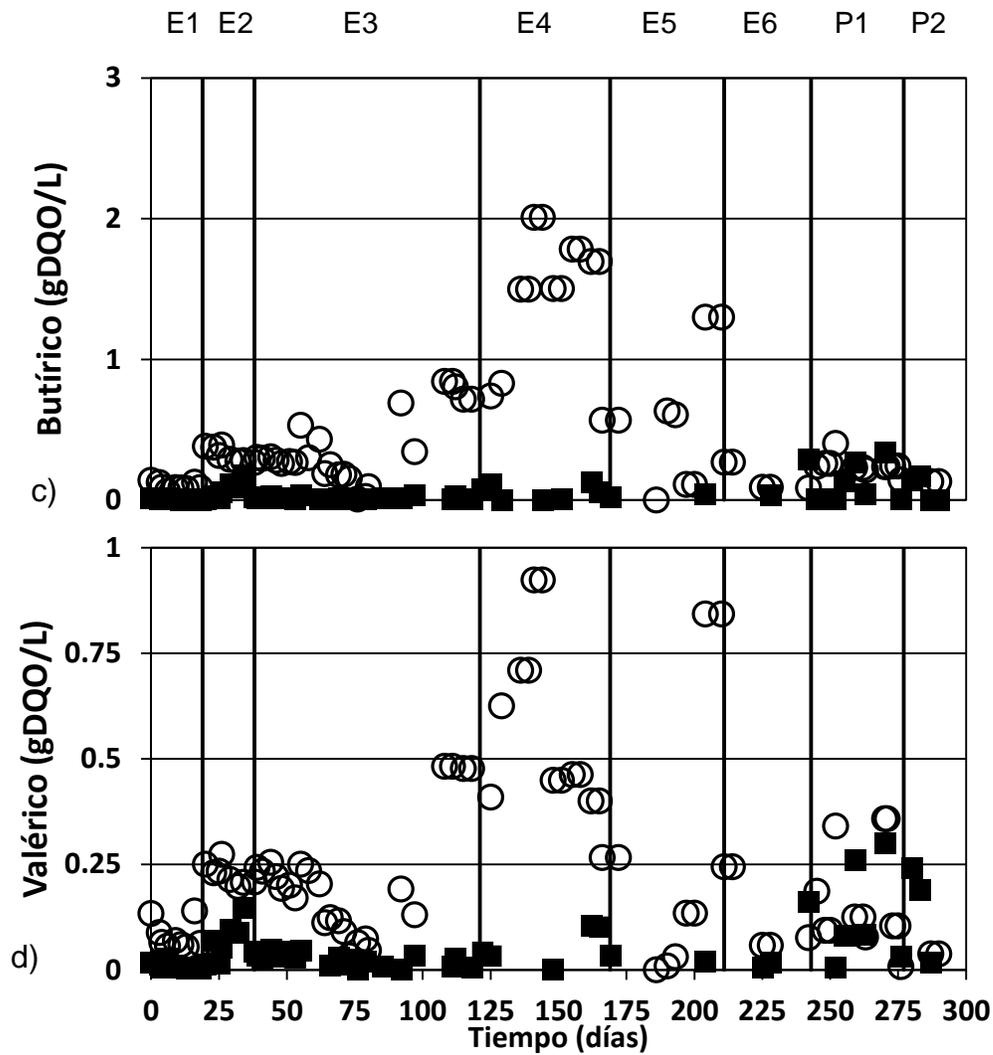
En cuanto al consumo de los ácidos individuales, se presentan los perfiles en la figura 7. Como se puede apreciar el ácido mayoritario son los ácidos acético y butírico (fig. 7a) mientras que el minoritario es el valérico (fig. 7d). La variabilidad en la composición de los AGV observada puede ser debida al tiempo de composteo, aunque se cuidaba de tomar muestras de pila con el mismo tiempo de fermentación, nunca se contó con un registro del tiempo de inicio del composteo, así como las condiciones ambientales: temperatura y precipitación, que pueden influir sobre los parámetros fisicoquímicos, y en especial en los AGV. Variaciones en la composición de los lixiviados han sido reportadas previamente por Cárdenas (2013) y Campos (2014), quienes realizaron muestreos en 2012, 2013 y 2014, en distintos meses del año. Sus resultados muestran que más del 70% de los AGV presentes en los lixiviados corresponden al ácido acético.

La figura 6 muestra que los AGV detectados fueron consumidos casi en su totalidad alcanzando eficiencias de remoción superiores al 80%, con excepción de la etapa 2 donde se registró una eficiencia del 31%. Este comportamiento se debió al incremento de la concentración de DQO en la alimentación, donde se obtuvo una eficiencia de remoción de la DQO<sub>s</sub> del 49.45% (Tabla 9).



**Figura 7.** Perfil de consumo de AGV por ácido: a) acético, b) propiónico, c) butírico, d) valérico, (O) Influyente, (■) Efluente

Continuación figura 7



**Figura 7.** Perfil de consumo de AGV por ácido: a) acético, b) propiónico, c) butírico, d) valérico, (O) Influyente, (■) Efluente

### 6.3.4 Identificación de PHB por tinción y microscopía

Se llevaron a cabo tinciones con azul Nilo II, al inóculo y a la biomasa en distintos tiempos de operación del reactor.

El inóculo presentó algunas bacterias fluorescentes (Tabla 12), lo cual confirma la presencia de microorganismos con la capacidad de sintetizar estos biopolímeros en el consorcio utilizado como inóculo. A partir del día 29 (Etapa 2) de operación fue posible la detección de un mayor número de células fluorescentes, lo que indica que el método de enriquecimiento implementado en este trabajo favoreció la proliferación de microorganismos acumuladores de PHB. Sin embargo, la tinción no permite cuantificar el contenido de PHB presente, ni distinguir entre otros PHA.

Hasta la etapa 6 de enriquecimiento, 243 días de operación, se registró respuesta positiva a la tinción en todas las muestras analizadas de la biomasa enriquecida (tabla 12). Estos resultados son semejantes a los reportados por Begtsson y col. (2008) quien enriqueció biomasa durante 250 días, utilizando un efluente de una industria papelera.

Las morfologías identificadas en este estudio fueron dominadas por bacilos y en algunos casos se detectaron bacterias filamentosas (tabla 12).

