



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Monitoreo de la acumulación de polihidroxicanoatos en cultivos mixtos para tratamiento de aguas residuales”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

Nadima Simón Legorreta



MÉXICO, D.F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Rodolfo Torres Barrera
Vocal:	Prof. Víctor Manuel Luna Pabello
Secretario	Prof. Alejandro Vargas Casillas
1er. Suplente	Prof. Alfonso Duran Moreno
2º. Suplente	Prof. José Agustín García Reynoso

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F.

Dr. Alejandro Vargas Casillas: _____

Nadima Simón Legorreta: _____

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada y el apoyo financiero con número de proyecto J-46097-Y.

A mi tutor el Dr. Alejandro Vargas, por su apoyo, confianza, consejos y sobre todo por impulsarme y guiarme alcanzar mis sueños y metas.

A mis compañeras de trabajo: Mónica y Nancy por darme su apoyo. A mis compañeros y maestros de laboratorio del Instituto de Ingeniería en especial a Gloria y Jaime.

A la Institución UNAM, en especial al Instituto de Ingeniería y Facultad de Química, cuyos profesores me otorgaron grandes enseñanzas académicas y personales. Que fueron y son pilares de lo que soy hasta el día de hoy.

A las personas más importantes de mi vida FAMILIA Y AMIGOS:

Papas, gracias por darme su apoyo incondicional, por ser más que unos padres, son mis amigos, compañeros y cómplices.

Loly, mil gracias por estar ahí las 24 horas, por darme la vida por ser mi amiga, hermana y aguantar mi estrés. Te quiero.

Jaime, mi gran maestro, amigo, colega y el que me guió hasta éste momento, para lograr éste sueño compartido, va por ti papi te quiere tu niña.

A mis abuelos, tíos, padrinos, y mis primos, en especial a los que estuvieron apoyándome (en la universidad) en todo momento, Yosho_(mma), Zeta, Yus, Alex, Vivi, Ana Ali, etc. (Gracias amigos).

José Antonio neta mil gracias, no solo fuiste un gran compañero de la fac., laboratorio, instituto, jornada, cele, si no un gran amigo incondicional, y más en mi vida. _(ahmysta)Gracias por darme tu apoyo, cariño paciencia, tiempo y confianza.

A mis amigos del alma, Paty, Ana Mari, Sarai, Zaine, Gonzalo, Carlos y otros más que marcaron mi vida. Gracias por estar ahí incondicionalmente y para toda la vida. Por enseñarme que la amistad es lo más importante del mundo, por ser las estrellas que guiaron mi camino. Los quiero y adoro.

A mis amigos y compañeros de la escuela, en especial a Rodolfo _(tqs), Ana, Raúl, Anabel, Moni, Luis, y otros más que representaron una etapa importante en mi vida, gracias por compartir esos momentos.

Y por último y no por eso menos especial a Dios, por haberme permitido lograr ser lo que soy, sin dejarme caer.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Generalidades.....	7
2.2 Historia de los PHA.....	9
2.3 Estructura y propiedades de los PHA.....	12
2.4 Biosíntesis y producción de PHA.....	14
2.4.1 Biosíntesis.....	14
2.4.2 Biodegradación.....	16
2.4.3 Producción de PHAs.....	18
2.5 Aplicaciones de los PHA.....	20
2.6 Reactores discontinuos secuenciales (SBR).....	21
2.7 Problemática y justificación del proyecto	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo global.....	26
3.2 Objetivos particulares.....	26
4. APORTES.....	27
5. METODOLOGÍA.....	28
5.1 Sistema experimental.....	28
5.1.1 Sistema integral de producción de PHA	28
5.1.2 Biorreactor piloto experimental de enriquecimiento selectivo.....	30
5.1.3 Operación del biorreactor experimental	33
5.1.4 Técnicas analíticas estándar empleadas	36
5.1.4.1 Sólidos suspendidos volátiles (SSV) y Sólidos suspendidos totales (SST).....	37
5.1.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	38
5.1.4.3 Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs).....	39
5.1.4.4 Estudio de ciclo.....	39

5.2 Técnica cuantitativa: tinción con Negro de Sudán.....	41
5.2.1 Antecedentes.....	41
5.2.2 Descripción.....	46
5.3 Cromatografía de gases.....	47
5.3.1 Antecedentes.....	47
5.3.1.1 Separaciones cromatográficas.....	47
5.3.1.2 Métodos cromatográficos.....	48
5.3.1.3 Cromatografía de gases.....	48
5.3.1.4 Extracción y cuantificación de PHAs por cromatografía de gases.....	50
5.3.2 Descripción del método de cuantificación de PHA empleado.....	51
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	53
6.1 Estudio de ciclo.....	53
6.2 Resultados de técnicas analíticas estándar	54
6.3 Determinación cualitativa de PHA.....	57
6.4 Cuantificación del PHA por cromatografía de gases.....	60
7. CONCLUSIONES.....	64
8. BIBLIOGRAFÍA.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura química del poli (β -hidroxibutirato).....	8
Figura 2.2 Estructura química del poli (β -hidroxibutirato- co- β -hidroxivalerato)...	11
Figura 2.3. Fórmula de la estructura general del polihidroxialcanoato (PHA).....	12
Figura 2.4. Celdas empacadas con inclusión en sus cuerpos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en <i>Alcaligenes eutrophus</i>	15
Figura 5.1 Esquema del sistema integral de producción de PHA.....	29
Figura 5.2 Diagrama del sistema experimental de producción de PHA.....	30
Figura 5.3 Fotografía del montaje experimental.....	32
Figura 5.4 Pantalla al usuario del programa de control automático del SBR de enriquecimiento.....	35

Figura 5.5 Registro de proceso.....	36
Figura 6.1 Monitoreo de los SST y SSV durante el periodo de 90 días.....	54
Figura 6.2 SST y SSV del tercer estudio de ciclo.....	55
Figura 6.3 Carbono Orgánico Total (COT) y pH.....	56
Figura 6.4 Consumo de Ácidos Grasos Volátiles en el tercer ciclo.....	57
Figura 6.5 Ausencia de PHB (objetivo 100X, barra 2.0µm).....	58
Figura 6.6 Muestra 1 en el microscopio (objetivo 100X).....	59
Figura 6.7 Muestra 2 en el microscopio (objetivo 100X, barra 2.0µm).....	59
Figura 6.8 Muestra 3 en el microscopio (objetivo 100X, barra 2.0µm).....	60
Figura 6.9 Cromatograma de un estudio de ciclo contra el estándar de PHB.....	61
Figura 6.10 Cromatograma de un estudio del reactor de producción contra el estándar de PHB.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Propiedades de PHB comparadas con el polipropileno (PP).....	13
Tabla 5.1 Características del reactor.....	32
Tabla 5.2 Alimentación.....	34
Tabla 5.3 Medio mineral.....	34
Tabla 5.4 Procedimiento para determinar pesos A,B y C de SSV Y SST	37
Tabla 5.5 Intervalos de muestreo en estudios de ciclo.....	40
Tabla 6.1 Resultados de un estudio de ciclo.....	53

1. RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son homo-ó hetero-poliésteres que son sintetizados por diferentes procariontes bajo condiciones específicas. Existen microorganismos que los acumulan de dos formas principalmente, por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso, y aquellos que los acumulan durante su crecimiento.

Los PHAs son una buena alternativa ambiental para sustituir los plásticos sintéticos que son utilizados como empaques con un ciclo de vida corta. Estos polímeros tienen propiedades mecánicas similares a los polímeros sintéticos y además son biodegradables en el medio ambiente.

La producción de PHAs combinado con el tratamiento de residuos crea múltiples beneficios para la conservación del medio ambiente. Los residuos orgánicos son convertidos en termoplásticos biodegradables sustituyendo a los plásticos petroquímicos y además el costo del tratamiento de residuos puede ser parcialmente recuperado por valiosos polímeros biodegradables.

