



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

## PROGRAMA DE MAestrÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

*Facultad de Ingeniería Civil*  
*Facultad de Ingeniería Química*  
*Facultad de Biología*

**“Producción de bioplásticos en un biorreactor de membranas  
sumergidas a partir de diferentes relaciones C/N”**

TESIS

Para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Presenta:

*Larissa Cisneros Carbajal*  
*Ingeniero Civil*

Director de tesis:

*Dr. Rafael Huirache Acuña*

Co-Director de tesis:

*Dr. Julio César Orantes Ávalos*

Morelia, Michoacán, febrero del 2020



## ***Agradecimientos***

Primeramente, expreso mi sincera gratitud a mis asesores de tesis: al Dr. Rafael Huirache Acuña por su disposición y consideración no sólo por el trabajo sino por las personas y al Dr. Julio C. Orantes Ávalos por ser mi mentor durante este proceso y por su apoyo incondicional hacia mi persona y trabajo.

Gracias a mis examinadores: Dr. José Apolinar Cortes, Mtra. Abril Munro Rojas y Mtro. Isaías Jiménez por su colaboración y por su retroalimentación.

Al Dr. Dennis Rodrigue por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y realizar mi estancia de investigación en la Universidad Laval.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo al Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental.

Al laboratorio de Calidad del Agua del departamento del Posgrado de Química y a sus miembros por su entera disponibilidad hacia mi trabajo, sin su valioso apoyo no hubiera sido posible concluir esta investigación.

A mis queridos amigos Fernando y Francisco por estar siempre presentes en cada etapa de este proceso y por su apoyo incondicional.

Finalmente, a mi familia por siempre creer en mí.

## ***Resumen***

Dentro de la búsqueda por un desarrollo sustentable, la producción de nuevos biomateriales ha ido en constante aumento durante las últimas décadas, en este sentido sobresalen los polihidroxialcanoatos (PHA) una familia de poliésteres producidos intracelularmente por distintos microorganismos bajo condiciones limitadas de nutrientes. Los PHA son un material con gran potencial biotecnológico que representa una alternativa prometedora para la sustitución de los plásticos de origen petroquímico. Siguiendo esta línea, dentro de la gestión de aguas residuales la producción de PHA a través de cultivos microbianos mixtos (CMM) es una oportunidad para la recuperación de carbono orgánico mediante el tratamiento biológico.

En el presente estudio se estudia el impacto de la relación de nutrientes durante la producción de PHA en un sistema continuo de tratamiento de aguas residuales utilizando un biorreactor de membranas sumergida (BRM) operado bajo una relación de nutrientes C:N de 20 y 25 obteniendo un rendimiento de acumulación de 16.6% p.s.c (peso seco celular) y 12.67% respectivamente. Por medio de la caracterización térmica se observó que las variaciones de la relación de nutrientes no afectan las propiedades térmicas ni químicas del material, por lo que se sugiere que se puede lograr una producción uniforme de PHA mediante CMM.

**Palabras claves:** *Polihidroxialcanoatos, PHAs, relación C/N, biorreactor con membranas sumergidas, agua residual.*

## ***Abstract***

Within the need to find new materials to secure a sustainable world development renewable materials have been developed in the last decade. Among them we must highlight polyhydroxyalkanoates (PHAs) a group of biodegradable polyesters synthesized by numerous bacteria as carbon and energy storage compounds under stress conditions caused by the limitation of an essential nutrient, therefore PHA represent an attractive alternative to petrochemically derived plastics. In this regard mixed microbial cultures in wastewaters management for PHA production has brought attention as a way to recover wastewater organic carbon by biological treatment.

The objective of the present study was to analyze the impact of nutrients limitation in PHA production integrated into a wastewater treatment process using a membrane bioreactor with continuous feeding operation and a C:N ratio of 20 and 25 which lead to obtained up to 16.6% and 12.67% cell dry weigh respectively. The PHA extracted were characterized resulting in similar thermal and chemical properties which demonstrated that mixed microbial cultures can achieve a uniform PHA production.

**Palabras claves:** *Polyhydroxyalkanoates, PHA, C/N ratio, membrane biorreactor, wastewater.*

## ***Contenido***

Índice de figuras.....	4
Índice de tablas .....	5
Notación.....	6
1 Introducción.....	7
2 Marco Conceptual de la Investigación .....	9
2.1 Pregunta de Investigación .....	9
2.2 Justificación.....	9
2.3 Hipótesis.....	10
2.4 Objetivos .....	10
2.4.1 Objetivo General.....	10
2.4.2 Objetivos Específicos .....	10
3 Marco Teórico .....	11
3.1 Polihidroxialcanoatos .....	11
3.2 Estructura química y clasificación de PHA.....	12
3.3 Biosíntesis de PHA.....	14
3.4 Aplicaciones y propiedades de los PHA .....	17
3.5 Agua residual como sustrato para la producción de PHA.....	18
3.6 Biorreactores con membranas sumergidas .....	19
3.7 Antecedentes .....	21
4 Materiales y métodos.....	27
4.1 Descripción del reactor y condiciones de operación.....	27
4.1.1 Reactor .....	27
4.1.2 Membrana .....	27
4.1.3 Protocolo de limpieza de la membrana.....	28
4.1.4 Sustrato .....	29
4.2 Metodología .....	30
4.2.1 Biomasa inoculada.....	30
4.2.2 Crecimiento de la biomasa.....	32
4.2.3 Etapa de adaptación y estabilización .....	34
4.2.4 Extracción de PHA .....	35

4.2.5	Análisis estadístico .....	35
4.2.6	Caracterización de PHA.....	37
5	Resultados y discusión .....	40
5.1	Parámetros fisicoquímicos .....	40
5.2	Eficiencia de tratamiento.....	41
5.3	Actividad bacteriana.....	42
5.4	Cuantificación de PHA.....	43
5.5	Caracterización.....	45
6	Conclusiones.....	49
7	Referencias .....	50
Anexo 1	.....	55
Anexo 2	.....	56
Anexo 3	.....	57

## Índice de figuras

<b>Figura 3-1</b> Gránulos intracelulares de PHA.....	11
<b>Figura 3-2</b> Unidad básica de los PHA.....	12
<b>Figura 3-3</b> Clasificación de PHA según su composición monomérica.....	14
<b>Figura 3-4</b> Ruta metabólica de producción de PHB a partir de la reducción de Acetil-CoA.....	16
<b>Figura 3-5</b> a). Filtración por membrana en un BRM b). Ensuciamiento de la membrana en un BRM.....	19
<b>Figura 4-1</b> a). Reactor de acrílico b) Difusor de aire tipo disco.....	27
<b>Figura 4-2</b> Módulo de membranas del reactor BRM.....	28
<b>Figura 4-3</b> BRM en etapa de crecimiento de biomasa.....	32
<b>Figura 4-4</b> a. Muestras de sólidos en la mufla para prueba de sólidos b. Muestra de sólidos en el horno para prueba de sólidos.....	33
<b>Figura 4-5</b> a. Proceso de filtración de las muestras para prueba de sólidos b. Muestras en el desecador para prueba de sólidos.....	33
<b>Figura 4-6</b> a. Viales de DQO en digestión b. Viales de DQO.....	34
<b>Figura 4-7</b> TGA Q5000 modelo V3.17 Build 265.....	38
<b>Figura 4-8</b> FTIR IRAffinity -1S.....	38
<b>Figura 4-9</b> DSC Perkin Elmer.....	39
<b>Figura 5-1</b> pH del influente, reactor y efluente durante la operación del reactor.....	40
<b>Figura 5-2</b> Concentración de SST, SSV y SSV/SST en el reactor durante la operación del reactor.....	40
<b>Figura 5-3</b> PHA extraído en el presente estudio bajo una relación C:N de 20.....	43
<b>Figura 5-4</b> Peso seco celular de PHA obtenido por Loeza (2017) y PHA obtenido en el presente estudio (2019) en un sistema BRM.....	44
<b>Figura 5-5</b> Curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de la muestra obtenida bajo una relación C:N=20.....	45
<b>Figura 5-6</b> Curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de la muestra obtenida bajo una relación C:N=25.....	46
<b>Figura 5-7</b> Curva del análisis DSC del polímero obtenido bajo una relación C:N=20.....	46
<b>Figura 5-8</b> Curva del análisis DSC del polímero obtenido bajo una relación C:N=25.....	47
<b>Figura 5-9</b> Espectro de infrarrojo para un polímero obtenido bajo una relación C:N=20.....	48
<b>Figura 5-10</b> Espectro de infrarrojo para un polímero obtenido bajo una relación C:N=25.....	48

## *Índice de tablas*

<b>Tabla 3-1</b> Sustituciones del grupo radical en la estructura de los PHA.....	13
<b>Tabla 3-2</b> Comparación de las propiedades físicas y térmicas entre PHA y PP (Andler y Díaz-Barrera, 2013).....	13
<b>Tabla 3-3</b> Microorganismos y nutriente limitante que resulta en la producción de PHA (García et al., 2013).....	15
<b>Tabla 3-4</b> Parámetros operacionales en un BRM .....	21
<b>Tabla 4-1</b> Características generales del módulo de membrana del BRM.....	28
<b>Tabla 4-2</b> Protocolo de lavado del módulo de membrana .....	29
<b>Tabla 4-3</b> Parámetros de calidad del reactor biológico 2 de la PTAR “San Pedrito “pertenece al municipio de Pátzcuaro, Michoacán.....	30
<b>Tabla 4-4</b> Concentraciones de sólidos y DQO del reactor al inicio de operación del reactor .....	33
<b>Tabla 4-5</b> Equipos utilizados para el monitoreo de la operación del reactor.....	33
<b>Tabla 4-6</b> Métodos y equipos empleados para el análisis de los parámetros fisicoquímicos del reactor.....	35
<b>Tabla 5-1</b> Concentraciones de DQO, N-NH <sub>3</sub> , N-NO <sub>3</sub> y P-PO <sub>4</sub> .....	42
<b>Tabla 5-2</b> Coeficientes cinéticos y estequiométricos durante la operación del reactor .....	43

## Notación

Notación	Descripción	Unidades
AC	Ácido acético	
BRM	Biorreactor de membranas sumergidas	
CO	Carga orgánica	$g_{DQO}/g_{SSV}\cdot d.$
CMM	Cultivo microbiano mixto	
CMP	Cultivos microbianos puros	
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	
DQO	Demanda química de oxígeno	$mg\cdot L^{-1}$
FTIR	Espectroscopia infrarroja	
Q	Flujo	$L\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}$
J	Flujo transmembranal	$L\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}$
GL	Glucosa	
PHA-SCL	PHA de cadena corta	
PHA-MCL	PHA de cadena media	
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)	
PHH	Poli(3-hidroxihexanoato)	
PHV	Poli(3-hidroxivalerato)	
PVDF	Polifloruro de vinilideno	
PHA	Polihidroxialcanoatos	
PHB	Polihidroxibutirato	
PP	Polipropileno	
C:N	Relación carbono: nitrógeno	
$Y_{PHA/SSV}$	rendimiento de almacenamiento de PHA	$mg_{SSV}\cdot mg_{DQO}^{-1}$
SST	Sólidos suspendidos totales	$mg\cdot L^{-1}$
SSV	Sólidos Suspendidos volátiles	$mg\cdot L^{-1}$
$r_x$	Tasa de producción de biomasa	$g_{DQO}\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$
$r_s$	tasa de utilización de sustrato	$g_{DQO}\cdot L^{-1}\cdot d^{-1}$
TRC	Tiempo de retención celular	d
TRH	Tiempo de retención hidráulico	d
TGA	Análisis termogravimétrico	

## ***1 Introducción***

El desarrollo de polímeros sintéticos es considerado uno de los mayores avances del siglo XX, gracias a su gran versatilidad se han convertido en materiales indispensables de uso diario difíciles de sustituir, sin embargo, su disposición final en los ecosistemas representa un riesgo medio ambiental debido a su estructura molecular difícil de degradar. Los plásticos convencionales son fácilmente desechados y el alcance de su contaminación se ha vuelto evidente en ecosistemas terrestres y marinos resultando en la búsqueda de nuevos materiales que cumplan con las exigencias medioambientales actuales.

Dentro de la clasificación de los biopolímeros aquellos que han ganado gran interés en la ciencia son los poliésteres sintetizados por microorganismos mediante procesos de fermentación de materias primas renovables, sus ventajas se atribuyen a que los sustratos empleados para su síntesis son recursos renovables o sustratos de bajo valor económico en contraste con los plásticos convencionales que se derivan de la industria petroquímica. Los PHA son polímeros biodegradables, biocompatibles, sostenibles (Álvarez, 2016) que presentan características fisicoquímicas y termoplásticas similares a los polímeros de origen petroquímico, ofreciendo enormes beneficios al sector ambiental. Pese a ello, no se han logrado disminuir sus costos de producción siendo el mayor inconveniente que evita su competitividad económica en el mercado. Por esta razón se han explorado nuevas técnicas de producción entre las que destacan el remplazo de cultivos microbianos puros (CMP) por CMM en sistemas abiertos, el empleo de sustratos económicos de fácil alcance, procesos de producción sustentables y métodos más efectivos de extracción que han permitido disminuir el costo final de producción hasta un 40% (Kourmentza, Ntaikou, Lyberatos, y Kornaros, 2015).

Los PHA son parte de los productos subsecuentes de la transformación del carbono que ocurre durante el tratamiento biológico de agua residual, encontrándolos en los CMM que forman parte del lodo activado generado durante el proceso, de esta manera se promueve el desarrollo de los microorganismos acumuladores de PHA a partir de sustratos económicos y fácilmente disponibles durante los procesos biológicos de tratamiento de agua residual.