Cuando se cambió la operación del reactor a continuo, se registró pérdida significativa de biomasa, así como fluorescencia, indicando que este modo de operación no fue adecuado para favorecer la síntesis de PHB, como se observa en la Tabla 12. Con la finalidad de recuperar la biomasa y la acumulación de PHB se optó por operar el reactor en modo secuencial, con estas condiciones se consiguió recuperar la capacidad de la biomasa de acumuladora de PHB (Tabla 12).

### 6.3.5 Cuantificación de PHB por gravimetría

A partir de la etapa 3 de enriquecimiento se determinó el contenido de PHB por medio del método gravimétrico, para esta etapa se obtuvo 4.3% de PHA (p/p) el cual fue incrementando en las siguientes etapas alcanzando su máximo de 12% para la etapa 5 de enriquecimiento, lo cual indica que el proceso de enriquecimiento se llevó a cabo de manera satisfactoria. Este comportamiento está estrechamente asociado al consumo de AGV, cuya eficiencia de remoción alcanzó valores del 97% (tabla 11). Sin embargo, en la etapa 6, el contenido de PHA acumulado disminuyó al 8.77%, relacionado con una disminución en bacterias fluorescentes (tabla 12), este comportamiento pudo deberse al bajo contenido de AGV totales en el influente (tabla 11) lo cual indica que el reactor no

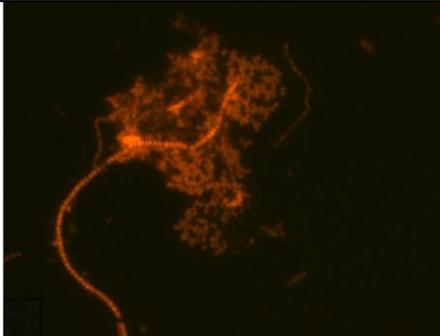
contaba con los sustratos necesarios para llevar a cabo la síntesis de PHB. Para la etapa P1, cuando se cambió el modo de operación a modo continuo, la acumulación de PHB disminuyó significativamente a 2.26 %, este comportamiento coincide con la cantidad de bacterias fluorescentes detectadas (tabla 12). La baja producción de PHB pudo ser debida nuevamente al bajo contenido de AGV en el influente, así como a la baja eficiencia de remoción de AGV, además del modo de operación en continuo produjo un lavado de biomasa, disminuyendo de 5.12 a 4.82 gSV/L, de tal manera que el contenido de biomasa en el reactor no fue suficiente para consumir los AGV en este modo de operación (tabla 11). Para la etapa P2 se cambió el modo de operación a SBR (tabla 7), esto con el fin de recuperar la capacidad para sintetizar PHB de la biomasa, bajo estas condiciones de operación se obtuvo una acumulación de PHB del 4.3%, siendo este resultado similar al obtenido durante la etapa 3 de enriquecimiento, confirmándose con las observaciones al microscopio que mostraron un incremento significativo en la cantidad de bacterias fluorescentes.

Estos resultados son similares a los reportados por Yan y col. (2008) quienes aislaron cepas productoras de PHB de lodos activados usando acetato como fuente de carbono. Sin embargo, Bengtsson y col. (2008) encontraron producciones de PHB del 48.2% en lodos enriquecidos con AGV.

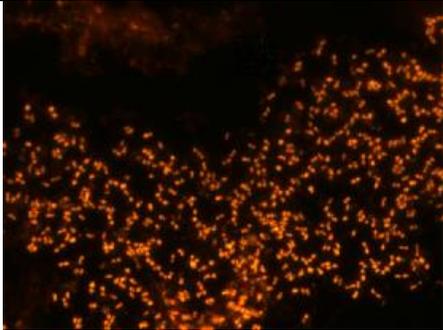
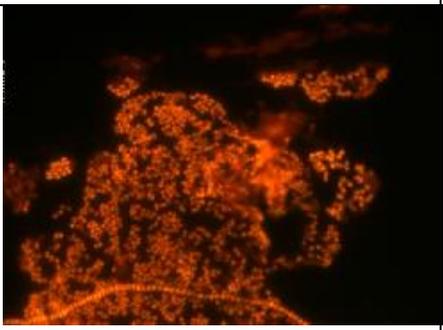
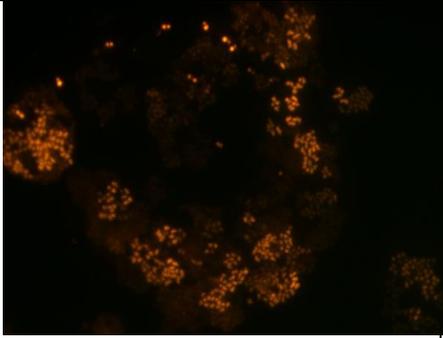
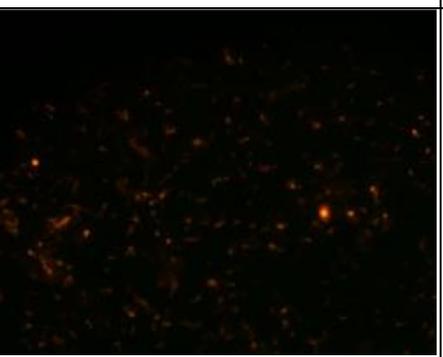
### **6.3.6 Cuantificación de PHB por espectrometría**

Para confirmar la composición de PHB en la biomasa enriquecida se realizó el análisis por espectrometría, donde el PHB es transformado en ácido crotónico por medio de una hidrólisis ácida, el cual absorbe a 235 nm.

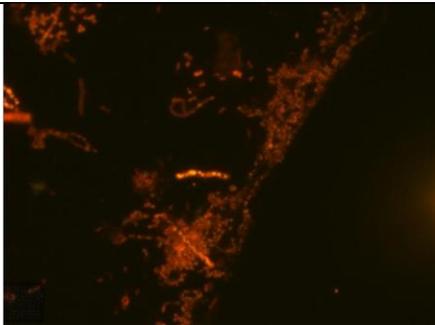
Tabla 12: Identificación y cuantificación de PHB.