Uno de los principales problemas a resolver es la cuantificación de PHAs, que a pesar de que se cuenta con las referencias de recientes estudios, hace falta realizar mejoras en los mismos. Por lo cual el presente proyecto enfatizará en dicho tema, como paso exploratorio para desarrollar un esquema de producción eficiente de PHAs a partir de aguas y lodos residuales.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

Los plásticos han sido una parte integral en la vida contemporánea por sus deseables propiedades, que incluyen la durabilidad y la resistencia a la degradación (Lee, 1996). Sin embargo, los plásticos no degradables acumulan como desecho sólido 25 millones de toneladas por año. Recientemente, concierne un problema de contaminación global y la sobreproducción de estos residuos sólidos ha creado un gran interés en el desarrollo de plásticos biodegradables con propiedades físicas y químicas similares a las de los plásticos sintéticos convencionales. Desde la década de 1970 el estudio de los plásticos biodegradables presenta un crecimiento constante en la literatura (Griffin, 1994).

Según Griffin, (1994), los poliésteres se definen como polímeros formados por la condensación de alcoholes polihidricos como glicol o propilenglicol y ácidos polibásicos como malérico o tereftalato. Los biopoliésteres, por otro lado, son poliésteres derivados de una fuente bacteriana y son exclusivamente basados en ácidos hidroxialcanóicos.

El descubrimiento de los biopoliésteres conduce a la propuesta de que los polihidroxialcanoatos representan una nueva clase de macromoléculas naturales. El interés actual de los biopoliésteres se centra alrededor de una mayor conciencia en torno a la preservación del medio ambiente natural y la oposición a la amplia utilización de los plásticos no biodegradables.

El más simple y el más común miembro de la familia de los poli (β -hidroxialcanoatos) es el poli (β -hidroxibutirato), cuya estructura química se ilustra en la figura 2.1. Este material es biosintetizado por un gran número de bacterias como material de almacenamiento.

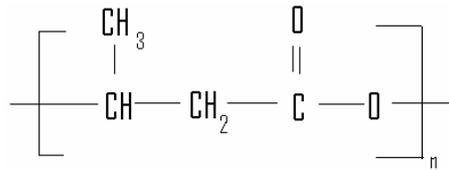


Figura 2.1 Estructura química del poli (β -hidroxibutirato).

El actual desarrollo comercial está basado en la tecnología de fermentación, pero también existe interés por parte de la ingeniería genética y metabólica para clonar algunos genes, y algún día reemplazar el almidón o los lípidos usados actualmente por biopoliésteres producidos directamente por ciertas plantas.

Los impulsos ambientales para el reciclaje y las tecnologías de limpieza para la eliminación de residuos sugieren que la producción de biopoliésteres aumentará considerablemente en las próximas décadas.

2.2 Historia de los PHA

Nota: esta sección es una reseña de la historia del PHA, relatada en el libro de Griffin, (1994) con elementos tomados de otras fuentes como el libro de Doi, (1990) y artículos como el de Lenz y Marchessault (2005).

El poli (β -hidroxibutirato) (PHB) fue mencionado por primera vez en 1901 en la literatura de microbiología por Beijerinck en 1901. En 1925 Maurice Lemoigne observó gránulos como inclusiones en el fluido citoplasmático de una bacteria, que no eran solubles en éter como es normal en los lípidos; usando observaciones en el microscopio, saponificación y otros estudios demostró que este material era un poliéster con una fórmula empírica $(C_4H_6O_2)_n$. También representó las diferencias en el punto de fusión observadas en dos fracciones aisladas debido a las diferencias en el grado de polimerización. (Griffin, 1994).

Después de 30 años la inclusión del cuerpo de PHB fue estudiada primeramente como curiosidad académica. En 1952 Kepes y Péaud Lenoël observaron que las fracciones de poliéster aisladas por Lemoigne fueron producto de la hidrólisis de un peso molecular alto de poliéster con una temperatura de fusión de $180^\circ C$, teniendo un grupo ácido carboxílico en una terminación y un alcohol en la otra.

Weibul en 1952 hizo la correlación entre la presencia de gránulos intracelulares del lípido encontradas en muchas cepas de bacterias y PHB. Williamson y Wilkinson en 1958 fueron los primeros en reportar datos en el peso molecular y propiedades físicas. En 1958 Macrae y Wilkinson observaron que la acumulación de PHB podía

ser aumentada por una limitación de nitrógeno en el medio; siguiendo esto Merrick y Doudoroff (1962,1978) examinaron la biosíntesis y el proceso de la degradación enzimática del polímero dentro de las células bacterianas (Dawes, 1990). Los científicos llegaron a la conclusión de que las bacterias almacenan el PHB como material de reserva, así como mucho almidón y glucógeno son acumulados por otros organismos (Macrae y Wilkinson, 1958).

Entre la década de 1950 y 1960 Baptist y Werber en EUA comenzaron a producir cantidades suficientes para evaluación comercial; obtuvieron patentes para la producción y el proceso de aislamiento y desarrollo de artículos, tales como suturas y prótesis. (Baptist, 1962). Las extensas innovaciones para depurificar el producto en un plástico laminado (PHB) en el rendimiento máximo de la etapa de fermentación fueron relativamente bajas y el proceso de la extracción de su solvente fue caro. Además la producción del polímero estuvo fuertemente contaminada con residuos bacteriales. (Holmes, 1985). El proyecto fue abandonado y fue retomado en otra década con un interés comercial. A finales de 1960 y principios de la década de 1970 ICI (Imperial Chemical Industries) en el Reino Unido fue el principal comercializador de PHB, debido a la crisis energética de principios de esta década. (Howells, 1982).

ICI encontró que las condiciones de la bacteria *Alcaligenes eutrophus* podría producir más del 70% de PHB como biomasa seca. Sin embargo, el costo de producción de PHB es mucho más caro que el de polipropileno. ICI entonces hizo mejoras en la producción de PHB con un procedimiento patentado para la producción de los copolímeros del β -hidroxibutirato (HB) y β -hidroxivalerato (HV), cuya estructura se muestra en la figura 2.2. (Holmes et al., 1982). A esta familia de

2.3 Estructura y propiedades de los PHA

Los PHAs son homo-ó hetero-poliésteres que son sintetizados por diferentes procariontes bajo condiciones específicas.

Estos polímeros son importantes por tres razones:

- ◆ Pueden producirse cantidades grandes como recursos renovables;
- ◆ Sirven como almacenes de energía para mantenimiento celular;
- ◆ Son biodegradables.

La mayoría de los PHAs son poliésteres alifáticos con una estructura general como se muestra en la figura 2.3. Una molécula típica de PHA contiene $x = 1,000-30,000$ unidades, y n es igual a 1 para la mayoría de los PHAs. Cuando $R=CH_3$ se tiene el poli- β -hidroxibutirato (PHB), y cuando se tiene $R=CH_2-CH_3$ es poli- α -hidroxivalerato (PHV). Juntos estos dos polímeros y sus copolímeros, constituyen el volumen comercialmente útil con el PHB como el dominante (De Smet, et al., 1983).

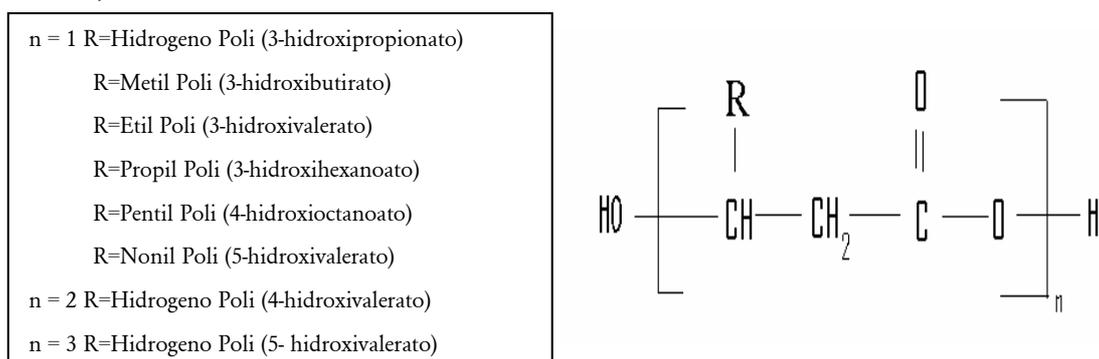


Figura 2.3 Fórmula de la estructura general del polihidroxicanoato (PHA).