Mediante esta investigación se estudió efecto de la limitación de nitrógeno (expresada en términos de la relación C: N) en la producción de PHA en un sistema BRM operado en continuo alimentado con ácido acético como sustrato fácilmente biodegradable. Adicionalmente, se realizó la caracterización de los polímeros extraídos permitiendo el análisis de la variación de la relación C: N sobre propiedades térmicas y químicas de los polímeros. Con los resultados obtenidos se espera contribuir al estudio de optimización en producción de PHA integrado a un proceso de tratamiento de agua residual y aportar una estrategia de operación distinta a las exploradas en la literatura, así como promover la implementación de los sistemas BRM y la sustitución de los polímeros a base de petróleo por biomateriales mediante la implementación de nuevas biotecnologías.

## ***2 Marco Conceptual de la Investigación***

### **2.1 Pregunta de Investigación**

¿Cuál es el efecto que tiene la variación de la relación C: N en la producción de PHA, en un sistema BRM operado en continuo, utilizando ácido acético como sustrato simple y fácilmente biodegradable?

### **2.2 Justificación**

Los plásticos sintéticos, llevan consigo una serie de inconvenientes por ser materiales generados a partir de materias primas fósiles entre ellas el agotamiento de las reservas, las fluctuaciones constantes en los costos, el calentamiento global, su creciente demanda y la incertidumbre de su distribución. Ante esta situación, los bioplásticos han sido considerados como una fuerte alternativa para reducir el uso de plásticos convencionales y el cuidado del planeta. Pese a las grandes ventajas de los PHA sobre los plásticos petroquímicos, sus costos de producción son elevados lo que ha frenado su producción a gran escala por lo que surge la necesidad de unir esfuerzos para encontrar nuevas alternativas de producción que reduzcan significativamente sus costos. Para ello es necesario el empleo de materias primas de bajo costo, nuevos procesos que incrementen los rendimientos celulares de PHA y técnicas de extracción más accesibles.

Los plásticos a base de combustibles fósiles como el petróleo están restringidos por un recurso natural limitado, más aún son materiales resistentes a la degradación microbiana que se acumulan en el ambiente con un alto potencial contaminante. La explotación del petróleo y la demanda de materiales plásticos plantea graves problemas medioambientales como el calentamiento global, la toxicidad de los ecosistemas y los riesgos a la salud humana.

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la síntesis de PHA generalmente tiene lugar en respuesta a una limitación de N, P, S, Mg y O y la presencia de un exceso de fuente de carbono en el medio de cultivo, tal es el caso del agua residual que, por su alto contenido de materia orgánica, fósforo, nitrógeno puede emplearse como sustrato y medio que favorezca a la selección de microorganismos acumuladores de PHA. En este sentido, los BRM son

sistemas que ofrecen las tasas más altas de remoción de contaminantes en la actualidad en razón de lo cual esta investigación está dirigida a la integración un proceso de tratamiento de agua residual en un BRM y la producción de PHA mediante la limitación de la concentración de nitrógeno en el medio como estrategia de optimización para la acumulación de PHA.

## **2.3 Hipótesis**

El rendimiento celular de polihidroxialcanoatos aumenta al incrementar la relación C:N en un biorreactor con membranas sumergidas operado en continuo, alimentado a partir de un sustrato con una fuente de carbono fácilmente biodegradable.

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo General**

Estudiar el efecto de la relación C:N en el rendimiento celular de PHA producidos en un BRM alimentado en continuo con agua residual sintética formulada a partir de ácido acético.

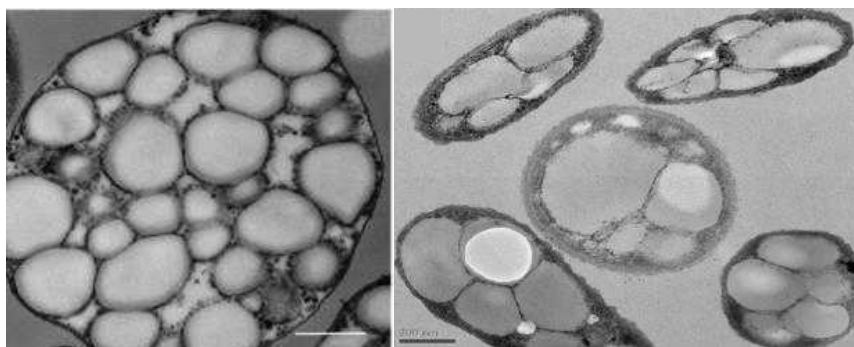
### **2.4.2 Objetivos Específicos**

- I. Definir la cinética de producción de PHA en un BRM alimentado con agua residual a base de ácido acético.
- II. Cuantificar la producción de PHA en un BRM alimentado con una carga orgánica de  $0.1 \text{ g}_{\text{DQO}} / \text{g}_{\text{SSV}} \cdot \text{d}$  agua residual sintética a base de ácido acético y diferentes relaciones C:N.
- III. Evaluar la eficiencia de tratamiento del agua residual en el BRM acoplada al proceso de producción de bioplásticos.
- IV. Determinar el tipo de polímero obtenido en un BRM, operado en continuo por medio de química y térmica del material extraído.
- V. Conocer el efecto que tiene la variación de la relación C:N en las propiedades fisicoquímicas de los PHA obtenidos, por medio de su caracterización.

### 3 Marco Teórico

#### 3.1 Polihidroxialcanoatos

Los PHA son poliésteres biodegradables, acumulados por una gran variedad de microorganismos de manera natural como fuente de carbono y energía, son almacenados como inclusiones citoplasmáticas insolubles en agua de diferentes tamaños (Figura 3-1), cuando se someten a condiciones de estrés causado por la limitación de un nutriente esencial que restringe su crecimiento. Cuando la fuente de carbono se agota, los biopolímeros sintetizados se despolimerizan y pueden ser utilizados como fuente de reserva de carbono y material energético. Los gránulos de PHA se encuentran rodeados de una membrana consistente en una monocapa de fosfolípidos que contienen enzimas polimerasas y despolimerasas. La biosíntesis de estos polímeros se lleva a cabo en un medio con exceso de fuente de carbono una concentración limitante de otros nutrientes esenciales para el crecimiento como el N y P, el agotamiento del nutriente actúa como un desencadenante para el cambio metabólico hacia la biosíntesis de PHA. La producción de estos polímeros se lleva a cabo principalmente a partir de bacterias mediante procesos de fermentación, utilizando diferentes rutas biosintéticas dependiendo de las fuentes de carbono utilizadas (Álvarez-da Silva, 2016). La síntesis de PHA ocurre principalmente por las condiciones ambientales (aerobias y anaerobias) y por la limitación (fuente de carbono y limitantes de nutrientes).



**Figura 3-1** Gránulos intracelulares de PHA  
(Chanprateep, 2010)(Z. Chen et al., 2016)

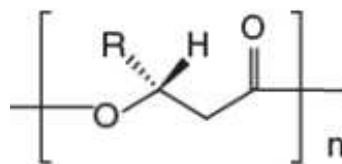
Una de las ventajas más grandes que estos biopolímeros presentan es su capacidad de biodegradabilidad gracias a que distintos microorganismos poseen enzimas que permiten su

degradación hasta CO<sub>2</sub>, agua y metano como productos finales, en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente. Pueden ser degradados por hidrólisis y/o enzimáticamente, produciéndose la rotura de los enlaces que mantienen unidos los monómeros en el polímero. Típicamente una estructura de PHA tiene una velocidad de degradación de pocos meses en condiciones anaerobias o pocos años cuando se encuentra en agua de mar, acelerando el proceso de degradación con la exposición a la luz UV (Andler y Díaz-Barrera, 2013). Se obtienen a partir de fuentes renovables, son hidrofóbicos, insolubles en agua, inertes, termoplásticos, elastoméricos, no tóxicos, biocompatibles y sus propiedades fisicoquímicas son similares a las de los polímeros convencionales como el polietileno y polipropileno (PP) (Laycock et al., 2014).

### 3.2 Estructura química y clasificación de PHA

Los PHA son una clase de poliésteres lineales formados por monómeros de hidroxiácidos unidos entre sí por un enlace éster. Este enlace se produce cuando se condensa el grupo carboxilo de un monómero con el grupo hidroxilo del siguiente. Los PHAs son producidos completamente por procesos biológicos, ya que, todo el proceso de biosíntesis, tanto la producción de monómeros como la polimerización, se produce en las células microbianas (Álvarez-da Silva, 2016).

Los monómeros constituyentes pueden tener estructuras muy diversas, existiendo por tanto una gran variedad de PHA (Álvarez-da Silva, 2016) hasta ahora se reportan más de 150 estructuras de PHA con diferentes características de termoflexibilidad y propiedades mecánicas. Los PHA pueden ser homopolímeros (un solo tipo de monómero) o copolímeros (diferentes unidades monoméricas).



**Figura 3-2** Unidad básica de los PHA  
(Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016)

En la Figura 3-2 se muestra la estructura química de la unidad repetitiva de los PHA, donde el valor de n depende del grupo R y del microorganismo en el cual se produce, variando entre 100 y 30000 (Delgado & Cordoba, 2015). En la Tabla 3-1 se muestran las sustituciones del grupo radical en la estructura de PHA.

Tabla 3-1 Sustituciones del grupo radical en la estructura de los PHA

Grupo R	Nombre del polímero	Abreviación
CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxibutirato)	PHB
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxivalerato)	PHV
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	poli(3-hidroxihexanoato)	PHH <sub>x</sub>

El poli(3-hidroxibutirato) o PHB fue el primer PHA identificado en 1926 (Álvarez-da Silva, 2016) y es el más estudiados, por sus características similares al polipropileno (Tabla 3-2), uno de los plásticos de la industria petroquímica de mayor uso.

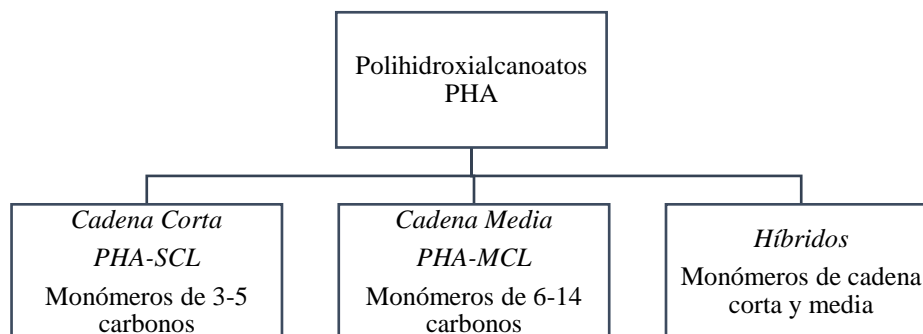
Tabla 3-2 Comparación de las propiedades físicas y térmicas entre PHA y PP (Andler y Díaz-Barrera, 2013)

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

Los PHA se clasifican de acuerdo a la naturaleza de sus unidades monoméricas (Figura 3), si el polímero está formado por un solo tipo de unidades se denomina homopolímero y si está integrado por monómeros de distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo se le conoce como copolímero (Delgado y Cordoba, 2015).

Existe una amplia gama de composiciones disponibles basadas en su unión con diferentes monómeros, lo que les confiere propiedades distintas. Dependiendo del número de

átomo de carbono en los monómeros los PHA se clasifican en dos grupos: PHA de cadena corta (PHA-SCL) y PHA de cadena media (PHA-MCL). También existen PHA mixtos que se componen de monómeros de cadena corta como y cadena media. El tipo de PHA sintetizado depende del microorganismo en cuestión, por lo que la mayoría sólo produce PHA-SCL o PHA-MCL y sólo una pequeña parte de ellos es capaz de sintetizar PHA mixtos (García et al., 2013).



**Figura 3-3** Clasificación de PHA según su composición monomérica (García et al., 2013)

Los PHA-SCL constan de 3-5 átomos de carbono y son sintetizados por una amplia gama de bacterias como *Cupriavidus necátor*. Los PHA-MCL se componen de monómeros que tienen de 6-14 átomos de carbono y son sintetizados principalmente por especies de *Pseudomonas* (Mozejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016). Se debe mencionar que la razón por la cual un PHA se forma como un polímero de cadena corta o media está relacionada directamente con la enzima encargada de la síntesis (sintasa) ya que ésta es específica al sustrato y puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos, de esta manera la composición química de los PHA va a depender del sustrato utilizado, de la enzima PHA-sintasa y de la ruta metabólica involucrada.

### 3.3 Biosíntesis de PHA

Los PHA son acumulados como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos que se alojan en el citoplasma de los microorganismos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas (Delgado y Cordoba,

2015). Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la síntesis de PHA generalmente tienen lugar en respuesta a una limitación de N, P, S, Mg y O y la presencia de un exceso de fuente de carbono en el medio de cultivo (García et al., 2013). En la Tabla 3-3 se presentan algunos microorganismos y su principal nutriente cuya limitación tiene como resultado la producción celular de PHA. Se ha reportado que se puede llegar a alcanzar en una bacteria hasta 90% de su peso seco en moléculas de PHA (Delgado y Cordoba, 2015) y se sabe también que la tasa de degradación de polímero acumulado es aproximadamente diez veces más lenta que la tasa de síntesis (Delgado y Cordoba, 2015).

**Tabla 3-3** Microorganismos y nutriente limitante que resulta en la producción de PHA (García et al., 2013)

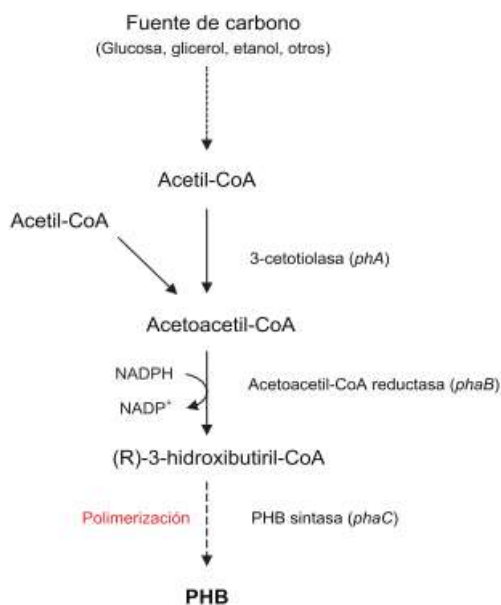
<b>Microorganismo</b>	<b>Nutriente Limitante</b>
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp. K.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

La producción de estos biopolímeros se lleva a cabo principalmente a partir de bacterias mediante procesos de fermentación, utilizando diferentes rutas biosintéticas dependiendo de las fuentes de carbono utilizadas (Álvarez-da Silva, 2016).