ETAPA	MICROSCOPIA	GRAVIMETRIA (%)	PHB (%)
1		-----	-----
2		-----	-----
3		4.3	-----

Continuación figura 12

4		6.23	22.2
5		12.0	56.2
6		8.77	19.0
P1		2.26	10.0

Continuación figura 12

P2		4.33	17.78
----	---	------	-------

Esta técnica se implementó a partir de la etapa 4, donde se obtuvo una concentración de 31.06 mgPHB/L, representando un rendimiento del 0.005 gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>, este resultado es semejante al reportado por Khardenavis y col. (2005), tratando aguas residuales anaerobias en un reactor Batch. En la etapa 5 se alcanzó una producción de 78.87 mgPHB/L con un rendimiento del 0.017 gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>, estos resultados son semejantes a los reportados por Khardenavis y col. (2005) quienes operaron reactores Batch, con aguas residuales anaerobias y agua residual sintética, respectivamente.

Sin embargo, en la etapa 6 se observó una disminución tanto en la cantidad de bacterias positivas a la tinción así como en la concentración de PHB, 27.7 mgPHB/L, registrándose un rendimiento de 0.0042 gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>, estos resultados son semejantes a los obtenidos en la etapa 3. Este comportamiento se mantuvo en la siguiente etapa (P1) donde se obtuvo una disminución tanto en la producción de PHB como en el rendimiento, 14.75 mgPHB/L y 0.002 gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>, respectivamente. Este comportamiento pudo ser debido al modo de operación en continuo, y al incremento brusco de la DQO en el influente (tabla 5), así como al bajo contenido de AGV en esa etapa (tabla 11). Empezando a recuperarse en la etapa P2, donde la concentración y rendimiento fueron de 25.27 mgPHB/L y 0.0056 gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>, respectivamente.

Como se puede apreciar en la Tabla 12, existe una discrepancia entre el porcentaje obtenido con el método gravimétrico con respecto al espectrométrico, esto puede ser debido a la pérdida de PHB en alguno de los pasos de la técnica gravimétrica.

La tabla 13 muestra una comparación de los resultados obtenidos en este estudio con lo reportado en la bibliografía, donde la fuente de carbono fue ácido acético o AGV; como se puede apreciar en las bibliografías se reportan relación C/N que van desde 9 - 90.8, observándose una estrecha relación entre la C/N y el porcentaje de PHB producido. El mayor porcentaje de PHB fue reportado por Johnson y col. (2010b) con un 77% a una relación C/N de 90, con una C/N altamente limitada en nitrógeno, así mismo la concentración de la alimentación influye significativamente sobre la producción de PHB.

La C/N en este estudio es semejante a la reportada por Khardenavis y col. (2005), con un valor de 48.5, bajo estas condiciones el porcentaje de PHB fue de 56.2, sin embargo cuando se analiza en función de la concentración se observa que aunque la concentración de la alimentación fue inferior a la reportada por Bengtsson y col. (2008) la producción de PHB fue superior a lo reportado por este autor, esto puede ser debido a la proporción de AGV, para este estudio el 45% de los AGV corresponde a ácido acético, mientras que Bengtsson reporta un 35%.

El rendimiento obtenido en este trabajo fue superior al reportado por Khardenavis y col. (2005) quien utiliza ácido acético como única fuente de carbono, por otro lado Johnson y col. (2010a y b) al igual que Bengtsson y col. (2008) reportan rendimientos en unidades molares, por lo cual no es posible comparar el rendimiento de este estudio con el de los autores previamente mencionado esto es debido a que, en nuestro caso, no se puede calcular un rendimiento molar debido a la complejidad de la fuente de sustrato (lixiviado).

Tabla 13. Comparación de los resultados obtenidos en este estudio con lo reportado en la bibliografía, utilizando lodos activados como inóculo.

Sustrato	g DQO/L	C/N	$Y_{PHB}$	% PHB	Referencia
AGV	8.7	9.0	0.19*	48.2	Bengtsson y col. (2008)
Acético	9.9	11.3	0.21*	39.0	Johnson y col. (2010a)
Acético	20.0	50.0	0.0047	65.0	Khardenavis y col. (2005)
Acético	90.0	90.8	---	77.0	Johnson y col. (2010b)
AGV	5.1	48.5	0.017	56.2	Este estudio

\* relación molar,  $Y_{PHB}$  (gPHB/gDQO<sub>consumida</sub>)

### 6.3.7 Perfil cinético de un ciclo de operación

Para conocer el comportamiento del reactor durante un ciclo, se llevó a cabo una cinética en el reactor durante 7 horas, analizado los siguientes parámetros: DQOs,  $NH_4^+$ , Sólidos volátiles y oxígeno disuelto. El perfil cinético se muestra en la Figura 8.