Algunos de los plásticos biodegradables en desarrollo incluyen a los PHAs, poliláctidos, poliésteres alifáticos, polisacáridos y los copolímeros y/o mezclas de estos. Sin embargo uno de los problemas en el desarrollo de polímeros

biodegradables como sustitutos de los plásticos convencionales es su alto precio comparado con los plásticos derivados del petróleo.

Los PHAs son una buena alternativa ambiental para sustituir los plásticos sintéticos que son utilizados como empaques con un ciclo de vida corta; ya que son biodegradables en el medio ambiente. Estos polímeros tienen propiedades mecánicas similares a los polímeros sintéticos como el polipropileno debido a su punto de fusión y temperatura de transición. Algunas de estas propiedades se muestran en la Tabla 2.1.

Propiedades	PHB	PP
Punto de fusión cristalino	175	176
Cristalinidad (%)	80	70
Peso Molecular (Daltons)	$5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
Temperatura de transición (°C)	-4	-10
Densidad (g cm ⁻³)	1.250	0.905
Modulo de Young (G Pa)	4.0	1.7
Resistencia a la tensión(MPa)	40	38
Extensión para romper (%)	6	400
Resistencia ultravioleta	Bueno	Pobre
Resistencia a solventes	Pobre	Bueno
Biodegradabilidad	Si	No

Tabla 2.1 Propiedades de PHB comparadas con el polipropileno (PP) (Howells, 1982).

El PHB es a la vez más rígido y más frágil que el polipropileno. La fragilidad del PHB se debe en gran medida a la presencia de grandes cristales en forma de esferalitas, que se forman al enfriarse en la fusión. (Howells, 1982)

Algunos procesos innovadores han sido investigados para producir PHAs con sistemas simultáneos de componentes orgánicos de aguas residuales como residuos industriales y residuos municipales. La producción de PHAs combinado con el tratamiento de residuos crea múltiples beneficios para la conservación del

medio ambiente. Los residuos orgánicos son convertidos en termoplásticos biodegradables sustituyendo a los plásticos petroquímicos y además el costo del tratamiento de residuos puede ser parcialmente recuperado por valiosos polímeros biodegradables.

2.4 Biosíntesis y producción de PHA

2.4.1 Biosíntesis

Muchas especies de bacterias aerobias y anaerobias en condiciones limitantes de algún nutriente, con un suficiente suministro de carbono, acumulan inclusiones de gránulos de PHA intracelularmente. El PHA más común es el PHB donde la inclusión de los cuerpos de este son normalmente esféricos, alrededor de 0.5 μm en su diámetro. En la figura 2.4 se muestra una fotografía tomada con un microscopio electrónico de barrido de estas inclusiones de PHB. El agua insoluble de las moléculas de PHB ejerce una insignificante presión intracelular osmótica haciendo el poliéster una material ideal de reserva. (Dawes, 1990). La cantidad de PHB de la celdas de la bacteria es normalmente entre 1-30% de peso seco; sin embargo, en algunas especies de *Azotobacter* y de *Alcaligenes* pueden llegar a acumular el polímero por encima del 90% en su biomasa seca. (Baptist, 1962).

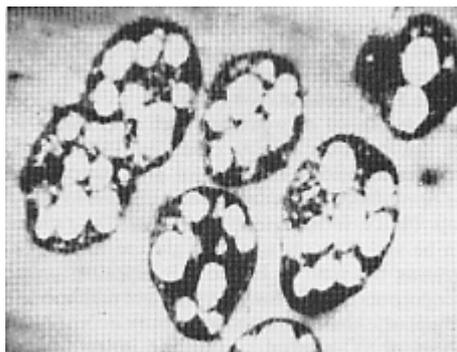


Figura 2.4 Celdas empacadas con inclusión en sus cuerpos de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en *Alcaligenes eutrophus*. (Griffin, 1994).

Algunas bacterias en su ambiente natural tales como los sedimentos estuarios y lodos de depuradora pueden acumular PHAs además de PHB (Odham, et al., 1986). Si se agrega glucosa y ácido propiónico a los cultivos de *Alcaligenes eutrophus* bajo condiciones limitadas de nitrógeno y fósforo, esta bacteria puede ser usada de forma comercial para la producción de PHAs. Sin embargo otros microorganismos acumulan este poliéster y pueden crecer como fuentes de carbono distintos a *Alcaligenes eutrophus*. Algunos ejemplos de otros organismos son *Pseudomonas oleovorans* (Gross, et al., 1989), *Bacillus megaterium*, *Methylobacterium* (Barnard y Sanders, 1989), una de las especies de *Aphanothece* (Capon, et al., 1983), una cianobacteria *Nocardia* (Davis, 1964) y *Pseudomonas cepacia* (Ramsay, et al., 1989), *Chromobacterium violaceum*, (Steinbüchel, et al., 1993) así como otras del género bacteriano *Rhodococcus* (Haywood, 1991).

2.4.2 Biodegradación

La biodegradación es un evento que se lleva a cabo por la acción de enzimas y es asociada con una descomposición química con organismos vivos (bacterias, hongos, etc.) o productos de esa secreción. La deterioración puede ser activada por exo- y endo-enzimas o por productos que son secretados bioquímicamente o químicamente para ese propósito.

Los macroorganismos también pueden alimentarse, y algunas veces digerir polímeros usando un mecanismo de envejecimiento químico o enzimático. Hay diferentes modos de degradación que en la naturaleza se combinan sinérgicamente para degradar polímeros.

La biodegradación se refiere exclusivamente a la acción degradadora por un organismo vivo, a diferencia de otro modo de degradación (fotólisis, oxidación, hidrólisis). La accesibilidad de un polímero para propiciar la degradación por un organismo vivo no tiene una relación directa para este origen y no todos los biopolímeros son realmente biodegradables (Griffin, 1994).

Una de las características más importantes de los poliésteres bacterianos es que pueden ser degradados en el medio ambiente. Sus productos, tales como películas y fibras, pueden ser degradados en el suelo, lodo o agua de mar. Bajo condiciones óptimas la tasa de degradación es extremadamente rápida. Se han reportado tiempos de degradación para un copolímero P (3HB)-P(3HV) de dos semanas en lodos activados (Doi, 1990). Algunos microorganismos como bacterias (*Pseudomonas lemoignei*, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas sp.*, *Alcaligenes*

faecalis, *Pseudomonas stutzeri*, *Streptomyces sp.* y *Pseudomonas picketti*) (Scherer, et al., 1999) y hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium funiculosum* (Scherer, et al., 1999), *Paecilomyces lilacinus* D218 (Oda, et al., 1999) producen enzimas depolimerizantes extracelulares para el P(3HB) y sus copolímeros. Estas enzimas hidrolizan el polímero o copolímero a dímeros y monómeros y los productos resultantes de esta hidrólisis son absorbidos por las bacterias u hongos que producen las enzimas depolimerizantes y utilizados como nutrientes. También existe hidrólisis, aunque con una tasa muy lenta, en el agua y sin la presencia de enzimas (Doi, 1990).

Con respecto a su degradación intracelular se sabe que los organismos capaces de producir PHA utilizan productos de almacenaje como fuente de energía y carbono. Esto lo logran con la acción de su propia enzima depolimerasa y bajo condiciones de falta de fuente de carbono (Pal, et al., 2007). Sin embargo poco se ha investigado en cultivos mixtos debido a la gran cantidad de especies presentes.