La acumulación de PHA por cultivos mixtos es típicamente producidos por exposición de la biomasa a condiciones subnormales de alimentación. De esta manera la población de especies de microorganismos debe adaptarse para sobrevivir y crecer en un medio donde hay una escasez de alimento y nutrientes y tendrá que competir entre sí en los cortos periodos en lo que hay alimento. Cuando la escasez de alimento se presenta en periodos largos con

respecto a los periodos de alimentación las bacterias disminuyen la producción de ciertas enzimas del crecimiento. Cuando hay alimento las especies de bacterias que tienen la capacidad de asimilar los nutrientes con mayor velocidad tienen una ventaja sobre el resto de la biomasa. La asimilación rápida de sustrato externo por microorganismos acumuladores de PHA es una estrategia común de supervivencia que presentan las bacterias cuando las rutas metabólicas para el crecimiento se encuentran interrumpidas. Los PHA almacenados pueden utilizarse como sustrato interno durante los periodos de hambruna para crecimiento y energía de la biomasa, y de esta forma es como los microorganismos acumuladores de PHA son favorecidos en presencia de lapsos intermitentes de alimentación.

El PHB es el tipo de PHA más estudiado por lo que la ruta de biosíntesis de este polímero ha sido descrita a detalle. La principal ruta bioquímica de producción es a partir de acetil-CoA, el cual es convertido a PHB mediante la intervención de tres enzimas biosintéticas.



**Figura 3-4** Ruta metabólica de producción de PHB a partir de la reducción de Acetil-CoA (Andler y Díaz-Barrera, 2013)

En el primer paso, la enzima 3-cetotiolasa condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. Luego, una segunda enzima, acetoacetil-CoA reductasa permite la reducción de acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA, utilizando NADPH. Finalmente, la enzima PHB sintasa polimeriza 3-hidroxiacetil-CoA a PHB, liberando la coenzima-A.

Durante el crecimiento bacteriano, la enzima 3-cetotiolasa es inhibida por la coenzima-A libre y el flujo de acetil-CoA se favorece hacia el ciclo de Krebs. Cuando hay limitación de algún nutriente, diferente al carbono, el acetil-CoA es canalizado hacia la biosíntesis de PHB (Andler y Díaz-Barrera, 2013).

### **3.4 Aplicaciones y propiedades de los PHA**

Los polímeros de PHAs una vez extraídos y purificados, presentan propiedades que los hace útiles en un amplio rango de aplicaciones, pudiendo ser utilizados en campos muy diversos como: medicina, industria farmacéutica, agricultura, industria de empaques, construcción y como revestimiento de otros materiales para incrementar su durabilidad entre otras gracias a su biodegradabilidad y resistencia al agua. Dependiendo de la aplicación será grado de purificación que se deberá someter el polímero para ser empleado.

Los PHA-SHL son altamente cristalinos (55-80%) siendo un poliéster completamente estéreo-regular con altas temperaturas de fusión y bajas temperaturas de transición vítrea. Su alta cristalinidad los hace materiales rígidos y quebradizos. El punto de fusión oscila entre los 173-180°C, mientras que la temperatura de transición vítrea se encuentra entre 5-9 °C (Możejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016). Las temperaturas de transición de fusión son parámetros importantes para conocer las posibles aplicaciones de materiales. Los copolímeros de cadena corta como P(3HB-co-3HV) son más deseables porque su punto de fusión es mucho menor, son menos cristalinos, más fáciles de moldear y duraderos. Además estas propiedades termomecánicas pueden variar según la composición porcentual (Możejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016). Los PHA-MCL actúan como elastómeros dentro de un rango de temperatura muy estrecha debido a su baja temperatura de fusión. Su punto de fusión varía de 39- 61°C. Su temperatura de transición vítrea está usualmente por debajo de la temperatura ambiente, en un rango de -43 a -25°. Estas características hacen de los PHA-MCL materiales más flexibles elásticos que los PHA-SCL (Laycock et al., 2014).

Inicialmente los PHA fueron utilizados para fabricar envases cosméticos como envases de shampoo, barreras contra la humedad, bolsas, vasos, cubiertos, botellas desechables y productos sanitarios (Delgado y Cordoba, 2015). Las aplicaciones que pueden dársele a los

PHA en la agricultura incluyen la encapsulación de semillas, tubos de irrigación, matrices para la liberación controlada de factores de crecimiento, pesticidas, herbicidas, fertilizantes con liberación lenta de sustancias o activos, películas plásticas para la protección de cultivos y contenedores (Arcos-Hernandez et al., 2012; Bengtsson et al., 2017). Una de las ventajas en este campo de aplicación es que no requiere un grado de purificación alto del polímero, lo que puede facilitar el proceso de extracción y reducir los costos.

El homopolímero y co-poliéster P (3HB) de P (3HB-co-3HV), son los más estudiados para aplicaciones médicas; se han considerado para la fabricación de productos cardiovasculares (válvulas cardíacas, injertos vasculares, etc.), en la industria farmacéutica (tabletas, micro vehículos para terapias contra el cáncer), en la curación de heridas (suturas, bastoncillos, etc.), en ortopedia (placas óseas). Además, la alta inmunotolerancia, baja toxicidad y biodegradabilidad son algunos de los beneficios asociados a los PHA dentro de la ingeniería de tejidos. La combinación de los PHA y otros materiales aumenta las propiedades que se pueden alcanzar en un material y sus aplicaciones.

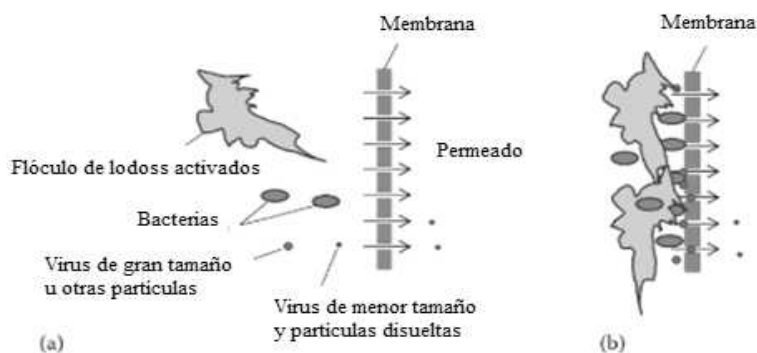
### **3.5 Agua residual como sustrato para la producción de PHA**

Las reservas de los recursos naturales se han vuelto escasos, el crecimiento de la población y el crecimiento económico llevan consigo una creciente demanda de recursos, elevando su demanda y generando estrés al medio ambiente. Por consecuencia la producción a partir de residuos se ha vuelto atractiva, tal es el caso del agua residual (considerada con un medio de transporte de diversos recursos) puede utilizarse como recurso por su alto contenido en materia orgánica, fósforo, nitrógeno, metales pesado, energía térmica, etc. Los hogares y las empresas adicionan materiales, productos químicos y energía al agua convirtiéndola en agua residual de modo que surgen infinidad de oportunidades para la recuperación de recursos. Durante mucho tiempo, se han considerado una preocupación para la salud humana, un peligro medio ambiental y un trabajo innecesario, más sin embargo, ha surgido un cambio de paradigma e interés en la recuperación de materiales y energía en ella, volviéndose una solución para evolucionar el tratamiento de agua convencional con fin de alcanzar su sostenibilidad mediante la recuperación de recursos de los lodos generados del proceso.

El agua residual se constituye de compuestos orgánicos capaces de ser biodegradados por microorganismos; formados por la combinación de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, entre otros, además, podemos encontrar otros elementos importantes como el azufre, fósforo y hierro (Metcalf y Eddy, 2014). Sin embargo, ciertos compuestos presentes en el agua residual pueden ser transformados en bioproductos renovables de alto valor agregado mediante la gestión de residuos. El valor de la demanda química de oxígeno es la medida del contenido de materia orgánica en el agua y durante los procesos de tratamiento de agua la materia orgánica removida resulta en el lodo residual, formados a partir de un consorcio mixto microbiano con potencial acumulador de PHA.

### 3.6 Biorreactores con membranas sumergidas

Los sistemas BRM son una tecnología utilizada para tratar el agua residual que incorpora un proceso biológico y la separación sólido-líquido por medio de una membrana. En el biorreactor los contaminantes presentes en el agua residual son degradados por la actividad microbiana y los poros de la membrana (0.05-0.1  $\mu\text{m}$  Park, 2015) son utilizados para separar el agua tratada y los microorganismos. El poro de las membranas es lo suficientemente pequeño que impide el paso a los flóculos de lodos, bacterias e inclusive algunos virus y otras partículas (Figura 3-5 a.) siendo esta la razón por la que los sistemas BRM producen un efluente de alta calidad equivalente a un efluente de un tratamiento terciario donde la presencia de sólidos suspendidos es prácticamente indetectable.



**Figura 3-5** a). Filtración por membrana en un BRM b). Ensuciamiento de la membrana en un BRM (Park, 2013)

Los sistemas BRM presentan algunos inconvenientes como cualquier otro proceso donde se utilizan membranas, como su ensuciamiento (Figura 3-5 b.), las membranas son

vulnerables a ensuciarse durante el proceso por los lodos activados, sólidos suspendidos y otras partículas orgánicas e inorgánicas durante el proceso de filtrado. Desde la introducción de estos sistemas en 1969, numerosos estudios se han conducido para optimizar la forma de los módulos de membrana, los poros de la membrana, condiciones operacionales para reducir el ensuciamiento de la membrana, etc. y con ello ha surgido la aparición de sistemas BRM más competitivos.

El proceso de lodos activados y los sistemas BRM utilizan el poder metabólico de los microorganismos en los reactores para el tratamiento de las aguas residuales, debido a lo cual la tasa de tratamiento de aguas residuales es proporcional a la concentración de biomasa activa en el reactor. Teóricamente, no existe una concentración máxima de sólidos suspendidos, aunque se ha visto que con una concentración de 8,000- 12,000 mg/L se alcanzan condiciones óptimas. Las altas concentración de biomasa a la que opera un BRM también genera beneficios al reducir la producción de lodos ya que los microorganismos tienen a degradarse en los biorreactores (fase endógena). Como la tasa de degradación es proporcional a la concentración de biomasa los BRM producen menos lodos residuales y, en consecuencia, reducen el costo asociado a ellos. El tiempo de retención celular (TRC) es un parámetro de operación importante que determina la calidad del agua tratada y la concentración de sólidos totales. En general, con el aumento del TRC la eficiencia del tratamiento aumenta y la concentración de sustrato disminuye, el TRC en un BRM (típicamente >20 días) es mayor que en un proceso de lodos activados (típicamente 5-10 días), lo que contribuye a la alta calidad del efluente en los BRM. En el caso de los lodos activados el TRC se controla modulando la purga en el tanque de sedimentación, sin embargo, la concentración de la purga es variable dependiendo de las propiedades de sedimentación de la biomasa en el tanque de sedimentación, lo que dificulta el control preciso del TRC. En un BRM, los lodos de la purga se obtienen directamente del reactor, lo que proporciona una forma más simple y precisa de modular el TRC.

Como se mencionó en este apartado los sistemas BRM tienen grandes ventajas tales como ofrecer un efluente de gran calidad (debido a la separación sólido-líquido de la membrana y a un mayor TRC), menor huella de la planta de tratamiento (debido a que el reactor es un

sistema compacto y más aún no necesita un sedimentador), reducen la producción de lodo (debido a las altas concentración de sólidos suspendidos que opera el reactor) y tiene un control más preciso del TRC (debido a que no necesitan un tanque de sedimentación). Los procesos de tratamiento por medio de un sistema de BRM tienen gran versatilidad y han sido aplicados para el tratamiento de agua de distintos orígenes con una amplia gama de contaminantes (Fraga et al., 2017). Varios autores han resaltado las ventajas de los BRM sobre otros tratamientos convencionales como los lodos activados (Moser et al. 2018 y Park, 2015). En Tabla 3.4 se muestran los parámetros operacionales de un BRM.

**Tabla 3-4** Parámetros operacionales en un BRM  
(Metcalf y Eddy, 2014)

<b>Parámetro</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valor típico</b>	<b>Rango</b>
Carga orgánica volumétrica	kg/m <sup>3</sup> ·d	1.5	1.0-3.2
Sólidos suspendidos totales	mg/L	10,000	5,000-20,000
Sólidos suspendidos volátiles	mg/L	8,500	4,000-16,000
Carga orgánica	g <sub>DQO</sub> / g <sub>SSV</sub> · d	0.15	0.05-0.4
Tiempo de retención celular	d	20	5-30
Tiempo de retención hidráulico	h	6	5-9
Flujo	L/m <sup>2</sup> ·h	20	15-45
Oxígeno disuelto	mg/L	2	0.5-1.0

### 3.7 Antecedentes

Las oportunidades que representa la acumulación de PHA y los retos de su producción a gran escala se han discutido previamente, así como su potencial como un valioso producto industrial. Debido al alto costo necesario para su producción se ha buscado la mejora de las estrategias de control de cultivos, y se han planteado en numerosas ocasiones la utilización de fuentes de carbono económicas.