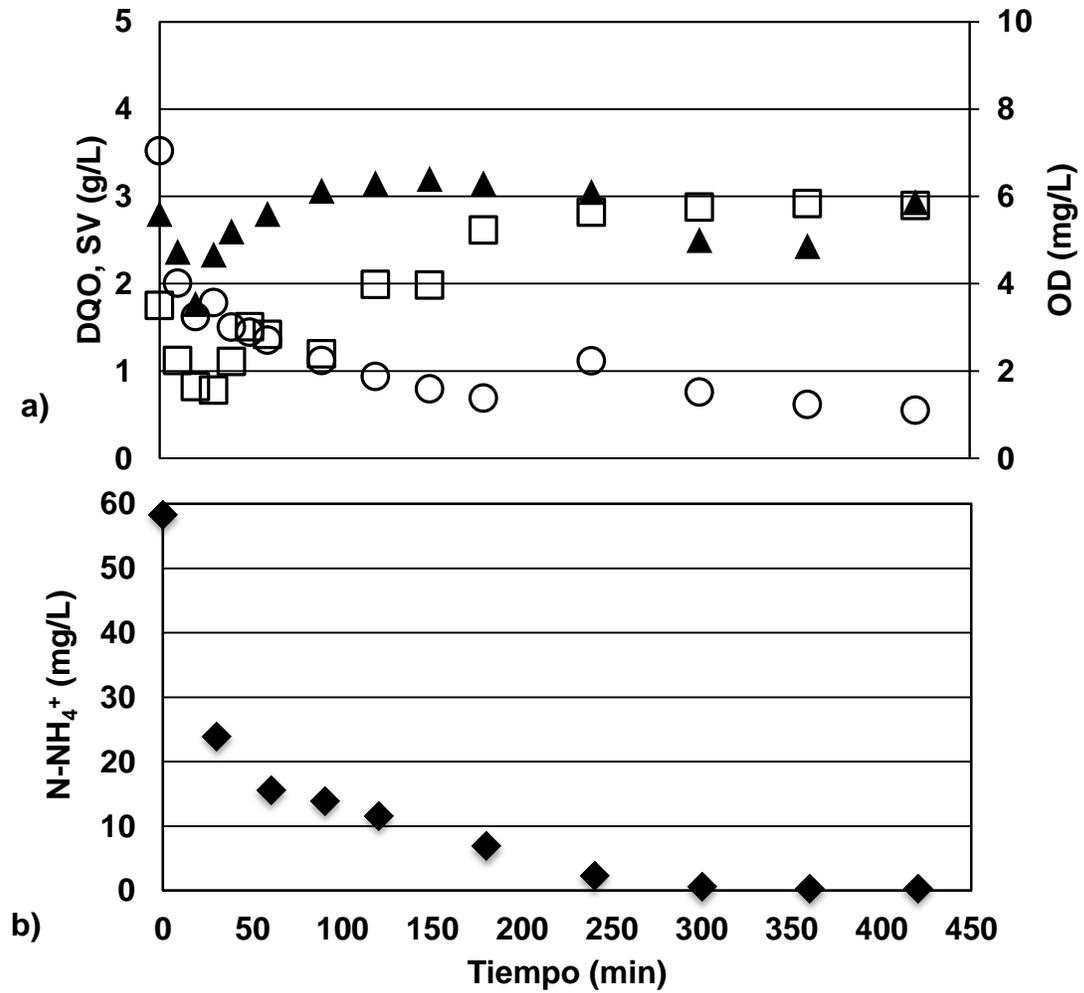
La cinética inició con 3.52 gDQO<sub>s</sub>/L, 58.35 mgN- $NH_4^+$ /L, 3.5 mgOD/L y 2.8 gSV/L. Durante la cinética se puede observar que en los primeros 20 minutos de operación, la DQO se consumió a una velocidad de 0.095 gDQO/min, y una actividad específica de 46.6 gDQO/gSV d, después de ese tiempo se continúa con el consumo de materia orgánica a una menor velocidad y actividad específica, 0.0067 gDQO/min y 3.29 gDQO/gSV d, respectivamente. La eficiencia de remoción obtenida al final de la cinética fue del 84.37%, este resultado es semejante al obtenido durante la operación en continuo (Tabla 9).

Por otro lado el consumo de amonio se dio a una velocidad de 71 mg/min con una actividad específica de 0.35 mg  $NH_4$ /g SV d, consumiéndose completamente a los 300 minutos.

En cuanto al OD se observa un rápido consumo en los primeros 30 minutos de operación registrándose una concentración de 1.56 mgOD/L, lo cual corresponde con el rápido consumo de DQO, esto puede estar asociado al consumo de material fácilmente

biodegradable (AGV). Después de este tiempo la concentración de OD se incrementa ligeramente hasta 3.0 mg OD/L, registrándose un nuevo decremento, que de igual manera está estrechamente relacionado con el consumo de DQO, obteniéndose a los 150 minutos una concentración de 0.79 gDQO/L. Al mismo tiempo que se inicia el incremento en la concentración de OD hasta alcanzar una concentración cercana a la saturación, 5.83 mg OD/L. Este comportamiento en la concentración de OD justifica la suspensión en el consumo de DQO, el cual permanece en 0.550 g DQO/L al final del ciclo de operación. Por otro lado, el perfil de la biomasa muestra una disminución significativa en los primeros 20 minutos, de 2.8 gSV/L a 1.76 gSV/L, recuperándose después de este tiempo alcanzando una concentración promedio de 2.93 g SV/L.

Estos resultados nos permite observar que en 150 minutos la  $DQO_s$  alcanza su máximo consumo, quedando un residual de 0.65 gDQO<sub>s</sub>/L, lo cual nos indica que el periodo de hambruna es muy largo, tiempo en el cual se consume el material de reserva PHB, para solucionar esto se podría acortar el ciclo, o bien administrar inmediatamente a los 150 minutos un pulso de sustrato para que inicie de nuevo la etapa de saciedad, este procedimiento de adicionar sustrato a lo largo de un ciclo lo realiza Jhonson, 2010b, con lo cual garantiza una producción óptima y constante de PHB.



**Figura 8.** Perfil cinético de un ciclo de 7 horas de operación del reactor en la etapa de producción. a) (▲) SV, (□) OD y (O) DQOs, b) (◆) N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

## 7. CONCLUSIONES

- Se demostró que el lixiviado de basura orgánica sirvió como fuente de carbono para la producción de PHB utilizando lodos activados como inóculo.
- Fue posible enriquecer biomasa productora de PHB, utilizando lixiviados de basura orgánica con alto un contenido de AGV.
- La tinción con azul Nilo permitió detectar biomasa acumuladora de PHA.
- Se confirmó por medio de espectrometría la presencia de PHB en la biomasa enriquecida.
- El método de operación secuencial fue el más adecuado para la producción de PHB con un porcentaje del 56.2 %.

## RECOMENDACIONES

- La C/N del lixiviado es 48.5 lo cual hace pensar que se debe reducir el amonio contenido, de acuerdo a las referencias.
- Hacen falta estudios posteriores para esclarecer el efecto de la concentración del influente y la C/N sobre la producción de PHB.
- Buscar las condiciones óptimas de una fermentación acidogénica que favorezca la formación de ácido valérico, para la producción de PHV.