2.4.3 Producción de PHAs

En la actualidad hay diferentes procesos de producción de PHA, aunque se sabe que en todas las plantas de tratamiento de aguas residuales existe esta producción.

Existen dos grupos de bacterias principalmente capaces de producir PHA. El primer grupo de bacterias necesita una limitación de un nutriente esencial como es nitrógeno, fósforo, magnesio o sulfuro para la síntesis de PHA de una fuente de carbono en exceso. Las bacterias que se encuentran en este grupo son *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*, y *Protomonas oleovorans*. El segundo grupo de bacterias, que incluyen a *Alcaligenes latus*, una especie mutante de *Azotobacter vinelandii*, y *Escherichia coli* no requieren de la limitación de un nutriente para la síntesis de PHA y éstas pueden acumular polímero durante su crecimiento. (Khanna, 2004).

Los PHA pueden ser producidos en grandes cantidades a partir de recursos renovables por medio de procesos de fermentación, en determinadas condiciones de cultivos, y existe una serie de métodos físicos o químicos para extraer de ellos la producción de PHA. Los procesos de producción como lote, semi-batch y fermentación son los más usados actualmente. (Fuller y Lenz, 1990).

Hoy en día, la capacidad de producción de PHA es del orden de 800 toneladas por año. El BIOPOL® (única marca registrada de éste biopolímero) es producido y vendido en los EE.UU., bajo la marca PHBV, y también es vendido en Japón.

La producción anual de BIOPOL® no es sino una pequeña fracción de la de polímeros sintéticos. La razón principal de esto es que los plásticos convencionales obtenidos del petróleo pueden ser mejor fabricados y a menor costo que los polímeros biodegradables.

El costo por kilogramo de poliolefinas como el polietileno y el polipropileno es menos de 1 dólar de los E.U. El BIOPOL®, cuyo precio se ha reducido drásticamente desde que comenzó su producción, todavía se vende a alrededor de diecisiete veces el precio de los plásticos sintéticos. El alto precio que representa la producción de PHA a gran escala se debe a varios factores, como son el tipo de microorganismo que se utiliza, el cual en la mayor parte de los casos se trata de cepas puras; el costo de la fuente de carbono que se debe alimentar y finalmente el método de extracción de los PHA de las células. Sin embargo éste obstáculo para la comercialización de los PHA sólo puede ser contrarrestado por la buena disposición del público a pagar más por productos que se consideran de beneficio al medio ambiente. (Griffin, 1994).

2.5 Aplicaciones de los PHA

Entre las aplicaciones más importantes del PHB está su uso como material para aplicaciones biomédicas tales como filamentos de suturas, portadores de medicamentos y generación constructiva para el crecimiento celular debido que resulta biocompatible. Es particularmente importante el hecho que el producto de la degradación del PHB, es decir D(-)-3-hidroxi-butarato, es un metabolito intermedio común presente en las células animales (Lee, 1996). Se han detectado también cantidades relativamente grandes en plasma sanguíneo humano, lo cual reafirma su biocompatibilidad (Lee, 1996).

Una de las aplicaciones más simples del copolímero del PHB llamado polihidroxi-butarato-valerato (PHBV), es como sustituto biodegradable de contenedores de poliolefinas, películas plásticas y bolsas. La primera vez que se usó comercialmente el PHBV a lo largo de estas líneas fue Wella AG (Darmstadt, Alemania), usando una inyección de golpe moldeado en una botella para un empaque biodegradable de shampoo para el cabello (Ramsay, et al., 1989). El PHBV también ha sido usado como aceite de motor para contenedores y como una navaja de afeitar desechable. Dichas aplicaciones de los PHBV son especialmente importantes para los temas actualmente difíciles de separar y reciclar, como las películas de cocina, pañales y toallas sanitarias (Holmes, 1985).

El PHBV puede ser usado internamente en humanos. Como el polímero es no tóxico y compatible con el tejido vivo, y la degradación única del producto es el ácido R-β-hidroxi-butírico, el cual es normal en el metabolismo de mamíferos encontrado en concentraciones de 3-10 mg/100ml en la sangre saludable en

humanos adultos (Griffin, 1994). Otra aplicación del PHBV en hospitales podría ser en hisopos quirúrgicos, apósitos y lubricantes en polvo para guantes de los cirujanos.

2.6 Reactores discontinuos secuenciales (SBR)

Para la producción de PHAs se emplea un reactor discontinuo secuencial (Sequencing Batch Reactor, SBR), el cual es un sistema de lodos activados para tratamiento del agua residual que utiliza ciclos de llenado y descarga. En este sistema el agua residual entra en una tanda a un reactor único, recibe tratamiento para remover componentes indeseables y luego se descarga. La homogenización de caudales, la aeración y la sedimentación se logran en ese reactor único. Para optimizar el desempeño del sistema, se utilizan dos o más reactores en una secuencia de operación predeterminada. Los sistemas SBR han sido utilizados con éxito para tratar aguas residuales tanto municipales como industriales. Estos sistemas son especialmente efectivos para aplicaciones de tratamiento de agua residual caracterizados por caudales reducidos o intermitentes.

El interés en los SBR se revivió a finales de la década de 1950 e inicios de la década de 1960 con el desarrollo de nuevos equipos y tecnología. Las mejoras de los sistemas de aireación y de controles permitieron que los SBR compitieran con éxito con los sistemas convencionales de lodos activados.

El suministro gradual de nutrientes a un cultivo por lote es una práctica que empíricamente se ha utilizado para el cultivo de microorganismos. Es hasta la década de los setenta que se describen matemáticamente distintas variantes de esta clase de fermentación a la que genéricamente se denomina *fed-batch* o lote alimentado.

En este sistema hay entrada, pero no salida de materiales del reactor, por lo que también se denomina cultivo de volumen variable. Por la forma de suministro de nutrientes al reactor, los sistemas fermentativos semicerrados pueden clasificarse en cultivos con alimentación constante o variable. El conjunto de ecuaciones diferenciales del sistema, que describen a las velocidades globales o volumétricas de acumulación de materiales del reactor, son las mismas para cualquiera de los casos (ecuaciones generales de balance), diversificándose las soluciones a estas ecuaciones generales en cuanto se considera la funcionalidad que tiene la velocidad de suministro del sustrato limitante con respecto al tiempo.

2.7 Problemática y justificación del proyecto

El planeta esta sufriendo alteraciones generadas por la contaminación producida por el hombre. Por esto, hoy en día el campo de estudio de disciplinas ambientales ha tomado fuerza, originando la necesidad de crear nuevas alternativas para aliviar dicho problema.

Los plásticos son una parte esencial de casi todas las industrias y han reemplazado a los empaques de vidrio y papel. La acumulación de plásticos recalcitrantes en el medio ambiente se ha convertido en un problema mundial. Ha surgido entonces la necesidad de crear nuevos materiales, como es el caso de los plásticos biodegradables.

En recientes estudios se ha probado la capacidad de las bacterias de cultivos mixtos que se encuentran en los lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales para la producción de PHA. Existen trabajos donde esto se ha realizado con buenos resultados y el presente estudio pretende llevar a cabo una investigación sobre la obtención de estos polímeros en bacterias de lodos activados, pero buscando su optimización de modo que se desarrollen en un futuro técnicas de que permitan la producción a gran escala de los plásticos a partir de los lodos activados. Esto representaría una aportación al medio ambiente considerable al reducir la cantidad de desechos plásticos que son tirados anualmente en los cuerpos de agua y suelo, además de aprovechar un desecho de las plantas de lodos, cuyo tratamiento representa problemas y costos

considerables. Así, a partir de un material de desecho, se podrían obtener unidades poliméricas biodegradables de costo de fabricación competitivo.