En un principio la producción de PHA se realizaba mediante cultivos microbianos puros, dentro de los que sobresalen los de mayor producción *Escherichia Coli*, *Cupriavidus Nector*, *Ralstonia Eutropha* (Y. J. Chen, Huang, y Lee, 2014). Respecto a la diversidad de microorganismos productores de PHA, fuentes de carbono empleadas y porcentajes de acumulación se han reportado más de 300 especies, principalmente bacterias, que utilizan sustratos que van desde carbohidratos, lípidos y proteínas, hasta compuestos aromáticos, residuos agroindustriales y gases, acumulando de 1-80% de polímero en relación al peso de su biomasa en base seca (García et al., 2013). Documentos recientes han demostrado que es posible enriquecer una población microbiana mixta para la producción de PHA y se han alcanzado productividades comparables (90% del peso seco celular) a los obtenidos mediante cultivos microbianos puros (Jiang et al., 2012). Estos resultados son inspiradores ya que impulsan la producción PHA a partir de CMM como los presentes en las aguas residuales. El uso de CMM con materia primas sintéticas y residuos resultan en una reducción del 30-40% del costo total de producción (Kourmentza et al., 2015). Las preferencias de la aplicación de consorcios microbianos mixtos sobre cultivos puros se basan en los principios de selección y competencia (“evolución natural”) en lugar de recurrir a las técnicas que ofrecen los laboratorios de ingeniería genética donde el proceso es rigurosamente controlado. Previendo la producción a gran escala de PHA, los consorcios microbianos mixtos pueden adaptarse con mayor facilidad a materia primas complejas, ritmos de alimentación variados, distintos orígenes de alimentos (industriales o domésticos). Sin embargo es de gran importancia mencionar que los consorcios microbianos mixtos no es el método de elección adecuado cuando se busca obtener una producción de PHA uniforme, ya que se encuentran presentes diferentes especies acumuladoras de PHA, teniendo como resultado distintas masas moleculares, distribución de masas moleculares, cristalinidad y composición monomérica del polímero (Koller, Miranda, Dias, y Braunegg, 2017).

En el estudio reportado por Montiel-Jarillo, Carrera y Suárez-Ojeda (2017) se evaluó el enriquecimiento de un cultivo microbiano mixto (CMM) operado bajo un régimen de alimentación de exceso/limitación y diferentes niveles de pH en un reactor discontinuo empleando acetato como única fuente de carbono para producir PHA, adicionalmente se evaluó bajo un pH controlado de 7.5 y otro sin control alguno (valor promedio de 9). Con respecto a los experimentos a concentraciones de nutrientes variables (con variaciones de pH

de 8.8 a 9.2) los resultados indicaron que el contenido de PHA en la biomasa enriquecida es significativamente mayor, alrededor del 51% g de PHA/g de SSV bajo la limitación de nitrógeno. Este trabajo demostró la viabilidad del enriquecimiento de un CMM con capacidad de almacenamiento de PHA sin control de pH. Los resultados sugieren que se obtienen mejores contenidos de PHA y tasas de captación de sustrato sin control de pH en la etapa de acumulación. Finalmente, este trabajo también destaca la importancia de entender el papel de la concentración de nutrientes durante el paso de la bioacumulación de PHA en los microorganismos.

Con estos trabajos se ha demostrado la capacidad de los CMM de adaptarse a los cambios de sustrato o fuente de carbono y que la clave para alcanzar una alta producción de PHA a través de un consorcio mixto bacteriano es el empleo de estrategias alternas de alimentación. Actualmente, las investigaciones se enfocan en el control de procesos para encontrar las condiciones ideales en los sistemas de tratamiento de aguas residuales que permitan una producción viable para lograr una producción a gran escala como la fuente de carbono utilizada para el crecimiento y desarrollo de las especies productoras de PHA. Además, la selección de otros parámetros operativos y ambientales como el TRC, el contenido de nutrientes (principalmente N y P), carga orgánica, relación C/N y C/P, la temperatura del reactor, el pH y el tipo de mezcla son algunas de las condiciones que pueden controlarse y que potencialmente podrían mejorar la tasa de acumulación de PHA; además se ha visto que afectan el monómero producido (Cha, Son, Jamal y Zafar, 2016). Entre la recuperación de recursos y materiales a partir del agua residual que aprovechan la materia orgánica presente en el agua, se ha analizado que la producción de bioplástico (PHA) debe ser priorizada debido al alto valor de producto final obtenido en comparación con otros como el biogás (Van Der Hoek, De Fooij, y Struiker, 2016).

El uso de distintos efluentes provenientes de procesos industriales han sido estudiado, por su alta concentración de materia orgánica biodegradable, entre los que destacan el agua residual provenientes de la industria del aceite de oliva (Alsafadi y Al-Mashaqbeh, 2017),

del aceite de palma (Gobi y Vadivelu, 2013), del almidón de yuca (Chaleomrum, Chookietwattana, y Dararat, 2014), entre otros.

Se ha sugerido en la literatura que la fuente de carbono se emplea para el crecimiento de la biomasa y no para la acumulación de PHA cuando en el medio hay un exceso de nutrientes. Por el contrario, bajo la limitación de N y/o P se promueve la ruta metabólica para la acumulación de PHA (Kourmentza et al., 2015). Jiang y colaboradores en 2012 han concluido que los contenidos de PHA no mejoran cuando se aumenta la concentración de nutrientes y que en lugar de trabajar con una concentración de limitante específica de C y/o P, se debe encontrar los niveles adecuados de estos nutrientes para cada medio y con ello alcanzar la máxima capacidad de producción de PHA. Bajo esta visión en particular se busca mostrar el efecto que tienen los regímenes de alimentación en la producción de PHA, mediante la variación de la relación C/N en un consorcio bacteriano presente en el agua residual. Se ha estudiado que bajo condiciones de estrés, como la limitación de nitrógeno, el crecimiento bacteriano se ve restringido y en consecuencia la fuente de carbono es utilizada y dirigida a la producción de PHA (Kourmentza et al., 2015). Por lo que se espera que en un medio donde hay ausencia de la fuente de nitrógeno cualquier aumento de biomasa es atribuible al almacenamiento de productos intracelulares y no al crecimiento bacteriano.

Como consecuencia a los numerosos trabajos realizados en los últimos años sobre el tema han permitido redireccionar las investigaciones y desarrollar nuevos enfoques para lograr la acumulación de PHA en la biomasa dentro de los procesos de tratamiento de agua residual sin interrumpir las eficiencias de los procesos o la eliminación de residuos. Así, las limitaciones se han reducido al prestar mayor atención a la conexión entre el rendimiento del proceso y las implicaciones para el producto final.

No obstante, la mayoría de estos estudios se realizan en reactores tipo batch, utilizando un volumen determinado, donde no hay entrada y salida constante de flujo; si lo que se busca es la integración de un proceso de producción de PHA a un sistema de tratamiento de agua residual a gran escala, es necesario estudiar los reactores utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, es decir, los reactores de flujo continuo. Loeza (2017) operó un BRM en continuo bajo aerobias con dos sustratos distintos (glucosa y ácido acético) variando la carga orgánica y encontró que la mayor producción de PHA se obtenía con una carga orgánica de 0.3 y utilizando ácido acético como fuente de carbono (8.89% p.s.c). En

experimentos a escala de laboratorio el suministro de nutrientes (nitrógeno y fósforo) se limita con respecto al aporte de masa orgánica para minimizar la aparición de crecimiento de biomasa activa durante el proceso de acumulación de polímeros. En general, se ha descubierto que la falta de nutrientes conduce a niveles más altos de saturación del contenido de PHA en la biomasa. Por otro para este enfoque se requiere realizar un ajuste de las concentraciones de nutrientes del sustrato utilizado. Hay que tomar en cuenta que este enfoque puede llegar a ser costoso o difícil de implementar prácticamente a gran escala con residuos orgánicos disponibles regionalmente como materia prima. Si no se impone la limitación de nutrientes durante el proceso de acumulación, se podría anticipar que el contenido final de PHA en la biomasa será menor de lo que podría alcanzarse con un buen método de producción.

Se ha demostrado que la manipulación del suministro de nutrientes con respecto al suministro restringido de carbono orgánico es un medio por sí mismo para la selección de las especies con la capacidad de acumulación de PHA del resto de la biomasa presente en los cultivos mixtos. La clave para la acumulación de PHA requiere ciertos aspectos esenciales tales como: i) sustrato, el cual debe ser rico en materia orgánica fácilmente biodegradable ii) se requiere la presencia de biomasa con potencial significativo de acumulación de PHA. Este CMM que acumula PHA puede enriquecerse y producirse a través de un bioproceso de eliminación de carbono orgánico, tal como el lodo activado.

Asimismo, la relación C:N en el sustrato afecta la selección y acumulación, son consideraciones que influyen en las oportunidades y desafíos de un enfoque con residuos orgánicos regionales disponibles como materias primas. (Johnson, Kleerebezem, y Loosdrecht, 2010) Investigaron la influencia de la relación C:N del medio en el rendimiento de un cultivo mixto y en la capacidad de producción de PHA del cultivo. Utilizando reactores por lotes (SBR) emplearon diferentes relaciones C:N limitando el nitrógeno y utilizando acetato como sustrato. Cuando se obtuvo una operación estable del reactor, el comportamiento se documentó mediante mediciones de las variables más relevantes. El PHA encontrado fue poli- hidroxibutirato (PHB). A pesar de experimentar con diferentes relaciones de C:N (13.5,15, 24) no se encontró una correlación clara entre la capacidad de producción de PHB, sólo se puede observar un patrón al considerar la secuencia de tiempo en la que se realizaron los experimentos donde el contenido de PHB aumentó con cada

experimento, probablemente debido al continuo enriquecimiento de los organismos productores de PHB. Serafim, Lemos, Oliveira y Reis (2004) evaluaron el efecto de la concentración de amoníaco en la acumulación de polímero. La acumulación disminuyó inversamente a la concentración de amoníaco. Cuando no se suministró amoníaco la velocidad de acumulación (0.83 Cmmol HB/Cmmol HAc) fue más del doble obtenida con 2.8 Nmmol/l (0.37 Cmmol HB/Cmmol HAc). Los resultados confirman que en cuanto más grade era la cantidad de amoníaco utilizada, más carbono era utilizado para el crecimiento y el proceso de almacenamiento era menos importante. Eso confirma los mecanismos de acumulación encontrados en la literatura. De la misma forma se concluyó que el amoníaco ocasionó una disminución en la tasa de crecimiento lo que llevó a un aumento en la acumulación de la tasa de producción de polímero. El crecimiento durante el proceso era lento, con velocidades bajas y cuando se limitaba la fuente de nitrógeno la tasa de crecimiento llegaba a cero.

Cavaillé y sus colaboradores (2016) observaron la capacidad de producción de polímero y como estrategia de maximización limitaron el P. Ellos afirman que la capacidad de adaptarse bajo una limitación de P es 7 veces mayor a la de limitar el N gracias a análisis celulares. Esta diferencia puede explicarse por la necesidad absoluta de N para construir proteínas para el crecimiento celular en comparación con la necesidad de P. De hecho, la afectación de N afecta la síntesis de proteínas, mientras que la limitación de P sólo retrasa la síntesis del ácido nucleico y/o la producción de energía. Por tanto, la limitación de P pudiera ofrecer mayor flexibilidad para el crecimiento celular en comparación con la limitación de N, y en última instancia, la plasticidad celular parece depender de la naturaleza limitante de los nutrientes. Kumar (2004) obtuvo diferentes rendimientos de PHA a partir del lodo activado de un proceso de tratamiento de agua residual industrial a partir su enriquecimiento mediante el control de la relación C:N. Encontraron una capacidad de almacenamiento del 33% con una relación de 14, sin embargo, señalan que el almacenamiento puede alcanzar un máximo, aunque la relación C:N se siga incrementando.

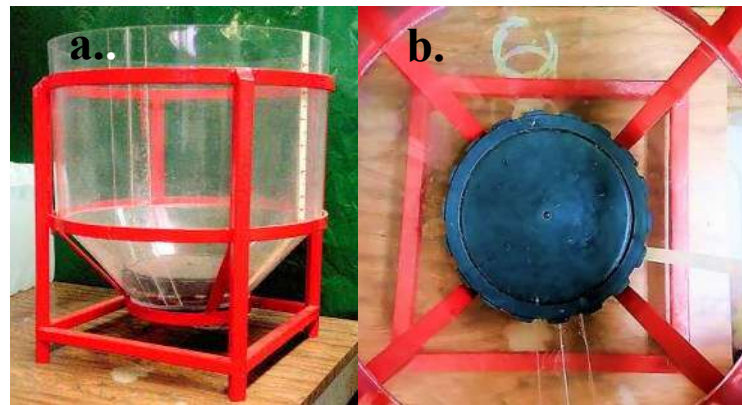
## 4 *Materiales y métodos*

### 4.1 Descripción del reactor y condiciones de operación

#### 4.1.1 Reactor

El reactor está construido de acrílico transparente y cuenta con un volumen útil de 70 litros, tiene forma cilíndrica con un diámetro de 0.5 m con una base cónica truncada que impide zonas muertas y asegura una distribución uniforme de oxígeno, asegurando la eficiencia del sistema (Figura 4-1 a.). En el fondo del reactor se encuentra el difusor de aire tipo disco de 22 cm de diámetro (Figura 4-1 b.) que suministra el oxígeno al reactor, proporciona agitación a la suspensión biológica para impedir que sedimenten y evita la colmatación de la membrana. El sistema trabaja bajo condiciones aerobias, con una concentración de oxígeno superior a 2 mg<sub>O<sub>2</sub></sub>/L.

El reactor opera bajo el régimen de mezcla completa y flujo continuo de 22.09 L/d, manteniendo un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 3.17 d. La carga orgánica másica (C.O.) a la que se operó el reactor fue de 0.1 g<sub>DOO</sub>/g<sub>SSV</sub>·d, considerado un valor típico de operación para un BRM (Tabla 3-4).