## 8. REFERENCIAS

- Albuquerque M.G.E., V. Martino., E. Pollet., L. Avérous., M.A.M. Reis. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151: 66-76.
- Almeida A., Ruíz J., López N. y Pettinari M. (2004). Bioplásticos una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*, 3:122-133.
- Alvarez H., Kalscheuer R., Steinbüchel A. (2000), Triacilglicéridos en bacterias *Rhodococcus*. *Revista FABICIB*, 4: 207-216
- Andler R y Díaz A. (2013), Ingeniería para producir plásticos desde bacterias, *Ingenerare*, 27:29-36.
- Anshuman A., Kumar M., Mudliar S. y Chakrabarti T. (2007). Biotechnological conversion of agro-industrial wastewater into biodegradable plastic, poly  $\beta$ -hydroxybutirate. *Bioresource Technology*, 98: 3579-3584.
- APHA. (1995). Standard methods: For the examination of water and wastewater 19th edition. Ed. American Public Health Association. Washington, DC. USA.
- Arcos H. (2007). Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxicanoatos mediante un bioreactor discontinuo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 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: 492-489.
- Bengtsson S., Werker A. y Welander T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. *Water Science and Technology*. 58: 323-330.
- Brock T., Smith D.W., Madigan M. T. (1987). *Microbiología*. Prentice Hall, 4ª ed.
- Campos V. (2015). Efecto del pH sobre la especiación de ácidos grasos volátiles (AGV's) durante el tratamiento de lixiviados de basura orgánica en un reactor SBR acidogénico. Tesis servicio social, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

- Cárdenas K. (2013). Tratamiento biológico de escurrimientos de basura orgánica en reactores anaerobios. Tesis de especialidad, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Cardoba E., Mora M., Marín M. (2013) Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos Lácteos y Caña de Azúcar. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín 66 (2): 7129-7140.
- Cerrone F. (2011). Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, España.
- Chakravarty P., Mhaisalkar V. y Chakrabarti T. (2010). Study on polyhydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode. Wastewater treatment system. Bioresource Technology, 101: 2896-2899.
- Demirel B., Yenigun O. 2004. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 79: 755-760.
- Gan J., Montañó G., Fajardo C., Meraz M. y Castilla P. (2013). Anaerobic co-treatment of leachates produced in a biodegradable urban solid waste composting plant in México city. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 12, No. 3: 541-551.
- Gómez-Cardozo J.R. (2013). Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. Tesis Maestría en Ciencias-Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- González Y., Meza J., González O., Córdova J. (2013). Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. Revista Internacional de Contaminación. Ambiental, 29 (1):77-115.
- Jiang Y., Marang L., Tamis J., van Loosdrecht M., Dijkman H., Kleerebezem R. (2012). Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. Water Research 46: 5517-5530.
- Johnson K., Kleerebezem R., Loosdrecht M. (2010a). Influence of C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing Batch reactors at short SRTs. Water Research 44: 2141-2152.

- Johnson K., Kleerebezem R., Loosdrecht M. (2010b). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of biotechnology* 147: 73-79.
- Khardenavis A., Guha P., Kumar M., Mudliar S., Chakrabarti T. (2005). Activated Sludge is a Potential Source for Production of Biodegradable Plastics from Wastewater. *Environmental Technology*, 26: 545-552.
- Koller M., Bona R., Chiellini E., Fernandes E.G., Horvat P., Kutschera C., Hesse P. y Braunegg G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*. 99: 4854-63.
- Kumar M., Mudliar S.N., Reddy K.M.K. y Chakrabarti T. (2004). Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. *Bioresource Technology*, 95: 327-330.
- Lemos P., Serafim L. y Reis M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates, from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122: 226-238.
- Lucier W. (1992) Materials derived from biomass biodegradable materials *Proceedings National Academy of Sciences. USA* 89: 839-842.
- Marang L., Jiang Y., Loosdrecht M., Kleerebezem R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 142: 232-239.
- Martínez V. (2012). Catabolismo de los Polihidroxicanoatos en la Bacteria Depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus*: Aplicaciones Biotecnológicas y Diseño de Nuevos Sistemas Para la Extracción de Bioplásticos en Cultivos Bacterianos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Moralejo H., Kleerebezem R., Mosquera A., Campos J., Palmeiro T., Loosdrecht M. (2014). Substrate versatility of polyhydroxyalkanoate producing glycerol grown bacterial enrichment culture. *Water Research*, 66: 190-198.
- Ortiz G. (2009). Obtención, Aislamiento e identificación de Cepas Bacterianas Presuntas Productoras de Poli- $\beta$ -hidroxicanoatos (PHAs). Tesis, trabajo de experiencia recepcional, Universidad Veracruzana Facultad de Biología, México.
- Phasakanon J., Chookietwattana., Dararat S. (2014). Polyhydroxyalkanoate Production from Sequencing Batch Reactor System Treating Domestic Water Mixed with Glycerol Waste. *APCBEE Procedia* 8: 161-166.

- Peña C., Campos N., Galindo E. (1997) Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azetobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied microbiology biotechnology* 48: 510-515.
- Qin L., Liu Y. (2006). Aerobic granulation for organic carbón nitrogen removal in alternating aerobic-anaerobic sequencing Batch reactor. *Chemosphere* 63: 926-933.
- Sánchez M., Marín M., Mora M., Yepes P. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. XIV No. 2: 89-100.
- Sangkharak K. y Prasertsan P. (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology*. 132: 331-340.
- Secretaria de Gobernación, PROY-NMX-E-260-CNCP-2013 Industria del plástico - Materiales bioplásticos - Terminología. México: Diario Oficial de la Federación, 7 de mayo, 2013, p. 5.
- "Standard methods: For the examination of water and wastewater". 19<sup>th</sup> edition, American Public Health Association. Washington, DC. USA. (1995)
- Torres. G y Tresierra A. (2012). Producción de Poli- $\beta$ -Hidroxibutirato por *Pseudomonas* a partir de residuos de la industria petroquímica. *Ciencia Amazónica*, vol. 2 No. 2: 70-75.
- Tsuge T. (2002). Metabolic Improvements and use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 94 No. 6: 579-584.
- Venkateswar M. y Venkata S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresource Technology* 114: 573-582.
- Yan S., Subramanian B., Tyagi R., y Surampalli. (2008). Polymer production by bacterial strains isolated from activated sludge treating municipal wastewater. *Water Science & Technology* 57: 533-539.
- Yang J., Leonie M., Jelmer T., Mark C., Henk D., Robbert K. (2012). Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Research* 46: 5517-5530.