Por otro lado en las plantas de tratamiento de aguas, la disposición final efectiva de lodo, producido en exceso del tratamiento de agua, se ha vuelto un problema ambiental serio. La producción de PHAs usando el lodo podría ser una solución al problema de exceso de lodo. Se ha demostrado que el lodo desarrollado en procesos anaerobio-aerobios para la remoción de fósforo produce PHAs con altas eficiencias, y que bajo condiciones óptimas es posible obtener más del 30% de peso seco del lodo.

Al realizar este proyecto, el desarrollo de materia prima para producir plásticos biodegradables representa un camino para reducir el problema de disposición y/o estabilización de los residuos sólidos generados en el proceso de una planta de tratamiento de agua residual con lo que se lograría una mejora de condiciones ambientales en general.

A pesar de las evidentes ventajas de los PHAs frente a los plásticos derivados del petróleo, su uso está muy limitado debido a su alto costo de producción. Por este motivo, el presente proyecto trata la propuesta de un sistema integral de biorreactores discontinuos para la producción de PHAs, proponiendo diferentes configuraciones de operación que hagan más eficiente el proceso usando lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales.

Uno de los principales problemas a resolver es la cuantificación de PHAs, que a pesar de que se cuenta con las referencias de recientes estudios, hace falta

realizar mejoras en los mismos. Por lo cual el presente proyecto enfatizará en dicho tema, como un primero paso para desarrollar un esquema de producción eficiente de PHAs a partir de aguas y lodos residuales.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo global

Monitorear por medio de distintas técnicas experimentales de cuantificación los polihidroxicanoatos en cultivos mixtos para tratamiento de aguas residuales.

3.2 Objetivos particulares

- ◆ Seguir el desempeño de un biorreactor piloto para enriquecimiento selectivo de biomasa productora de polihidroxicanoatos.
- ◆ Implementar técnicas analíticas estándar para monitoreo de biorreactores.
- ◆ Probar técnicas cuantitativas y cualitativas para verificar la acumulación de polihidroxicanoatos en cultivos mixtos.

4. APORTES

El presente trabajo contribuye los siguientes aportes:

- ◆ Se describe la puesta en marcha de un biorreactor de enriquecimiento de biomasa capaz de producir PHA
- ◆ Se describe la aplicación de una técnica para verificar la presencia de PHA en cultivos mixtos (Negro de Sudán).
- ◆ Se describe la aplicación y adecuación de una técnica de cromatografía de gases para la cuantificación de PHA en cultivos mixtos.

5. METODOLOGÍA

5.1 Sistema experimental

5.1.1 Sistema integral de producción de PHA

La presente tesis es sólo una parte de un proyecto más grande, que propone el uso de un sistema compuesto por tres biorreactores en serie, operando de manera sinérgica, para producir PHA a partir del tratamiento de aguas residuales o residuos orgánicos. En este apartado se describe de manera breve cómo está compuesto dicho sistema.

El primer biorreactor sería un fermentador acidogénico, el cual, a partir de agua residual con alta carga orgánica o bien, desechos orgánicos, los fermenta para producir un agua rica en ácidos grasos volátiles (AGVs), que han demostrado ser el sustrato idóneo para la producción de PHAs.

El segundo reactor sería un reactor discontinuo secuencial (SBR) que trabajaría como enriquecedor selectivo de biomasa para hacerla capaz de producir PHA en grandes cantidades. Este reactor tiene como alimentación el agua rica en AGVs producida por el fermentador acidogénico y además debe estar siendo suministrado con biomasa para ser enriquecida. En este sentido, se contempla que ésta sean lodos de desecho de una planta de tratamiento de aguas

residuales. A diferencia de la operación usual de un SBR, al final del ciclo, antes de iniciar la sedimentación, se retiraría un cierto volumen de licor mezclado para ser transferido al tercer reactor.

El tercer reactor, llamado de producción o de cultivo, operaría en lote (*batch*). La biomasa enriquecida del reactor SBR sería transferida a él y posteriormente sería alimentado con agua rica en AGVs (en concentración no necesariamente igual a la de la alimentación del SBR), de manera tal que las bacterias acumulen el PHA de manera eficiente. Una vez que fuera alcanzada la máxima acumulación de PHA, todo el licor mezclado sería retirado, el consumo de PHA sería inhibido y se procedería a la extracción del biopolímero. El esquema de lo anterior se presenta en la figura 5.1.

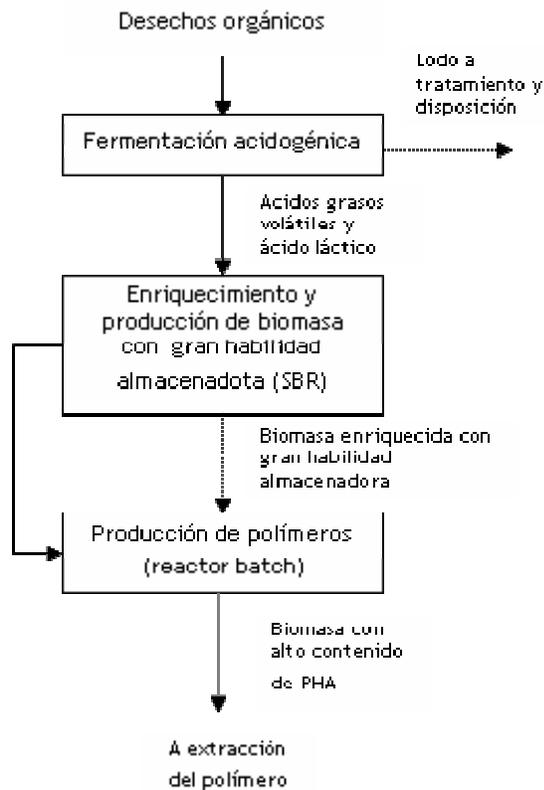


Figura 5.1 Esquema del sistema integral de producción de PHA

5.1.2 Biorreactor piloto experimental de enriquecimiento selectivo

En el presente estudio, se trabajó sólo con el biorreactor de enriquecimiento selectivo (llamado a partir de ahora SBR) y ocasionalmente con el reactor de producción (denotado batch). El esquema experimental se muestra en la figura 5.2.

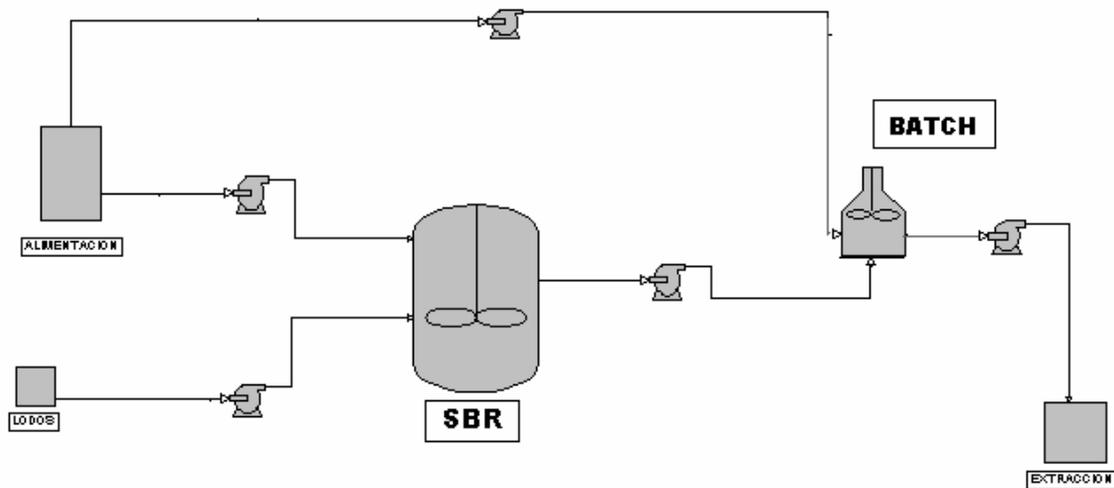


Figura 5.2 Diagrama del sistema experimental de producción de PHA.