**Figura 4-1** a). Reactor de acrílico b) Difusor de aire tipo disco

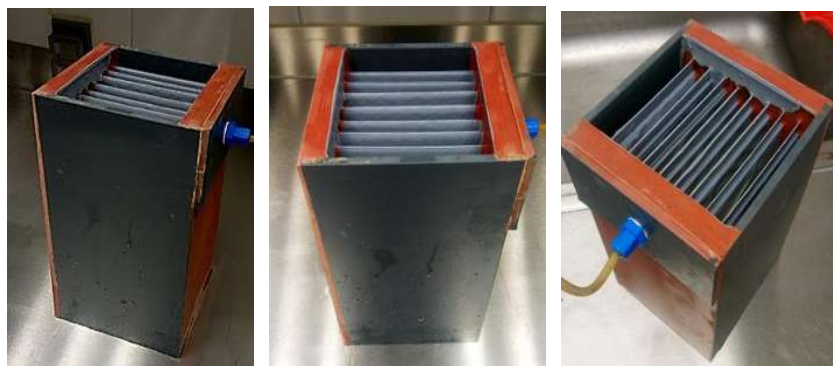
#### 4.1.2 Membrana

El módulo de membranas acoplado al reactor consta de ocho láminas planas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), se coloca al interior del reactor en sentido paralelo al flujo del aire con la finalidad de generar mayor cizallamiento de las burbujas con las membranas. Se trabajó

con un flujo transmembranal de  $J = 4.6 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , establecido en base a las características y especificaciones de la membrana (Tabla 4.1).

**Tabla 4-1** Características generales del módulo de membrana del BRM

Concepto	Dimensión	Unidad
Material	PVDF	
Diámetro de poro	0.14	$\mu\text{m}$
Número de hojas	8	pza
Espacio entre hojas	12	Mm
Área de filtración	0.20	$\text{m}^2$
Densidad de Área	54	$\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$
Resistencia nominal	$1 \times 10^{12}$	$\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$



**Figura 4-2** Módulo de membranas del reactor BRM

### 4.1.3 Protocolo de limpieza de la membrana

Para evitar la saturación de las membranas se realiza un protocolo de lavado (Tabla 4-2) previo al arranque de cada condición experimental, que permite mantener la membrana en óptimas condiciones de funcionamiento.

**Tabla 4-2** Protocolo de lavado del módulo de membrana

<b>Etapa</b>	<b>Concentración</b>	<b>Duración</b>
1. Inmersión en solución de NaOH	4 g·L <sup>-1</sup>	24 h
2. Inmersión en solución ácido cítrico	2.2 g·L <sup>-1</sup>	5 h
3. Inmersión en solución de hipoclorito de sodio	0.2 4 g·L <sup>-1</sup>	5 h

#### 4.1.4 Sustrato

El sistema BRM se alimentó con un sustrato sintético fácilmente biodegradable que facilita la cuantificación de las cinéticas de reacción. El agua residual sintética se diseñó a partir de CH<sub>3</sub>COOH como fuente de carbono y fue enriquecida con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Anexo 1), manteniendo una relación C:N de 20 y de 25 en términos de DQO y N-NH<sub>3</sub> con el propósito de comparar la producción de PHA bajo ambas condiciones. La preparación del sustrato se realizó cada 7 días en un volumen de 180 L y se realizaron ajustes del flujo diariamente para mantener el volumen adecuado de sustrato.



**Figura 4.4** Reactivos empleados para la elaboración del sustrato sintético para una relación C:N= 20

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Biomasa inoculada

Para el arranque del reactor, se inoculó el reactor con lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales San Pedrito en el municipio de Pátzcuaro, Michoacán, la cual cuenta con una capacidad de 70 L/s dividido en dos reactores para su tratamiento. San Pedrito trabaja bajo un esquema tradicional basado en un sistema de lodos activados donde la aireación del *reactor biológico uno* es suministrada por medio de soplores superficiales de 100HP y la aireación del *reactor biológico dos* es suministrada por medio de 1000 difusores de burbuja fina.



**Figura 4.5** Planta de tratamiento de agua residual "San Pedrito", Pátzcuaro, Michoacán.

Se tomaron muestras del influente (canal Parshall) y efluente (sedimentador secundario) del *reactor biológico dos* para analizar las condiciones operacionales y eficiencia del biorreactor. En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de los análisis realizados a las muestras tomadas en ambos puntos.

**Tabla 4-3** Parámetros de calidad del reactor biológico 2 de la PTAR "San Pedrito" perteneciente al municipio de Pátzcuaro, Michoacán.

Punto de muestreo	SST	SSV	SSF	SSV/SST	DQO	DQO sol
	mg/L	mg/L	mg/L	mgSSV/SST	mgDQO/L	mgDQO/L
Influente	170	140	30	0.82	559	199
Efluente	0	0	0	-	39	23



**Figura 4-6** a). Muestras tomadas del influente del reactor b) Muestras tomadas del efluente del reactor de la PTAR “San Pedrito”, Pátzcuaro, Michoacán.



**Figura 4-7** a). Influyente del reactor (Canal Parshall) b). Efluente del reactor (Sedimentador secundario) de la PTAR “San Pedrito”, Pátzcuaro, Michoacán.

Los lodos para la inoculación de la biomasa se tomaron de la salida del reactor biológico 2, de los cuáles se utilizaron 70 L para el llenado del reactor.



**Figura 4-8** a). Reactor biológico dos de la PTAR “San Pedrito”, Pátzcuaro, Michoacán. b). Toma muestra de lodos del reactor biológico



**Figura 4-9** Inoculación de lodo proveniente de la PTAR “San Pedrito”, Pátzcuaro, Michoacán

#### **4.2.2 Crecimiento de la biomasa**

Las condiciones de arranque de la suspensión biológica en el reactor se muestran en la Tabla 4-4. Esta etapa consistía en favorecer las condiciones para que el inóculo alcanzara la concentración necesaria en términos de SSV (4,000 mg SSV/L), según el diseño experimental. El reactor se alimentó de forma continua con un sustrato sintético con una relación de nutrientes de 150:15:1 (C:N:P) (Anexo 1). El sustrato se almacenó en un contenedor de 200L y fue suministrado al reactor por medio de una de una bomba peristáltica (Watson Marlow ®Modelo323). La extracción del permeado del BRM se realizó por medio de una bomba peristáltica (Watson Marlow ®Modelo323) donde se almacenó en un contenedor de 200 L para su posterior análisis. La velocidad de las bombas se ajustó mediante una serie de pruebas volumétricas para obtener un flujo de 0.92 L/h.



**Figura 4-3** BRM en etapa de crecimiento de biomasa

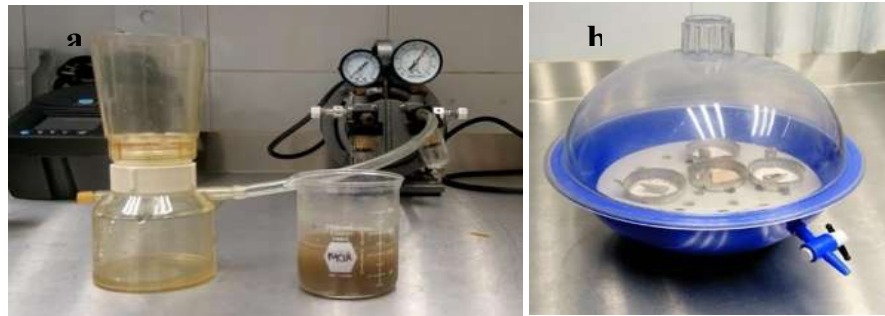
**Tabla 4-4** Concentraciones de sólidos y DQO del reactor al inicio de operación del reactor

<b>Punto de muestreo</b>	<b>SST</b> mg/L	<b>SSV</b> mg/L	<b>SSF</b> mg/L	<b>SSV/SSF</b> mgSSV/SSF	<b>DQO</b> mgDQO/L	<b>DQO sol</b> mgDQO/L
Reactor	3825	2800	1025	0.73	4020	99

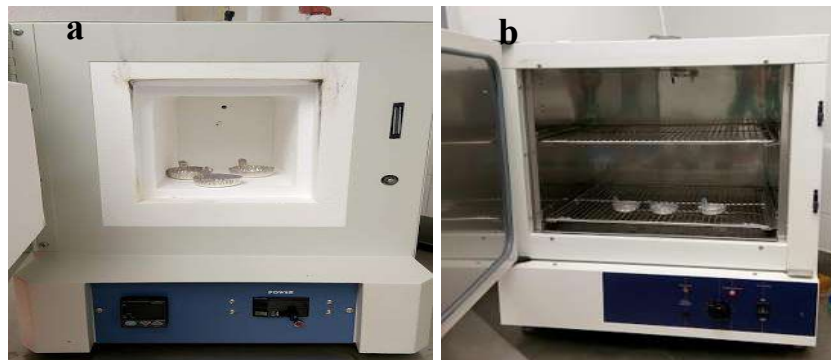
**Tabla 4-5** Equipos utilizados para el monitoreo de la operación del reactor

<b>Parámetro</b>	<b>Equipo</b>
pH	Thermo Siencitific Orion Star A223
Temperatura	Thermo Siencitific Orion Star A223/ HACH Portable MultiMeter HQ30D
Oxígeno disuelto	HACH Portable MultiMeter HQ30D

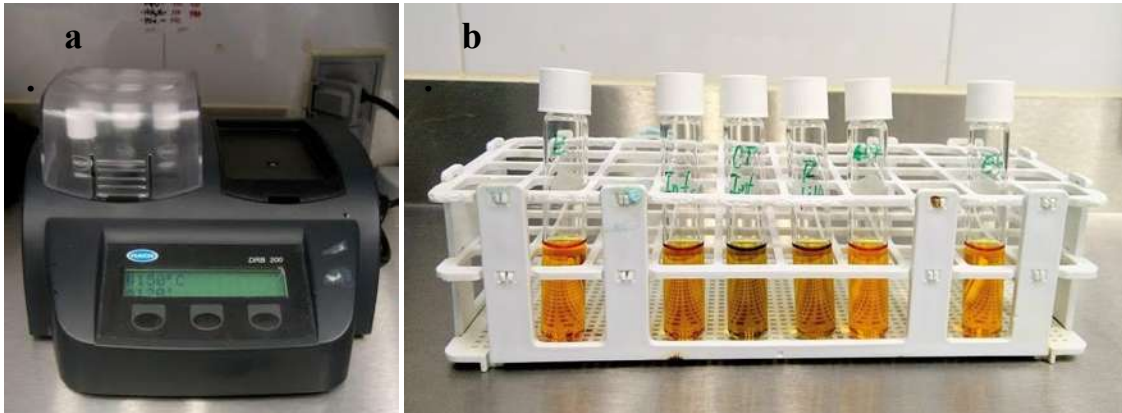
Durante esta etapa se realizó diariamente el seguimiento del pH del reactor y sustrato, temperatura, nivel de oxígeno disuelto y flujos del reactor. Adicionalmente se realizó el análisis de calidad de agua (DQO, N-NO<sub>3</sub>, NT, SST, etc.).



**Figura 4-5** a. Proceso de filtración de las muestras para prueba de sólidos b. Muestras en el desecador para prueba de sólidos



**Figura 4-4** a. Muestras de sólidos en la mufla para prueba de sólidos b. Muestra de sólidos en el horno para prueba de sólidos



**Figura 4-6** a. Viales de DQO en digestión b. Viales de DQO

### 4.2.3 Etapa de adaptación y estabilización

El reactor se alimentó con un sustrato sintético con una relación C:N de 20 y 25 (Anexo 1). Para la primera condición experimental el sistema se mantuvo en periodo de adaptación de 57 días y para la relación C:N de 25 la etapa de adaptación tuvo una duración de 52 días. Una vez concluidas las etapas de adaptación se observó claramente que los parámetros fisicoquímicos del reactor permanecieron constantes, indicio de la estabilización del biorreactor. Para la verificación de la estabilización del reactor se realizó un análisis de regresión lineal de la concentración de DQO y  $\text{NH}_3$  del efluente y se aceptó el inicio de la etapa si la regresión no resulta significativa (pendiente=0,  $p>0.05$ ), para un periodo de tres TRH.

Los parámetros fisicoquímicos y las variables de respuestas se verificaron en diferentes intervalos de tiempo en la fase de adaptación y fase estable. Adicionalmente a estos parámetros, se realizaron las mediciones diarias de temperatura, pH y conductividad en las tres secciones que conforman el sistema (influyente, reactor, efluente). De la misma manera, se supervisó la concentración de oxígeno disuelto en el reactor y los flujos de entrada y salida del reactor, las técnicas y los equipos empleados para el análisis de los parámetros de seguimiento del reactor se presentan en la Tabla 4-6.

**Tabla 4-6** Métodos y equipos empleados para el análisis de los parámetros fisicoquímicos del reactor

<b>Parámetro</b>	<b>Métodos</b>	<b>Equipo (s)</b>
Temperatura	Inmersión	Thermo Siencitific Orion Star A223/ HACH Portable MultiMeter HQ30D
pH	Potenciométrico	Thermo Siencitific Orion Star A223
Oxígeno disuelto	Electrométrico	HACH Portable MultiMeter HQ30D
DQO	Digestión por reactor, método HACH 8000	Reactor digital Hach DRB200
N-NH <sub>3</sub>	Método de Salicilato HACH (8155 y 10031)	Reactor digital Hach DRB200
N-NO <sub>3</sub>	Método 8039R/8171R de Hach. (Reducción con cadmio)	Reactor digital Hach DRB200
NT	Método 10072 de Hach. (Digestión por persulfato)	Reactor digital Hach DRB200
P-PO <sub>4</sub>	Método 8048 de Hach. (Ácido ascórbico)	Reactor digital Hach DRB200

#### 4.2.4 Extracción de PHA

Una vez obtenida la estabilización del sistema se realizaron las extracciones del polímero por gravimetría para determinar la producción de los polímeros. La recuperación del polímero mediante ruptura de las células usando hipoclorito de sodio, seguido de la centrifugación de la biomasa. Finalmente, los residuos precipitados se disuelven en cloroformo y se filtran para eliminar los restos de células, obteniendo el polímero por evaporación del disolvente: esta técnica (Anexo 2) fue descrita por Malagón y Acosta (2008).

#### 4.2.5 Análisis estadístico

Habiendo verificado que los parámetros fisicoquímicos se mantuvieran en el rango deseado, se realizó un análisis discriminante canónico con los valores experimentales de TRC, pH, conductividad y temperatura, así como las condiciones de DQO en el influente y DQO y nitrógeno amoniacal en el efluente. Los porcentajes de remoción de DQO y nitrógeno amoniacal se obtuvieron a partir de los valores promedio en el influente y efluente de DQO y nitrógeno amoniacal durante el periodo estable de cada corrida experimental.