- Yu Q., Fang P. (2002). Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Science and Technology*.45 (10): 201-206.
- [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_31.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf) (15 de marzo del 2015).
- <http://www.anipac.com/bioplasticos.pdf> (13 de marzo del 2015)
- <http://www.ctar.com/webfiles/fckeditor/Resumen%20tesis%20Carlos%20Romero.pdf> (17 de marzo del 2015)

## 10. ANEXOS

Tabla 14. Ecuaciones de la recta y coeficientes de variación para las técnicas analíticas

Parámetro	Ecuación	Coefficiente de variación
DQO	$y=0.4332x+0.0007$	0.9989
Amonio	$y=0.0009x-0.0061$	0.9994
Acético	$y=41985x-1648.3$	0.9997
Propiónico	$145433x+110.86$	0.9998
Butírico	$y=61517x-83.429$	0.9997
Valérico	$y=147223+12.238$	0.9998
Crotónico	$y=0.2093x+0.0166$	0.9982

### DQO

Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de glucosa (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 g/L), de cada una se colocaron 2 mL de muestra en tubos Hach, se les añadió 1 mL de solución digestora y 2 mL de solución catalizadora, se homogenizaron lentamente y se colocaron en un digestor a una temperatura de 150 °C por 2 horas. Posteriormente se registró la absorbancia a 620 nm. Finalmente se graficaron las concentraciones obteniendo los parámetros de la curva de calibración. Las absorbancias obtenidas fueron graficadas contra su correspondiente concentración, con ello y empleando el Método de mínimos cuadrados se realizó una regresión lineal obteniendo la pendiente (m), ordenada al origen (b) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Para las muestras se colocaron 2 mL en tubos Hach y realizó el mismo procedimiento haciendo diluciones según el caso lo requiriera.

### Reactivos

SOLUCION DIGESTORA: Secar a 103 °C durante dos horas 50 g de dicromato de potasio ( $K_2CR_2O_7$ ), una vez fríos pesar 42.256 g. Aparte pesar 33.3 g de sulfato de mercurio ( $HgSO_4$ ). Disolver el dicromato de potasio en 500 mL de agua destilada, posteriormente agregar y disolver el sulfato de mercurio. En el baño de hielo adicionar lentamente 167 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), agitar hasta que se disuelvan todos los reactivos y aforar a 1000 mL.

SOLUCION CATALIZADORA: Pesar suficiente sulfato de plata ( $\text{AgSO}_4$ ) para una proporción de 5.5 g de  $\text{AgSO}_4$ /Kg de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Agregar el sulfato de plata a 300 mL de ácido sulfúrico, dejar en reposo durante tres días para tener una completa disolución y aforar a 1000 mL. Calcular la cantidad exacta de sulfato de plata, considerando el peso específico y la pureza del ácido sulfúrico.

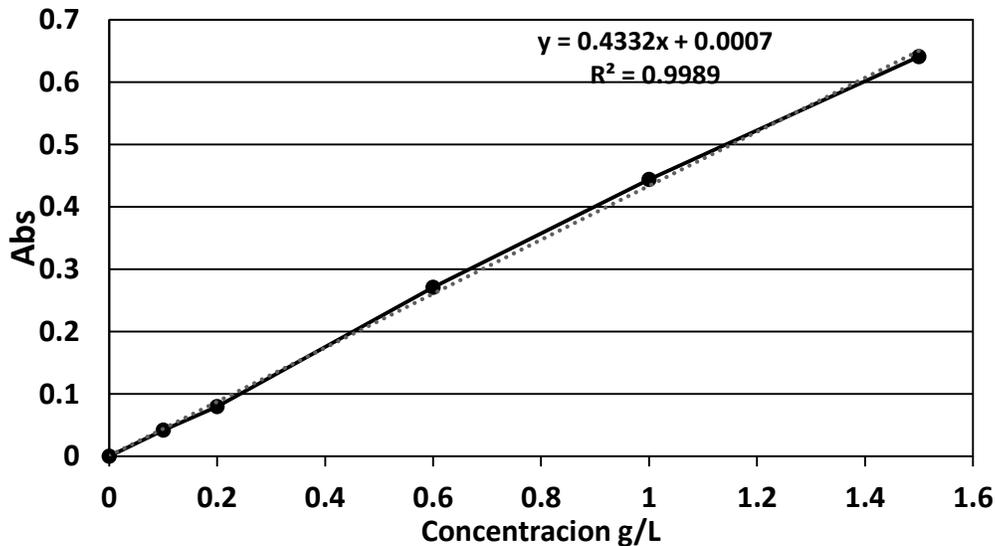
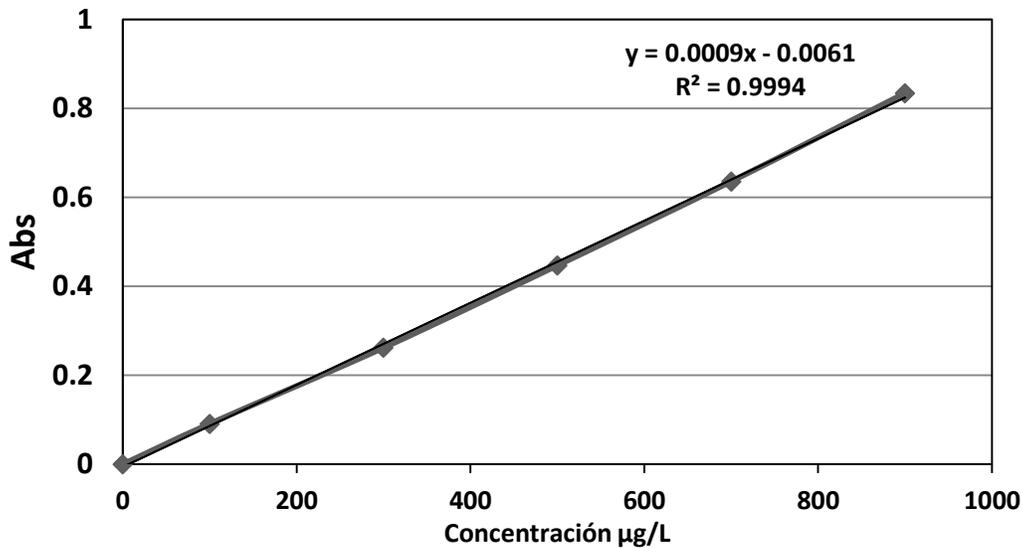


Figura 9. Curva de calibración de DQO a 620 nm

### Amonio

Para la determinación de amonio se realizó una curva de calibración en la cual se procedió a llenar tubos de hach con 5 mL de solución de una concentración conocida (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 1.0  $\mu\text{gNH}_4^+/\text{L}$ ) con su respectivo blanco, a este se le agregaban 200  $\mu\text{L}$  de Fenol, 200  $\mu\text{L}$  de Nitroprusiato, posteriormente se le adicionaban 500  $\mu\text{L}$  de solución oxidante fresca, se tapaban y se mantenían en la oscuridad por 2 horas, transcurrido este tiempo se leen graficadas para espectrofotómetro a 640 nm. Estas absorbancias fueron graficadas para obtener los parámetros de la curva. Las muestras se procesaron igual que la curva.