Durante la primera etapa se logró aclimatar el lodo inoculado para producir polihidroxicanoatos. Se inoculó con lodos de la recirculación del sedimentador secundario al tanque de aeración de una planta de tratamiento de agua residual municipal (sistema de lodos activados). La alimentación a este reactor es agua sintética con ácidos grasos volátiles y un medio mineral (Serafim et al.; 2004).

La aclimatación se logra al someter a los microorganismos a condiciones de estrés, obteniéndose un cultivo enriquecido selectivamente para producción de PHAs. En periodos de abundancia de sustrato se almacenan los polímeros como reservas en grandes cantidades. Por el contrario en periodos de ayuno los polímeros son utilizados para mantenimiento celular. Este cultivo enriquecido selectivamente es purgado y solamente una fracción del volumen total del reactor como licor mezclado es retirado antes de sedimentar brevemente para continuar a la siguiente etapa del sistema. Es necesario reemplazarlo con lodos frescos de la recirculación, para enriquecer selectivamente a los lodos entrantes, aprovechando los lodos de la planta de tratamiento y garantizando una producción constante de PHAs.

En la primera etapa del trabajo de investigación se siguió como modelo un experimento propuesto por Dionisi et al., (2004) con ligeras modificaciones tomadas por Serafim et al., (2004). El objetivo de esta etapa fue simplemente determinar la capacidad o no de producción de PHA de los lodos activados de la planta seleccionada.

Se montó el experimento con un reactor de vidrio en el cual se adaptaron diversos sensores para monitorear y controlar algunas variables como son: pH, agitación, aeración, oxígeno disuelto y temperatura; que se acoplan a los puertos del reactor. Una fotografía del reactor se muestra en la figura 5.3 y posee las características que se presentan en la tabla 5.1.



Figura 5.3 Fotografía del montaje experimental.

Parámetro

Volumen máximo de trabajo
 Volumen mínimo de trabajo
 Volumen de trabajo
 Volumen de chaqueta para control de temperatura
 Puerto central M
 Puerto G de 3/4"
 5 puertos
 2 Puertos de 12 (mm)
 Puerto de 10 (mm)
 Puerto de 2 (mm)

Descripción

6,9 (l)
 2,01 (l)
 5,41 (l)
 4,2 (l)
 Agitación
 Oxígeno disuelto
 pH, mV, etc.
 Tubería
 Baffles
 Conexión de control de nivel

Tabla 5.1 Características del reactor.

5.1.3 Operación del biorreactor experimental

El reactor fue inoculado con 1.5 L de lodo de recirculación del sedimentador secundario de una planta de lodos activados convencional, que se obtuvieron de la planta de tratamiento del Cerro de la Estrella y de la planta de tratamiento de agua de C.U. La concentración aproximada de sólidos suspendidos volátiles de estos lodos fue de 7525 mgSSV/L. Posteriormente fueron disueltos en los 2.5 L de agua inicial alcanzando una concentración aproximada de 3500 mgSSV/L. Las condiciones de operación del reactor fueron: una etapa de llenado de 10 minutos, un tiempo de reacción con aeración y agitación de 348 minutos, y un tiempo de sedimentación de 10 minutos, seguido de 2 minutos de purga, tal que el tiempo de ciclo fue de 6 horas. La aeración del reactor se logró mediante un controlador de flujo másico y un difusor acoplado a uno de los puertos de entrada del reactor. La agitación se mantiene en 300 RPM; usando dos propelas de tipo Rushton.

La alimentación consiste en una mezcla de ácidos grasos volátiles (ácido propiónico, ácido láctico y ácido acético) disueltos en un medio mineral con una concentración total de 2.5 gDQO/L (Dionisi et al., 2004). Las cantidades sugeridas para la alimentación se muestran en la tabla 5.2. La composición del medio mineral se muestra en la tabla 5.3.

sustancia	g/l	%
Ácido acético	3,19	42,34
Ácido láctico	3,22	42,73
Ácido propiónico	1,125	14,93

Tabla 5.2 Alimentación.

Compuesto	Nombre	Concentración mg L-1	Concentración en medio mineral mg L 1
KH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de potasio	8500	255
K ₂ HPO ₄	fosfato dibásico de potasio	10875	326,25
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	fosfato dibásico de sodio heptahidratado	25152	754,56
NH ₄ Cl	cloruro de amonio	2500	75
MgSO ₄ .7H ₂ O	sulfato de magnesio heptahidratado	8670	104,04
CaCl ₂ .2H ₂ O	cloruro de calcio dihidratado	36400	54,6
FeCl ₃ .6H ₂ O	cloruro férrico hexahidratado	250	1,75
MnCl ₂ .4H ₂ O	cloruro de manganeso tetrahidratado	35,3	0,2471
H ₃ BO ₄	ácido bórico	57,2	0,4004
ZnCl ₂	cloruro de cinc	20,3	0,1421
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	molibdato de amonio	34,7	0,2429
EDTA		55,5	0,3885
FeCl ₃ .6H ₂ O	cloruro férrico hexahidratado	54	0,378

Tabla 5.3 Medio mineral.

Se agrega además tiourea (concentración 0.02 g/L) para inhibir la nitrificación, evitando formación de nitratos y nitritos. La operación del SBR se caracterizó con mediciones de SSV y SST en ciclos muestra al final y al inicio de ciclo, oxígeno disuelto, pH y temperatura. El control de temperatura fue mediante una chaqueta que envuelve al reactor. Durante esta primera etapa la temperatura se mantuvo con un valor de 25°C.

El reactor esta automatizado con una computadora que posee un programa realizado en LabView 7.1 (National Instruments) por miembros del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) del

Instituto de Ingeniería de la UNAM. Como se puede observar en la figura 5.4, el programa facilita la opción de modificar las condiciones de operación de manera sencilla. Además se tiene una pantalla de registro de proceso (figura 5.5), donde se muestra de manera gráfica el comportamiento de algunas variables controladas, durante todo el tiempo del ciclo.

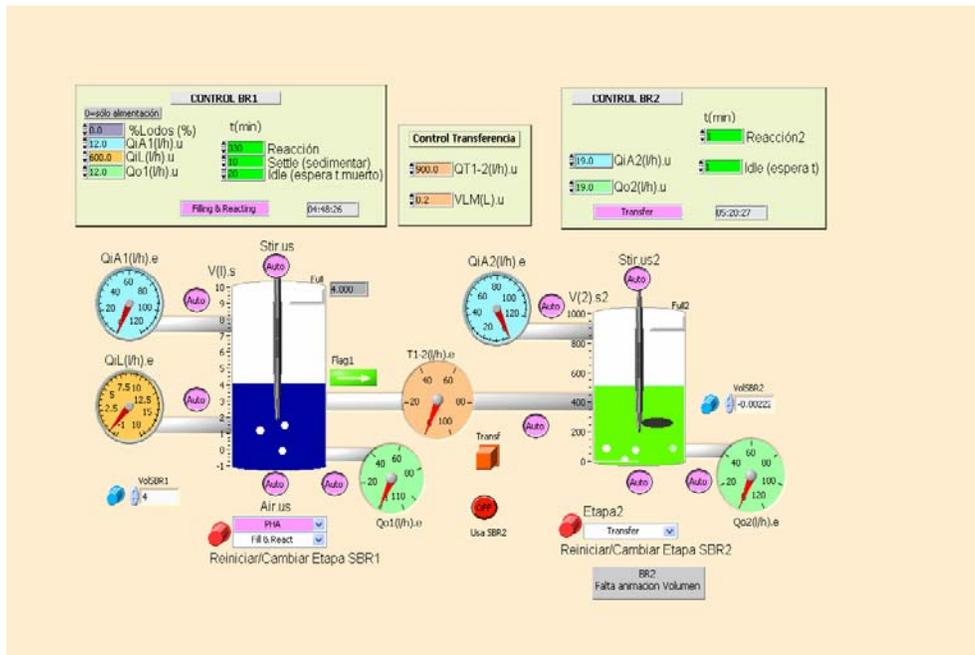


Figura 5.4 Pantalla al usuario del programa de control automático del SBR de enriquecimiento.