Con el fin de describir el desarrollo metabólico de los microorganismos en función del sustrato, se obtuvieron los coeficientes cinéticos para tasa de utilización (Ec. 1) y la tasa de producción de biomasa (Ec. 2), así como el coeficiente estequiométrico de rendimiento (Y) en el BRM y la fracción de biomasa respecto a los sólidos suspendidos totales (SSV/SST). Los cálculos se realizaron mediante las siguientes ecuaciones:

$$r_s = \frac{QS_i - QS_e}{V} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

$r_s$ : Tasa de utilización de sustrato ( $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}\cdot\text{d}$ )

Q: Flujo (L/d)

$S_i$ : Concentración de sustrato en el influente ( $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ )

$S_e$ : Concentración de sustrato en el efluente ( $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ )

V: Volumen (L)

$$r_x = \frac{X - X_0}{t} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

$r_x$ : Tasa de producción de biomasa ( $\text{g}/\text{L}\cdot\text{d}$ )

X: Concentración de biomasa en la purga ( $\text{g}/\text{L}$ )

$X_0$ : Concentración de biomasa posterior a la purga ( $\text{g}/\text{L}$ )

t: tiempo transcurrido entre cada purga (d)

El coeficiente estequiométrico Y (Ec. 3) se calculó como el coeficiente de la tasa de remoción de sustrato y la tasa de producción de biomasa.

$$Y = \frac{r_x}{r_s} \quad \text{Ec. (3)}$$

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

$$Y_{PHA/SSV} = \frac{g_{PHA}}{g_{SSV}} * 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde:

$Y_{PHA/SSV}$ : Rendimiento de almacenamiento para PHA (%)

$g_{PHA}$ : Masa de PHA en base seca (g)

$g_{SSV}$ : Masa de la biomasa en base seca (g)

Con el fin de determinar las variables de mayor influencia sobre la acumulación de PHA, los datos de las variables de seguimiento del reactor se sometieron a un análisis multivariado.

#### 4.2.6 Caracterización de PHA

La caracterización y análisis de las muestras obtenidas se realizó en el departamento de Ingeniería Química de la facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Laval con el fin de conocer las propiedades químicas de las muestras. Las técnicas de caracterización más destacadas para el análisis de PHA que señala la literatura son: método termogravimétrico, calorimetría de barrido y espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (Höfer, 2011; Chen, 2014; Rojas fernández, 2016).

Para conocer la temperatura de fusión y los cambios de peso del material en función de la temperatura se realizó el análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras. El ensayo se llevó a cabo en el equipo TGA Q5000 V3.17 Build 265 (Anexo 3), para la muestra obtenida con una relación de C/N de 20 se emplearon 5.15 mg y para la muestra obtenida a partir de una relación C/N de 25 se necesitaron 8.15 mg, para luego ser sometidas a un barrido de temperatura de 0°C hasta 800°C. El equilibrio térmico se ve afectado resultando una serie de cambios (físicos y químicos) provocando la liberación o absorción de energía en forma de calor, estos datos se representan de manera gráfica.



**Figura 4-7** TGA Q5000 modelo V3.17 Build 265

Para determinar el tipo de polímero obtenido se realizó la técnica de espectroscopía infrarroja, la cual nos permite el análisis de las vibraciones de los enlaces presentes en las moléculas de los PHA obtenidos a partir de diferentes relaciones de nutrientes dando como resultado la identificación de los grupos funcionales presentes en los polímeros. Los enlaces químicos de cada biopolímero se identificaron en base a sus bandas características. Para la técnica de FTIR El equipo utilizado fue un espectrofotómetro de FTIR marca Shimadzu, modelo IRAffinity 1S (Anexo 3) con un rango de espectro de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4-8** FTIR IRAffinity -1S

Para la determinación de las propiedades térmicas se utilizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido ya que los PHA son polímeros parcialmente cristalinos y la definición de sus propiedades térmicas y mecánicas se expresa en términos de las temperaturas de la fase amorfa y de la temperatura de fusión de la fase cristalina ( Meza *et al.*, 2013). Se estableció la temperatura de fusión y transición vítrea mediante el uso de un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer Modelo DSC-7 (Anexo 3), con una rampa de calentamiento de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $800^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4-9** DSC Perkin Elmer

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Parámetros fisicoquímicos

Durante la operación del reactor no se tuvo control de la temperatura, se alcanzaron temperaturas de 15° a 20°C, siendo 18.4°C la media en la etapa estabilizada. La concentración de oxígeno disuelto durante todo el proceso fue mayor a 2 mgO<sub>2</sub>/L, con un valor promedio de 5.9 mgO<sub>2</sub>/L. De la misma manera, la carga orgánica durante la operación del reactor fue de 0.1 g DQO/ g<sub>SSV</sub>·d en todo momento. El pH se controló resultando en una variación de 7 a 7.8, teniendo como media 7.5 en las etapas de estabilización de ambas condiciones experimentales (Figura 5-1).

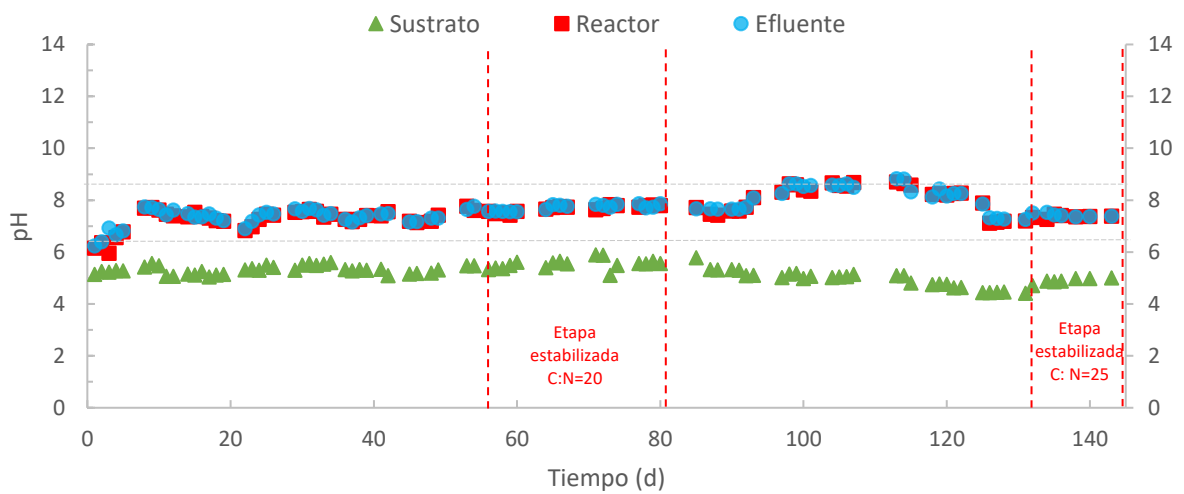


Figura 5-1 pH del influente, reactor y efluente durante la operación del reactor

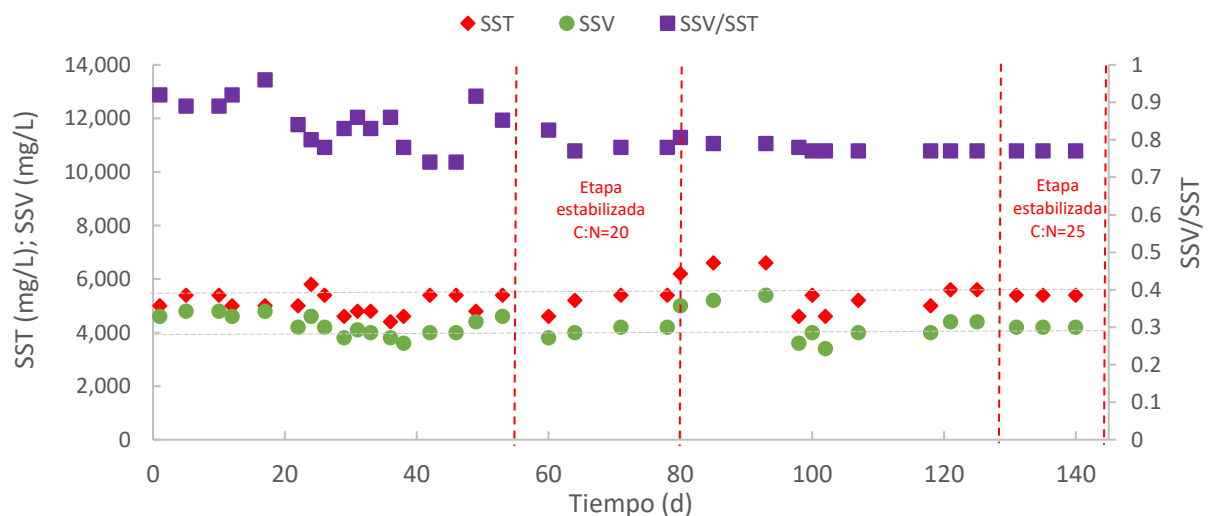


Figura 5-2 Concentración de SST, SSV y SSV/SST en el reactor durante la operación del reactor

La concentración de sólidos en el reactor de muestra en la Figura 5-2, observando una concentración media de SST de 5,150 y 5.400 mg/L para la primera y segunda condición experimental respectivamente. La concentración media de SSV para la etapa estabilizada durante la relación C:N 20 fue de 4,050 mg/L y para la relación C:N fue de 4,200 mg/L, en este sentido la relación SSV/SST para ambas condiciones fue de 0.8.

## 5.2 Eficiencia de tratamiento

Los valores promedios obtenidos durante las etapas de estabilización se muestran en la Tabla 5-1, permitiéndonos realizar un análisis sobre la eficiencia del proceso biológico para el tratamiento de agua. Para la primera condición de operación, se logró la estabilización a partir del día 57, durante los siguientes 23 días se registró una DQO promedio en el efluente de 10 mg/L, en contraste con la DQO del influente (1377 mg/L), representando una remoción del  $99.3 \pm 0.17\%$ .

Para la segunda condición experimental la DQO el influente se mantuvo acorde al diseño experimental (1450 mg/L) y durante el periodo estable se alcanzó un porcentaje de remoción de materia orgánica del  $99.7 \pm 0.47\%$  con un valor promedio de DQO en el efluente de 3 mg/L.

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

Se evaluó la remoción de nitrógeno amoniacal, mediante el monitoreo de la concentración de nitrógeno amoniacal en el influente y en el agua tratada, obteniendo una cantidad de 0.9 mg/L y 1 mg/L en el efluente durante la etapa estabilizada, logrando una eficiencia de remoción de 98.7% y 98.3% durante la primera y segunda condición experimental respectivamente.

En ambos tratamientos, se observó una eficiencia de remoción superior al 98%, Por otro lado, uno de los inconvenientes más notables que se presentan al trabajar en condiciones de limitación de nutrientes, es que, al estar bajo condiciones de estrés, el desarrollo de la biomasa puede verse afectado y, en consecuencia, la eficiencia del tratamiento. En este sentido según los parámetros cinéticos obtenidos se observa un crecimiento lento o nulo de la biomasa, sin embargo, no se ve un impacto negativo en la calidad del efluente.

**Tabla 5-1** Concentraciones de DQO, N-NH<sub>3</sub>, N-NO<sub>3</sub> y P-PO<sub>4</sub>

Parámetro	Unidades	Influyente	Efluente	Influyente	Efluente
C: N (teórica)	-	20		25	
C:N (experimental)	-	20.1±1.92		25.8±1.31	
DQO	mg <sub>DQO</sub> /L	1377 ± 0.07	10±1.24	1450±0.04	3±1.61
N-NH <sub>3</sub>	mg <sub>N-NH<sub>3</sub></sub> /L	70±0.04	0.9±0.03	60±0.01	1±0.01
N-NO <sub>3</sub>	mg <sub>NO<sub>3</sub></sub> /L	24±0.32	85±0.10	44±1.7	93±0.99
P-PO <sub>4</sub>	mg <sub>PO<sub>4</sub></sub> /L	158±0.11	138±0.06	22±2.29	36±3.25

### 5.3 Actividad bacteriana

Los coeficientes cinéticos y estequiométricos resultantes para las dos condiciones experimentales se muestran en la Tabla 5-2. Durante la etapa de experimentación donde se utilizó una relación C:N de 20 se registró la mayor tasa de producción de biomasa ( $r_x$ ) y la menor tasa de utilización de sustrato ( $r_s$ ). Por el contrario, para la relación C/N de 25 se obtuvo una tasa de producción de biomasa mayor y un aprovechamiento de sustrato mayor. Los valores bajos para la tasa de producción de biomasa se atribuyen a que los microorganismos utilizan el sustrato suministrado como fuente de energía para el mantenimiento celular y no para la generación de nuevo material celular, favoreciendo a la acumulación interna de subproductos como los PHA, en resumen, se observa que aunque el aprovechamiento de sustrato es similar para las dos condiciones no se ve reflejado en la generación de biomasa, para la relación C:N de 20 hubo una mayor producción de biomasa que para la relación C:N de 25 lo que sugiere que hubo un menor rendimiento en los subproductos celulares y que en la segunda condición hay una mayor generación de los mismos.

Las tasas de producción de biomasa confirman que el desarrollo de la biomasa se ve afectado por la limitación de nutrientes, ya que el N es necesario para el desarrollo y crecimiento de la biomasa, no obstante, como se mencionó en el capítulo anterior esto no afectó la eficiencia de tratamiento del reactor.