**Figura 10.** Curvas de calibración para  $\text{NH}_4^+$  medida a 640 nm

### Sólidos Suspendidos Totales

Para la determinación de los SST se utilizaron filtros de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro, fueron colocados en un horno (Furnace 1400) a 550 °C durante media hora, transcurrido ese tiempo se pesaron hasta obtener un peso constante. Posteriormente, se filtra una alícuota de muestra problema se colocaron en una estufa a 100 °C durante media hora, se enfriaron y pesaron nuevamente. Seguido de esto se colocó en el horno nuevamente esta vez con todo y muestra a 550 °C durante media hora, transcurrido ese tiempo se enfriaron en un horno a 100 °C y posteriormente en un desecador, se pesaron para obtener un peso 550 °C.

Así mismo para los sólidos totales se utilizaron capsulas de porcelana, las cuales fueron colocados en un horno (Furnace 1400) a 550 °C durante media hora, transcurrido ese tiempo se pesaron hasta obtener un peso constante. Posteriormente, se coloca una alícuota de muestra problema y se colocaron en una estufa a 100 °C durante media hora, se enfriaron y pesaron nuevamente. Seguido de esto se colocó el crisol en una mufla a 550 °C durante media hora, transcurrido ese tiempo se enfriaron en un horno a 100 °C y posteriormente en un desecador, y se pesaron.

Para calcular la concentración de SST, SSF y SSV se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$SST = \frac{\text{Peso de la muestra } 100^{\circ} \text{ C (g)} - \text{Peso sin muestra a } 550^{\circ} \text{ C (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}}$$

$$SSF = \frac{\text{Peso con la muestra a } 550^{\circ} \text{ C (g)} - \text{Peso sin muestra a } 550^{\circ} \text{ C (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}}$$

$$SSV = SST - SSF$$

### **Ácidos Grasos Volátiles (AGV'S)**

La determinación de AGV's, se realizó para el influente y efluente del reactor, se cuantificaron ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico.

Para el análisis de los AGV's se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, con una columna AT-1000 de 10 m de longitud y 0.53 mm de diámetro, con detector de ionización de flama (FID). Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Temperatura del detector: 200 °C

Temperatura del inyector: 200 °C

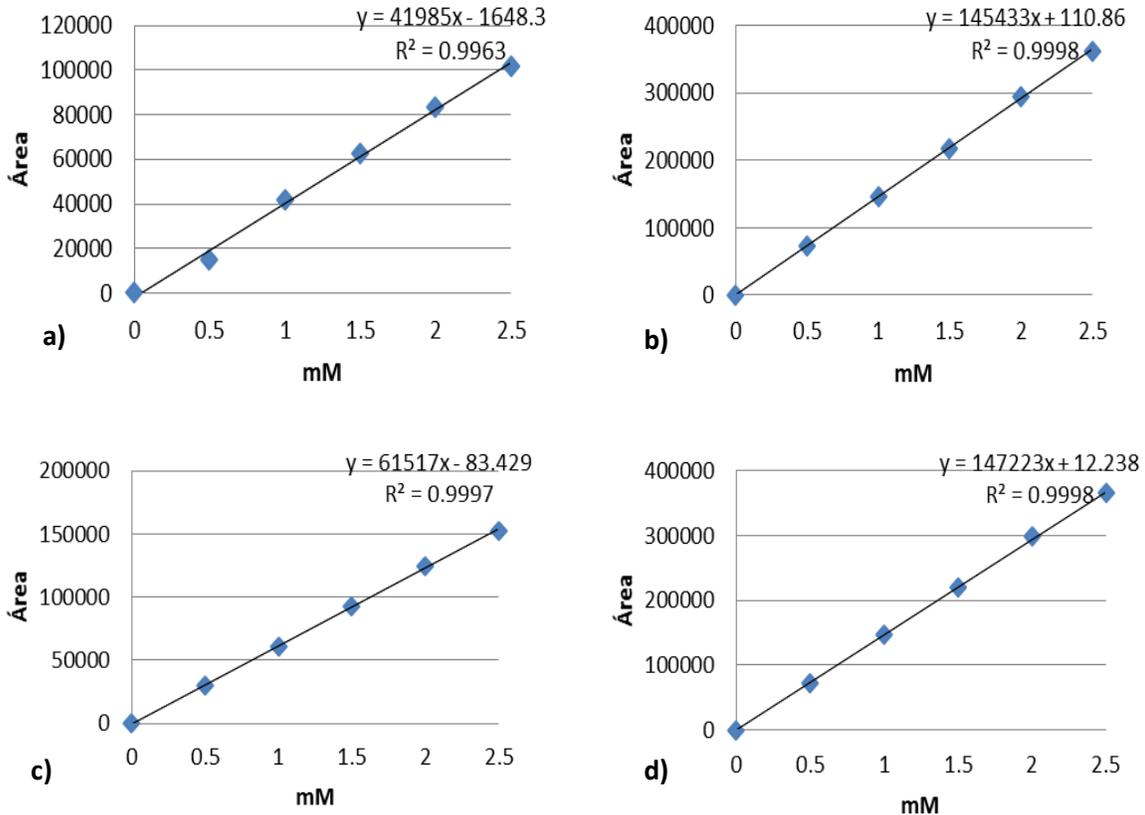
Temperatura de horno: 80 – 200 °C, (10°C/min)

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

Tiempo del análisis: 7 minutos

Volumen de inyección: 0.5 µL

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron concentraciones de AGV'S de: 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2 mM y 2.5 mM.