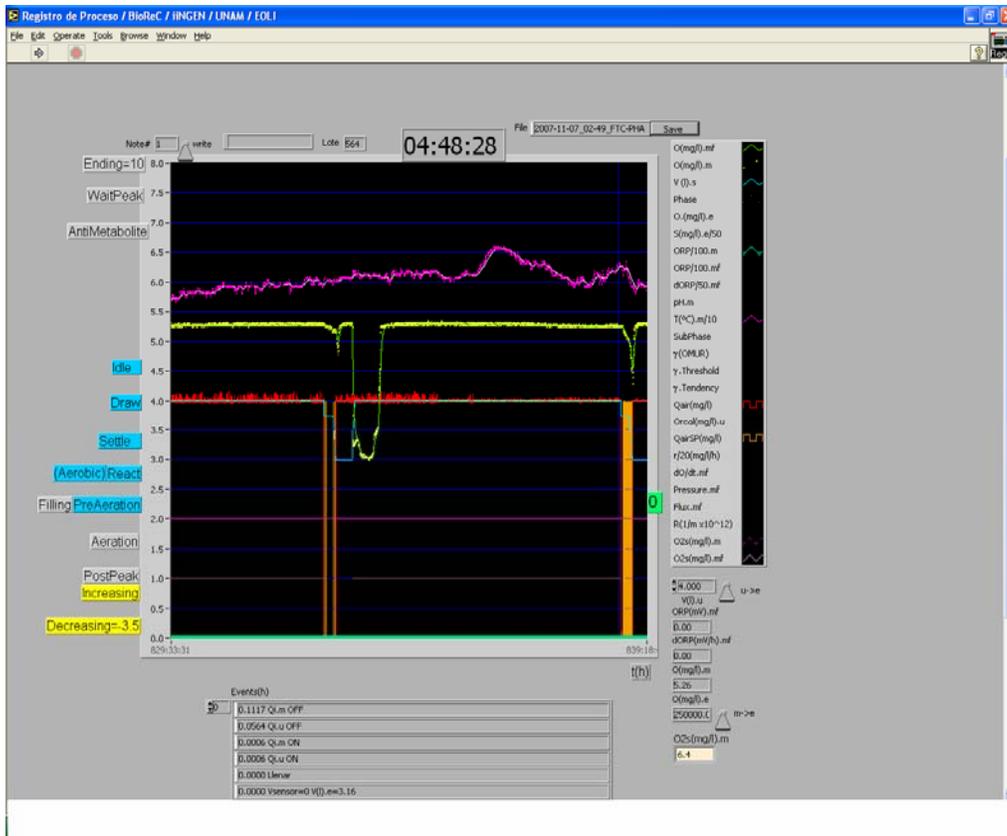


Figura 5.5 Registro de proceso.

5.1.4 Técnicas analíticas estándar empleadas

Para verificar la correcta operación del reactor, así como para establecer algunos criterios de operación, es necesario medir algunas variables del proceso. Para ello se emplearon algunas técnicas analíticas estándar que a continuación se describen. Otras técnicas más específicas se describen en otros apartados.

5.1.4.1 Sólidos suspendidos volátiles (SSV) y Sólidos suspendidos totales (SST)

El conocimiento de los sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) es pertinente para ver la rapidez de crecimiento de las bacterias presentes y para ajustar parámetros en función de la conveniencia o no de la producción de biomasa. Los SST y SSV son determinados por el método estándar gravimétrico.

Esta técnica se desarrolla en tres pasos determinando tres pesos, denominados A, B y C, y posteriormente se aplica una fórmula para determinar tanto los SST como los SSV.

Los procedimientos para determinar los pesos A, B y C se muestran a continuación:

PESO A

Lavar filtros y secarlos en el vacío.
Meterlos a la estufa una hora a (105° C).
Meterlos a la mufla a 550 ° C durante 15 minutos.
Después colocarlos a la estufa (105° C) durante 15 min.
Se colocan en el desecador durante 15 min.
Pesado del filtro.

PESO B

Se pone en el vacío el filtro preparado.
Se agrega la muestra.
Se colocan en la estufa durante 1 hora (105° C).
Se colocan en el desecador durante 15 minutos.
Pesado del filtro.

PESO C

Se coloca en la mufla durante 15 minutos (550 ° C).
Se coloca en la estufa durante 15 minutos (105° C).
Se coloca en el desecador durante 15 minutos.
Pesado del filtro.

Tabla 5.4 Procedimiento para determinar pesos A, B y C de SSV y SST

Una vez obtenidos los pesos, los SST (mg/L) y SSV (mg/L) se determinan de la siguiente manera:

$$SST\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{(P_B - P_A) \times 1000}{V}$$

$$SSV\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{(P_B - P_C) \times 1000}{V}$$

El procedimiento se hace por duplicado o triplicado y se reporta el promedio.

5.1.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se toma una muestra de 10 mL del reactor, se le agregan 5 gotas de formaldehído para inhibir la actividad microbiana. Posteriormente se puede refrigerar o usar inmediatamente. Se centrifuga durante 5 min a 5000 rpm. El pellet se usa para determinar los PHAs, de ser necesario, mientras que el sobrenadante se usa para la determinación de DQO soluble y total. Se siguen métodos estándar para determinarlos, se agregan los reactivos a 3 ml de muestra y se digieren durante 2 horas a 148°C. Para la DQO total se hace una dilución de 30 veces de la biomasa.

5.1.4.3 Determinación de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs)

Para seguir el perfil de ácidos grasos volátiles (que son preparados sintéticamente con una mezcla de ácido acético y ácido propiónico en proporción de 70:30 y con una concentración promedio de 25 gDQO/L), se utiliza 1 ml de sobrenadante filtrado y mezclado con 100 µl de ácido fórmico al 7% w/v para conservación de la muestra. Posteriormente se analiza por cromatografía de gases (Arcos, 2007).

5.1.4.4 Estudio de ciclo

Se le ha denominado estudio de ciclo al hecho de seguir algunas variables involucradas en el reactor a lo largo del tiempo durante un ciclo. Consiste en tomar muestras periódicas del reactor y hacer las determinaciones de carbono orgánico total (COT), concentración intracelular de polihidroxialcanoatos (PHA), concentración de AGVs, en su caso SST y SSV, y de ser posible también DQO. Los tiempos de muestreo se definen en la tabla 5.5

<i>Muestra</i>	<i>Tiempo</i>
1	0
2	0.25
3	0.5
4	0.75
5	1
6	1.5
7	2
8	2.5
9	3
10	4
11	5
12	6

Tabla 5.5 Intervalos de muestreo en estudios de ciclo.

Los intervalos de muestreo fueron definidos al realizar una previa experimentación midiendo el carbón orgánico total (COT) y suponiendo que la acumulación de PHA se encuentra en las primeras tres horas del ciclo, siendo máxima durante la primera hora. Por esta razón la frecuencia de muestreo en la primera hora del ciclo es de cada 0.25 horas. Durante las siguientes dos horas se toman muestras a intervalos de 0.5 horas y finalmente cada hora durante el período de tiempo que es considerado como el tiempo donde se consume el PHA acumulado como sustrato.

Al mismo tiempo que se toman estas muestras se está monitoreando la temperatura, la aeración (constante), el pH y el oxígeno disuelto. Esta última variable es importante porque también es un indicador de la velocidad de consumo de AGVs y por lo tanto de acumulación de PHA durante la etapa de abundancia de sustrato.