**Tabla 5-2** Coeficientes cinéticos y estequiométricos durante la operación del reactor

Condición experimental	$r_x$ ( $gL^{-1}d^{-1}$ )	$r_s$ ( $gL^{-1}d^{-1}$ )	Y ( $gSSV^{-1}gDQO^{-1}$ )
C/N= 20	0.09	0.42	0.2143
C/N= 25	0.03	0.45	0.0667

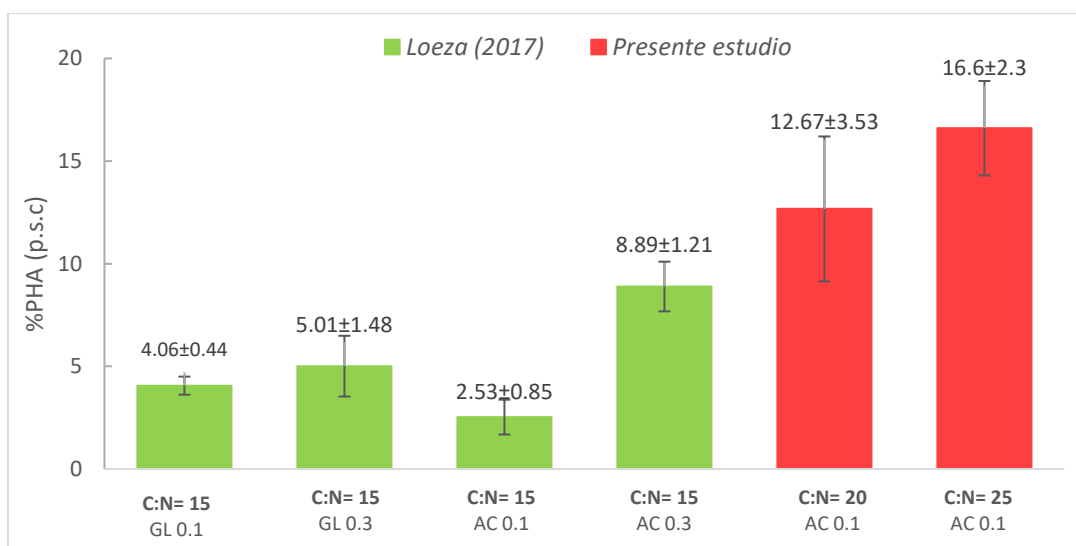
## 5.4 Cuantificación de PHA

El coeficiente de almacenamiento mayor ( $16.61 \pm 2.3\%$  p.s.c.) se logró con la condición bajo la cual el nitrógeno se encuentra en mayor limitación ( $C/N = 25$ ), mientras que para la segunda condición alcanzó un coeficiente de almacenamiento promedio de ( $12.67 \pm 3.53\%$ ), Estos resultados se sometieron a un análisis de varianza del cual se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos. De la misma manera los resultados coinciden con los resultados de los coeficientes cinéticos de crecimiento bacteriano y asimilación de sustrato mencionados en el apartado previo.



**Figura 5-3** PHA extraído en el presente estudio bajo una relación C:N de 20

Ambos rendimientos son mayores que los alcanzados por Loeza (2017) quien se enfocó en la producción de PHA en un sistema BRM bajo distintas cargas orgánicas y bajo una relación de nutrientes C:N de 15, con ello se puede observar que la limitación de nutrientes sugiere una mayor acumulación de polímero y que es una estrategia para la optimización en la producción (Figura 5-4). Mediante el control de la relación C:N en un proceso de PTAR (Kumar, 2004) alcanzó 7% de PHB para 24 (C:N) siendo menores que los obtenidos en este trabajo.



**Figura 5-4** Peso seco celular de PHA obtenido por Loeza (2017) y PHA obtenido en el presente estudio (2019) en un sistema BRM

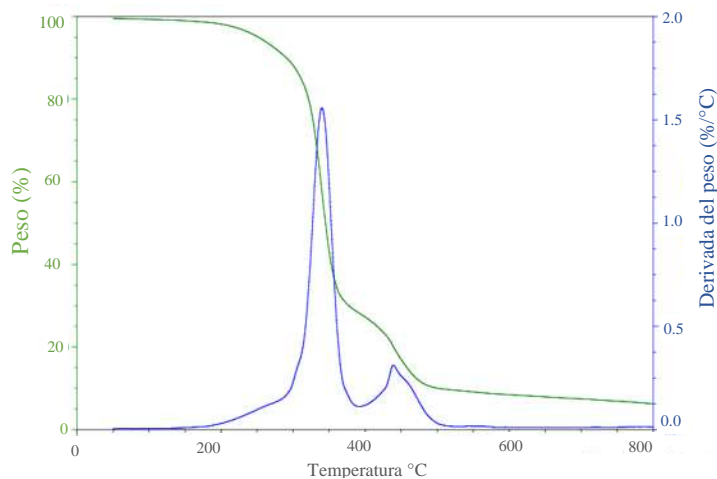
En contraste con los resultados obtenidos por Venkateswar *et al.* (2014), determinaron el rendimiento de PHAs producido por un cultivo mixto de biomasa en suspensión bajo condiciones aerobias ( $OD=3.1$  mg/L) alimentado con agua residual sintética a base de glucosa, alcanzando un rendimiento de 28% p.s.c., sin embargo, a diferencia del presente estudio cuya relación C:N se mantuvo en 30:2, en aquel diseño de agua residual se limitó el nitrógeno a una proporción C:N = 30:1, lo cual pudo generar un mayor grado de estrés nutricional sobre el cultivo microbiano, traduciéndose en un mayor potencial de acumulación.

## 5.5 Caracterización

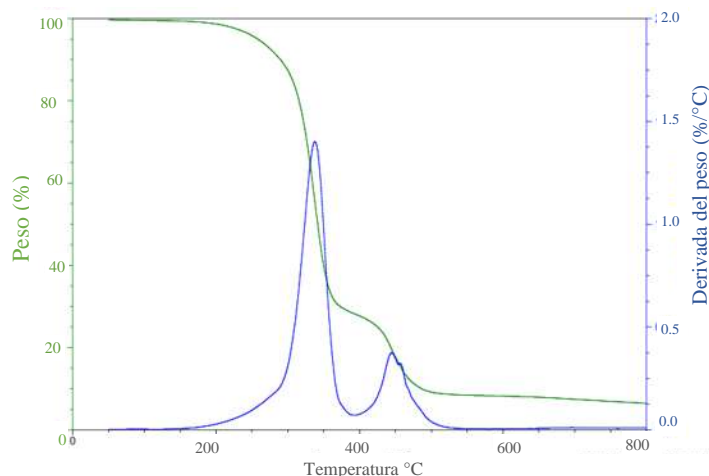
Los termogramas obtenidos mediante la técnica de TGA muestra que los polímeros extraídos mostraron grandes similitudes, degradándose cerca de los 350°C indicando una buena estabilidad térmica, lo que sugiere que el PHA producido en el BRM corresponde a un polímero termoplástico cristalino.

Se observa que ambas muestras se degradan en dos etapas, siendo térmicamente estables hasta los 250°C con pérdidas de peso menores al 2%. La mayor disminución del peso molecular se observó en la segunda etapa aproximadamente en los 375°C con una pérdida de peso del 70%, atribuible al proceso de carbonización de los compuestos hidrocarbonados. Los residuos (5%) al final del termograma representan los óxidos metálicos y las cenizas de las sales inorgánicas.

Resultados similares se encuentran en la literatura donde los análisis señalan dos etapas de degradación y donde la temperatura de descomposición de los PHB se encuentra entre 250 y 277°C. Este tipo de degradación térmica en dos etapas ha sido reportado por Höfer, Vermette, y Groleau (2011a), Surface (2017) y López (2011) para PHA de cadena media y cadena larga.

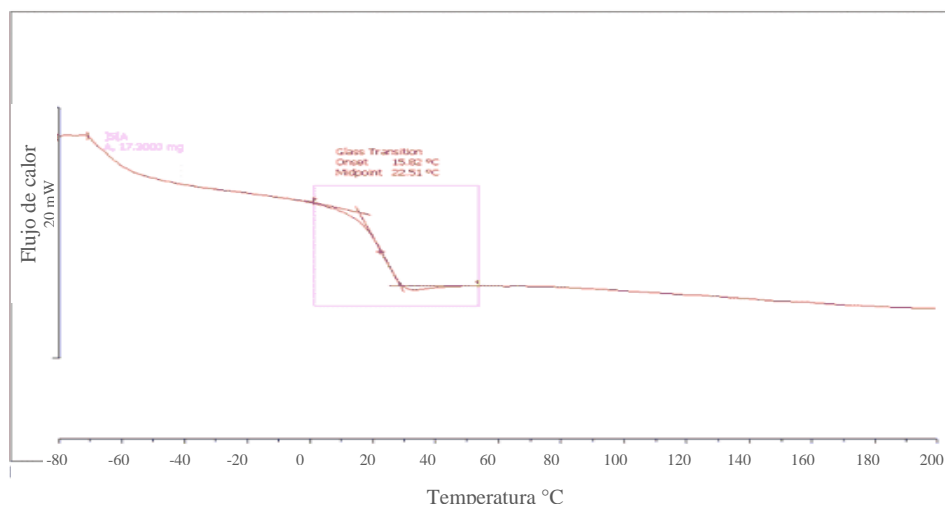


**Figura 5-5** Curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de la muestra obtenida bajo una relación C:N=20

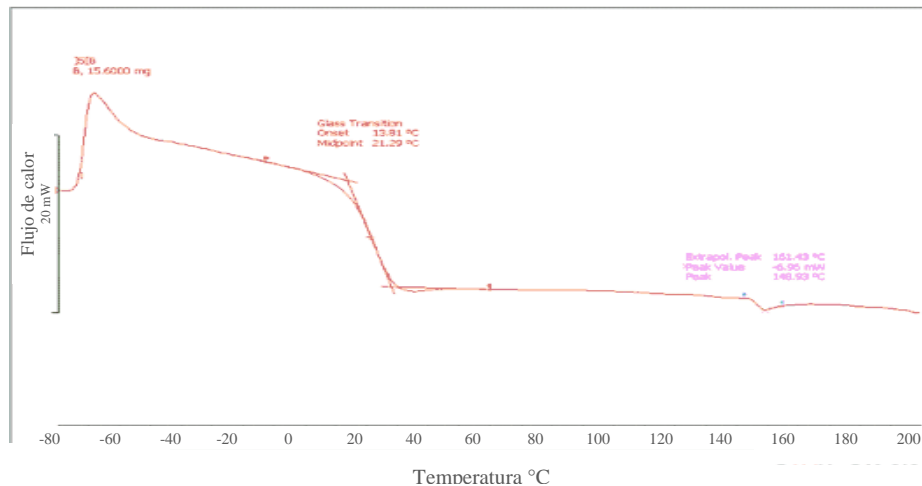


**Figura 5-6** Curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de la muestra obtenida bajo una relación C:N=25

Los resultados de la calorimetría diferencial de barrido se muestran en las Figuras 5-5 y 5-6. Las muestras obtenidas bajo una relación C:N=20 y C:N=25 presenta una temperatura de transición vítrea alrededor de los 15°C, mientras que la muestra B es de 14°C. Las muestras mostraron una temperatura de fusión y un grado de cristalinidad menor a la reportado por otros autores que reportan resultados atribuidos a muestras de PHA. Sin embargo, (Ashori, Jonoobi, Ayrilmis, Shahreki, & Arab, 2019) presentan en su trabajo una gráfica correspondiente a un PHBV similar con las características obtenidas en este trabajo.



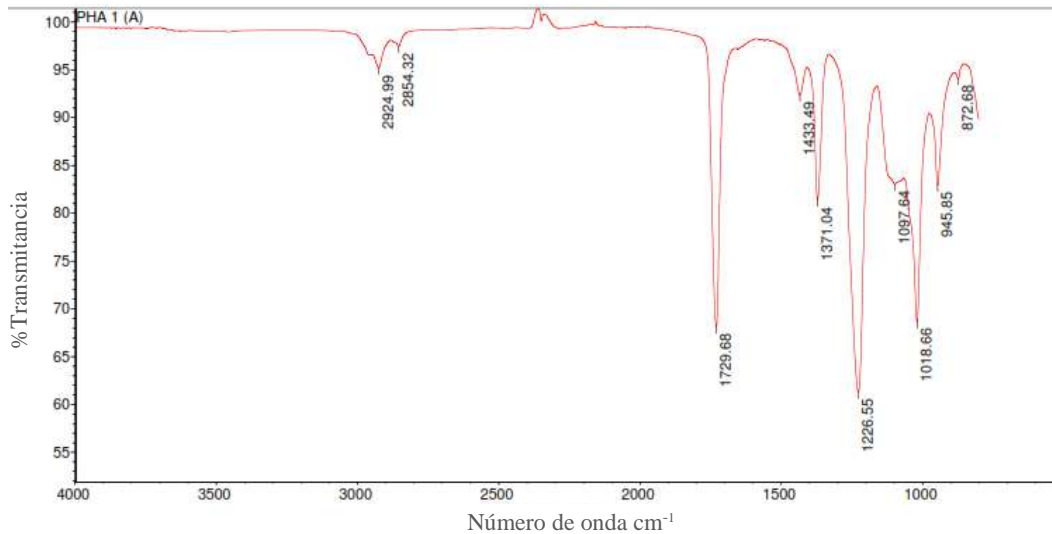
**Figura 5-7** Curva del análisis DSC del polímero obtenido bajo una relación C:N=20



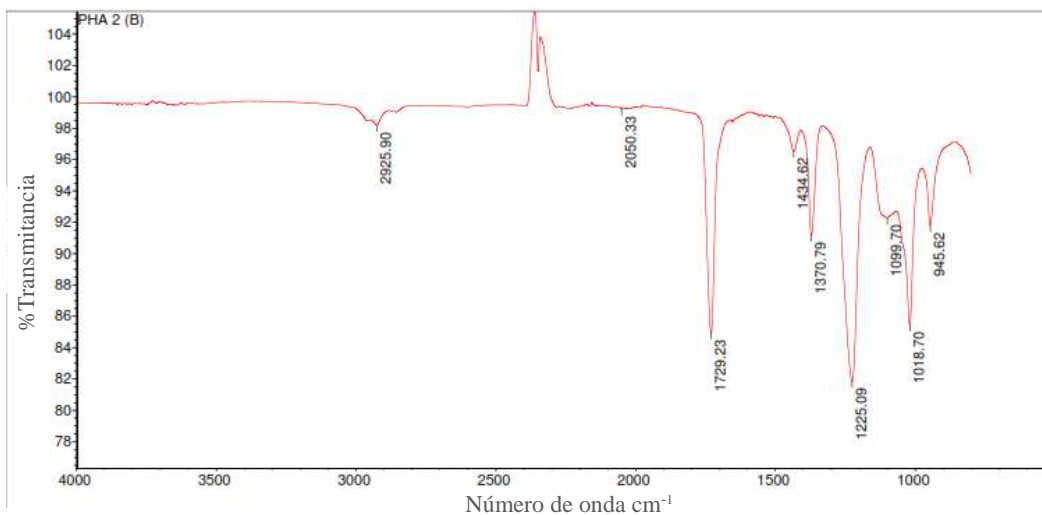
**Figura 5-8** Curva del análisis DSC del polímero obtenido bajo una relación C:N=25

Se caracterizaron por FTIR las muestras de polímero con el fin de analizar su naturaleza a través de los grupos funcionales presentes en su estructura. Las bandas típicas del metilo ( $\text{CH}_3$ ) y metileno ( $\text{CH}_2$ ) en el PHA extraído se pueden detectar en región  $3000\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ . Se observa un pico de absorción alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del grupo asimétrico del metilo ( $\text{CH}_3$ ). Se ha reportado que la presencia de  $\text{CH}_3$  asimétrico puede producir la unión C-H-O, es decir, de puentes de hidrógeno. Por otra parte, el estiramiento en la región  $2900\text{ cm}^{-1}$  implica la formación de interacciones entre  $\text{CH}_3$  y el grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ). El pico de absorción en  $2900\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del  $\text{CH}_2$  asimétrico y estos grupos funcionales son los principales responsables de las cadenas laterales de las unidades monoméricas. El pico en  $2800\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento del  $\text{CH}_3$  simétrico y la fuerza de este pico se correlaciona con el cambio que se genera en el proceso de cristalización.