**Figura 11.** Curvas de calibración para AGVs, a) Acético, b) Propiónico, c) Butírico y d) Valérico.

### Identificación de PHA por microscopia

La identificación de PHA se realizó en la biomasa del reactor con azul Nilo II, el cual se preparó al 1% en agua destilada y se filtró usando un filtro de  $0.2\mu\text{m}$ , se utilizó una dilución de 1:25 en un tubo de ensaye de 10 mL, posteriormente las células se fijaron con calor en portaobjetos durante 15 minutos a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , una vez que las células se fijaron, se procedió a teñir con azul nilo, una vez teñidas las células se lavó el exceso con ácido acético al 8% para finalmente ser observadas bajo luz fluorescente ( $\lambda = 362\text{--}460\text{ nm}$ ), emiten una fuerte coloración anaranjada en los gránulos de polímero en la célula cuando la prueba es positiva, las muestras se tomaron del reactor una hora después de ser alimentado el mismo.

### **Cuantificación de PHB por gravimetría**

Para determinar el contenido de PHB en peso seco, se secó biomasa a 105°C, posteriormente se adicionaba cloroformo (99% v/v) e hipoclorito de sodio (5% p/v) a la biomasa seca (1 ml de cada reactivo por cada 20 mg de biomasa seca, subsecuentemente las muestras se incuban a 200 rpm durante 1 hora 10 minutos a 30°C, posteriormente las muestras se centrifugan 15 minutos a 6000rpm, esto último tendrá como resultado la separación de 2 fases, donde la fase orgánica (cloroformo) estará abajo mientras que la fase inorgánica (hipoclorito) estará arriba, desechar la fase inorgánica, y transferir la fase orgánica donde estará el PHB a recipientes previamente pesados donde se le adicionaran gotas de metanol (95% v/v) hasta observar precipitación, después dejar en reposo a 4°C durante 12-24 horas, pasado este tiempo agregar gotas de metanol y evaporar a 60°C teniendo cuidado de no quemar el polímero, realizar lavados con metanol y evaporar el mismo. Finalmente pesar el recipiente con PHB (color blanquecino) y realizar una diferencia de pesos para obtener el peso seco de PHB.

### **Cuantificación de PHB por espectrofotetría UV**

Para esta determinación se usaron muestras tratadas para la cuantificación gravimétrica de PHB las cuales al final de dicho tratamiento son de un color blanquecino, se pesa 1 mg de PHB, para posteriormente ser transferido a tubos Hach donde 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado es adicionado, los tubos se tapan y se calientan en agua hirviendo (90°C) en baño maría por 10 minutos, este tratamiento es para hidrolizar el PHB a ácido crotónico. Finalmente las muestras se dejan enfriar y la absorbancia fue medida a 235 nm en un espectrofotómetro usando ácido sulfúrico como blanco. La concentración de PHB fue calculada extrapolando los valores de absorbancia usando una curva estándar preparada con ácido crotónico (ALDRICH), la preparación de dicha curva se llevó a cabo de la siguiente manera: Se procedió a llenar tubos de hach con 5 mL de solución de una concentración conocida (1, 2, 3, 4 mg/L) de ácido crotónico con su respectivo blanco el cual fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, el espectro de ácido crotónico se puede observar en la figura 12 de igual forma la curva así como su ecuación de la recta se puede observar en la figura 13.

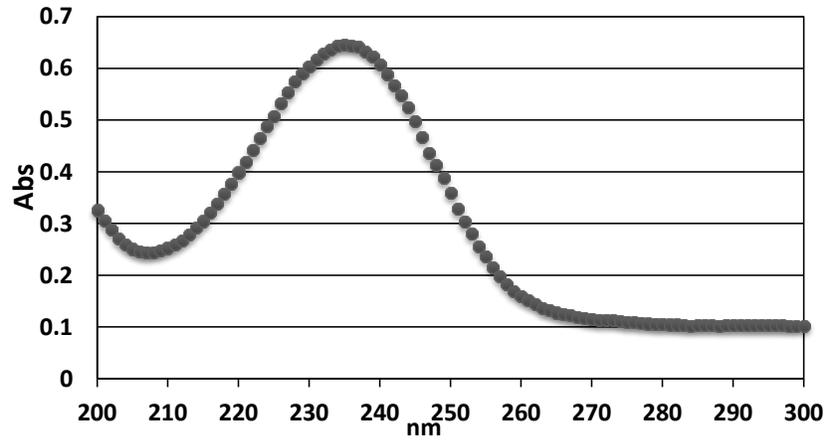


Figura 12. Espectro de absorción de ácido crotonico

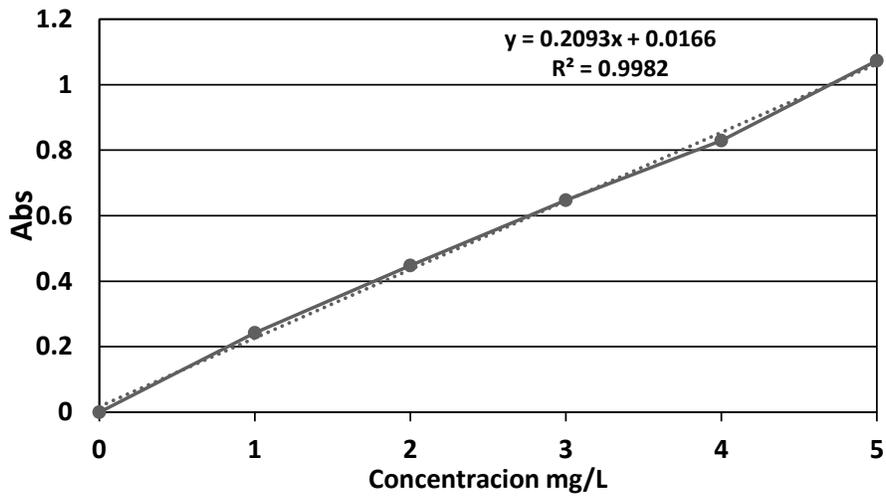


Figura 13. Curva de calibración ácido crotonico a 235 nm