Los espectros FTIR coinciden con los reportados para PHB por distintos autores Song, Jeon, Kim y Kyung (2017), Rojas fernández *et al.* (2016), Höfer *et al.*, (2011) y Hernández (2005).



**Figura 5-9** Espectro de infrarrojo para un polímero obtenido bajo una relación C:N=20



**Figura 5-10** Espectro de infrarrojo para un polímero obtenido bajo una relación C:N=25

La caracterización del material permitió confirmar que el material obtenido es PHB en vista a las coincidencias en los termogramas, lo que se corrobora con los espectros de distintos autores que muestran en sus trabajos las bandas características de los PHB, uno de los tipos más conocidos de PHA. Se ha demostrado que la producción de PHA es reproducible y consistente dentro de un proceso de tratamiento de agua residual a partir de un sistema BRM alimentado con un sustrato fácilmente biodegradable, gracias a la capacidad de almacenamiento de la biomasa presente en el proceso y el sustrato del que se alimentan sin interferir su eficiencia.

## 6 Conclusiones

- El rendimiento celular de polihidroxicanoatos es mayor al aumentar la relación de nutrientes (C:N), en un sistema BRM operado en continuo por lo que se concluye que la limitación de nitrógeno es una estrategia de almacenamiento de polímero.
- Al limitar la disponibilidad de la fuente de nitrógeno en el medio, los coeficientes cinéticos de la biomasa señalan que el crecimiento celular se ve afectado debido a la limitación del nitrógeno, fuente esencial para el desarrollo y generación de nuevo material celular. Por el contrario, esto favorece a la acumulación de subproductos internos que sirven como fuente de energía para el mantenimiento celular como los PHA.
- Se registró una eficiencia de remoción promedio de DQO del 99% en la fase estable, lo que revela un sistema de tratamiento de alta eficiencia en cuanto a la remoción de materia orgánica, esperado para un sistema BRM. Las remociones de nitrógeno amoniacal superan el 98% para ambas condiciones experimentales, constatando la alta efectividad de remoción de contaminantes de los sistemas BRM
- La caracterización del material polimérico mediante DSC, TGA y FTIR permiten concluir que el material polímero obtenido durante un proceso de tratamiento de agua residual es poli-β-hidroxibutirato (PHB).
- Mediante las técnicas de caracterización se observa que las muestras de polímero obtenidas bajo diferentes condiciones de C/N se mantienen homogéneas y constantes en sus propiedades químicas, por lo que se concluye que la diferencia de nutrientes en el proceso de producción no tiene afectaciones en su composición y que la producción de PHA a través de un CMM es uniforme.

## 7 Referencias

- Alsafadi, D., & Al-Mashaqbeh, O. (2017).** "A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*". *New Biotechnology*, 34, 47–53.
- Álvarez-da Silva, L. (2016).** "Bióplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos", 38.
- Andler, R., & Díaz-Barrera, A. (2013).** "Technological and market aspects of microbial bioplastics production". *Ingenerare* 27, 29–36.
- Arcos-Hernandez, M. V., Laycock, B., Pratt, S., Donose, B. C., Nikolič, M. A. L., Luckman, P., ... Lant, P. A. (2012).** Biodegradation in a soil environment of activated sludge derived polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polymer Degradation and Stability*, 97(11), 2301–2312.
- Ashori, A., Jonoobi, M., Ayirmis, N., Shahreki, A., & Arab, M. (2019).** Preparation and characterization of polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) as green composites using nano reinforcements Alireza. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1119–1124.
- Bengtsson, S., Karlsson, A., Alexandersson, T., Quadri, L., Hjort, M., Johansson, P., ... Werker, A. (2017).** A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnology*, 35, 42–53.
- Cavaillé, L., Albuquerque, M., Grousseau, E., & Lepeuple, A. (2016).** Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth

conditions in non-axenic continuous culture. *Bioresource Technology Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture*, 201, 65–73.

**Cha, S. H., Son, J. H., Jamal, Y., Zafar, M., & Park, H. S. (2016).** Characterization of polyhydroxyalkanoates extracted from wastewater sludge under different environmental conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 1–12.

**Chaleomrum, N., Chookietwattana, K., & Dararat, S. (2014).** Production of PHA from Cassava Starch Wastewater in Sequencing Batch Reactor Treatment System. *APCBEE Procedia*, 8(Caas 2013), 167–172.

**Chanprateep, S. (2010).** Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.

**Chen, Y. J., Huang, Y. C., & Lee, C. Y. (2014).** Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), 145–152.

**Chen, Z., Guo, Z., Wen, Q., Huang, L., Bakke, R., & Du, M. (2016).** Modeling polyhydroxyalkanoate (PHA) production in a newly developed aerobic dynamic discharge (ADD) culture enrichment process. *Chemical Engineering Journal*, 298, 36–43.

**Delgado, A. C. L., & Cordoba, A. M. (2015).** Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Revista Informador Técnico*, 79(1), 83–101.

**Fraga, F. A., García, H. A., Hooijmans, C. M., Míguez, D., & Brdjanovic, D. (2017).** Evaluation of a membrane bioreactor on dairy wastewater treatment and reuse in

Uruguay. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 552–564.

**García, Y. G., Carlos, J., Contreras, M., Reynoso, O. G., & Córdova, A. (2013).** Síntesis y Biodegradación de Polihidroxiálcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (1), 77–115.

**Gobi, K., & Vadivelu, V. M. (2013).** By-products of palm oil mill effluent treatment plant - A step towards sustainability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 788–803.

**Höfer, P., Vermette, P., & Groleau, D. (2011).** Production and characterization of polyhydroxyálcanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*: Combining desirable thermal properties with functionality. *Biochemical Engineering Journal*, 54(1), 26–33

**Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., van Loosdrecht, M. C. M., Dijkman, H., & Kleerebezem, R. (2012).** Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Research*, 46(17), 5517–5530.

**Jiménez, L. A. (2011).** Biopolímeros de interés industrial. síntesis y caracterización de phb.

**Johnson, K., Kleerebezem, R., & Loosdrecht, M. C. M. Van. (2010).** Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs, 44, 2141–2152.

**Koller, M., Miranda, M., Dias, D. S., & Braunegg, G. (2017).** Producing microbial polyhydroxyálcanoate ( PHA ) biopolyesters in a sustainable manner, 37, 24–38.

**Kourmentza, C., Ntaikou, I., Lyberatos, G., & Kornaros, M. (2015).** Polyhydroxyálcanoates from *Pseudomonas* sp. using synthetic and olive mill

wastewater under limiting conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 202–210.

**Kumar, M. S. (2004).** Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant, 95, 327–330.

**Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2014).** The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 39(2), 397–442.

**Loeza, D. I. (2017).** Producción de bioplásticos integrada a un tratamiento de aguas residuales en un biorreactor con membranas sumergidas, 1–119.

**Marcela, B., Armando, E. H., Dionisio, M. R., & Nubia, M. S. (2005).** Producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato ( PHB ) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697, 10(1), 45–54.

**Montiel-Jarillo, G. of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: E. of pH and N. and P. concentrations, Carrera, J., & Suárez-Ojeda, M. E. (2017).** Enrichment of a mixed microbial culture for polyhydroxyalkanoates production: Effect of pH and N and P concentrations. *Science of the Total Environment*, 583, 300–307.

**Moser, P. B., Ricci, B. C., Reis, B. G., Neta, L. S. F., Cerqueira, A. C., & Amaral, M. C. S. (2018).** Effect of MBR-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV Hybrid pre-treatment on nanofiltration performance for the treatment of petroleum refinery wastewater. *Separation and Purification Technology*, 192, 176–184.

**Mozejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016).** Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192(2016), 271–282.

**Yolanda González García , Juan Carlos Meza Contreras , Orfil González Reynoso y**

**Jesús Antonio Córdova López. (2013)** Revisión síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos : plásticos de origen microbiano.

**Rojas fernández, E., Hoyos Concha, J. L., & Mosquera Sánchez, S. A. (2016).** Producción de polihidroxialcanoatos(PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 19.

**Serafim, S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004).** Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions.

**Song, H., Jeon, J., Kim, J., & Kyung, Y. (2017).** Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates copolymer from Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620. *International Journal of Biological Macromolecules*.

**Surface, R. (2017).** A Statistical approach to optimize the production of Polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, (October).

**Van Der Hoek, J. P., De Fooij, H., & Struker, A. (2016).** Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam's wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, 113, 53–64.

**Venkateswar Reddy, M., Amulya, K., Rohit, M. V., Sarma, P. N., & Venkata Mohan, S. (2014).** Valorization of fatty acid waste for bioplastics production using *Bacillus tequilensis*: Integration with dark-fermentative hydrogen production process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7616–7626.

## Anexo 1

### DISEÑO SUSTRATO SINTÉTICO

<b>Diseño</b>			<b>Diseño</b>		
DQO teórica:	1268	mg · L <sup>-1</sup>	DQO teórica:	1268	mg · L <sup>-1</sup>
C.O. teórica:	0.1		C.O. teórica:	0.1	
C:N:P:	150:15:01		C:N:P:	150:15:01	
<b>Aportación química</b>			<b>Aportación química</b>		
DQO:	1268	mg · L <sup>-1</sup>	DQO:	1268	mg · L <sup>-1</sup>
N-NH <sub>3</sub> :	63.400	mg · L <sup>-1</sup>	N-NH <sub>3</sub> :	50.720	mg · L <sup>-1</sup>
P-PO <sub>4</sub> :	8.453	mg · L <sup>-1</sup>	P-PO <sub>4</sub> :	8.453	mg · L <sup>-1</sup>
<b>Adición de reactivos</b>			<b>Adición de reactivos</b>		
<b>Fuente de carbono</b>			<b>Fuente de carbono</b>		
CH <sub>3</sub> COOH:	1352.66	mg · L <sup>-1</sup>	CH <sub>3</sub> COOH:	1352.66	mg · L <sup>-1</sup>
Densidad:	1.05	kg · L <sup>-1</sup>	Densidad:	1.05	kg · L <sup>-1</sup>
Pureza:	85	%	Pureza:	85	%
CH <sub>3</sub> COOH:	1.29	ml	CH <sub>3</sub> COOH:	1.29	ml
<b>Macronutrientes</b>			<b>Macronutrientes</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :	340.47	mg	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :	268.01	mg
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	35.18	mg	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	35.18	mg
CaCl:	5.00	mg	CaCl:	5.00	mg
MgSO <sub>4</sub> :	10	mg	MgSO <sub>4</sub> :	10	mg

## **Anexo 2**

### **Prueba gravimétrica para cuantificación de PHA**

#### **Reactivos**

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

#### **Procedimiento**

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

## Anexo 3

### Ficha técnica y especificaciones de equipos utilizados para la caracterización

---

#### Fourier Transform Infrared Spectrophotometer IRAffinity-1S

---

Interferómetro	Interferómetro Michelson (ángulo de incidencia de 30°C). Equipado con sistema de alineación dinámica. Interferómetro sellado con secado automático
Rango de onda	7,800 to 350cm <sup>-1</sup>
Resolución	0.5, 1, 2, 4, 8, 16cm <sup>-1</sup>
Relación S/N	30,000: 1 o superior (pico a pico, resolución de 4 cm <sup>-1</sup> , en una vecindad de 2,100 cm <sup>-1</sup> , acumulación de 1 minuto)
Dimensiones	514 (W)x 606 (D)x 273 (H) mm
Peso	35 kg

---

---

#### DSC 4000/6000 Differential Scanning Calorimeters

---

Sensor de temperatura	Basado en termopar. Disco mecanizado con precisión de aleación de cromo (90% de níquel / 10% de cromo)
Rango de temperatura	-100 °C to 450 °C
Exactitud	±0.1 °C
Precisión	±0.02 °C
Control de velocidad de calentamiento	0.1 -100 °C/min
Control de velocidad de enfriamiento	0.1 - 100 °C/min

---

---

#### TGA q5000 v3.17 build 265

---

Rango de onda	0.1 g (nom)
Exactitud	±0.1 %
Sensibilidad	< 0.1µg
Resolución de señal	0.01µg
Rango de temperatura	5 - 85°C
± Estabilidad isotérmica	±0.1°C

---