En los siguientes apartados se explican con mayor detalle dos técnicas montadas durante este proyecto de investigación, para determinar la acumulación de PHA en cultivos mixtos. La primera es una tinción que se emplea para confirmar cualitativamente la presencia de gránulos intracelulares de PHA, mientras que la segunda se refiere a la cuantificación de PHA en cultivos mixtos usando cromatografía de gases.

5.2 Técnica cualitativa: tinción con Negro de Sudán

5.2.1 Antecedentes

Gran parte de los estudios de las morfologías y agrupaciones celulares de los microorganismos se realizan a partir de preparaciones teñidas. Teñir se refiere a colorear los microorganismos con un colorante que resalta algunas estructuras. (Tortora, et al., 1993).

Las tinciones se pueden clasificar en:

- ◆ Tinciones simples: Utilizan un solo colorante y permiten conocer la morfología y tipo de agrupación bacteriana.

- ◆ Tinciones diferenciales: Utilizan más de un colorante y sirven para poner de manifiesto las características de afinidad por ciertos colorantes de los microorganismos. Como ejemplos están:
 - Tinción Gram.
 - Tinción ácido- alcohol resistente.
- ◆ Tinciones Estructurales: Utilizan más de un colorante y sirven para poner de manifiesto estructuras bacterianas. Algunos ejemplos son:
 - Tinción de flagelos.
 - Tinción de esporas.
 - Tinción de cápsulas.
 - Tinción de corpúsculos metacromáticos.

Preparación de la muestra

Los pasos a seguir para la realización de una preparación fijada y coloreada son: limpieza del portaobjetos, preparación del frotis, secado, fijación y coloración.

- ◆ **Limpieza de los portaobjetos:** Ésta es fundamental para obtener buenas preparaciones. Una buena técnica consiste en sumergirlos, al menos 24 horas, en una mezcla de alcohol de 90° (9 partes) y ácido clorhídrico (1 parte). En el momento de su uso se lavan con agua y se secan con un paño limpio que no deje pelusas, o bien puede hacerse en la estufa. La limpieza también puede hacerse por inmersión en mezcla sulfocrómica y posteriormente aclarando en agua destilada.

- ◆ **Preparación del frotis:** Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota del material que se va a teñir (si es líquido) o se hace rodar el hisopo con que se tomó la muestra. Una vez que el hisopo ha tocado la superficie del portaobjetos, que no está estéril, ya no puede ser empleado para inocular los medios de cultivo. Puede usarse una aguja estéril para transferir una pequeña cantidad de un cultivo bacteriano a la superficie del portaobjetos. Este material es suspendido en una gota de agua o solución salina previamente colocada sobre el portaobjetos. Cuando se trata de colonias muy pequeñas que pueden perderse en una gota de líquido se emplea una varilla delgada de madera estéril con la cual se toca la colonia obteniéndose así una fracción apreciable del desarrollo. También se puede extender con el asa de platino. El material se frota directamente sobre el portaobjetos, donde puede visualizarse con facilidad.
- ◆ **Secado:** Se dejará secar al frotis a temperatura ambiente. Se puede agitar varias veces el portaobjetos al aire hasta comprobar, por el cambio de aspecto de la preparación, que ésta se ha secado.
- ◆ **Fijación:** Tiene como objetivo la inmovilización de las estructuras del material a estudiar en un estado lo más próximo posible al estado vivo. Consiste en una muerte rápida de los microorganismos, causada por la coagulación de las albúminas protoplasmáticas. Las formas más habituales de fijación son por el calor o con alcohol en frío.
- ◆ **Coloración:** Para teñir los microorganismos existe un gran número de productos químicos con propiedades colorantes. Su elección está

condicionada al tipo de tinción a realizar. Todos los tiempos recomendados en las tinciones son orientativos, debiéndose ensayar el tiempo ideal para cada lote de colorantes y cada técnica en particular.

- ◆ **Lavado:** Eliminación del exceso de colorante; utilizando el frasco lavador, teniendo la precaución de no dirigir el chorro directamente al frotis.
- ◆ **Secado:** Se secará la preparación al aire.

Colorantes

Los colorantes son los reactivos necesarios para la coloración de las tinciones, que facilitan la observación de las mismas al microscopio. La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Generalmente actúan mediante reacciones de intercambio iónico entre el colorante y los elementos celulares.

El uso de colorantes para detección cualitativa de diversos compuestos en cultivos celulares es un método muy utilizado.

Según su procedencia, pueden clasificarse en:

- ◆ Colorantes naturales: son los que se extraen de animales o de plantas.
- ◆ Colorantes artificiales: son los que se obtienen de forma sintética.

Químicamente se pueden clasificar en:

- ◆ Básicos: son colorantes nucleares.
- ◆ Ácidos: son colorantes citoplasmáticos.
- ◆ Neutros: asocian un colorante ácido con uno básico.
- ◆ Indiferentes: suelen ser insolubles en agua y solubles en alcohol (tal es el caso de negro de Sudán empleado aquí).

Técnica de tinción ocupada

La técnica de tinción usada para detectar la presencia de PHA corresponde a una de tinción de cápsulas, donde la cápsula es una capa mucosa, más o menos gruesa, que envuelve la pared celular de algunas bacterias. Está compuesta de polisacáridos, mucopolisacáridos o polipéptidos. A consecuencia de su elevado contenido en agua, se tiñe débilmente por los colorantes.

Existen dos colorantes específicos indiferentes para la técnica cualitativa a realizar, para PHB el azul de Nilo y para PHA el negro de Sudán. Se utilizó solo el negro de Sudán como técnica cualitativa para detectar la producción de PHA en los cultivos mixtos, pues se suponía que no sólo se producía PHB, sino también PHV o algunos copolímeros (Ostle y Holt, 1982).

El colorante negro de Sudán B ($C_{26}H_{24}N_{4}O$) es un lisocromo o sustancia liposoluble (tinte soluble en lípido), que se combina con los materiales lipídicos de la célula, para revelar la localización de las gotículas o depósitos de grasa. Es

usado para la tinción de triglicéridos neutrales y lípidos. Cuando se aplica a células tiñe los gránulos de PHA presentes en la célula.

La safranina es un colorante básico rosa usado en histología y citología. La safranina es usada como un tinte de contraste para la coloración de células, ya que tiñe las paredes celulares de rosa dejando cualquier otro compuesto sin teñir.

Burdon (1946) investigó la tinción de bacterias con negro de Sudán y safranina para detectar presencia de PHB en ellas. Los gránulos de PHA se tiñen de negro y las paredes celulares de rosa; así se puede detectar la presencia de este compuesto al ser visto al microscopio óptico.

5.2.2 Descripción

Para realizar esta técnica se necesitan dos soluciones (Jenkins 1993):

- 1) Solución de negro de Sudan B al 0.3% w/v en 60% de etanol.
- 2) Solución acuosa de safranina al 0.5% w/v

El procedimiento para la realización de la técnica se detalla a continuación:

- ◆ Poner la muestra en el portaobjetos y colocarla en la estufa durante una hora para que se fije.

- ◆ Dejar la muestra 10 minutos con la solución 1; si se llega a lavar la muestra se coloca más solución.
- ◆ Después se enjuaga con agua un segundo.
- ◆ Dejar 10 segundos con la solución 2, enjuagar con agua, limpiar y secar.
- ◆ Examinar con aceite de inmersión a 1000X con iluminación directa.

5.3 Cromatografía de gases

5.3.1 Antecedentes

5.3.1.1 Separaciones cromatográficas

La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas (Pecsok 1983).

Es difícil definir con rigor el término de cromatografía porque el concepto se aplica a una gran variedad de sistemas y técnicas. Sin embargo, todos estos métodos tienen en común el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla se pasan a través de una fase estacionaria mediante

el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil.

5.3.1.2 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos son de dos tipos fundamentales. En la cromatografía en columna la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil se hace pasar por el tubo, con presión o por gravedad. En la cromatografía plana la fase estacionaria está sujeta por una placa plana o en los poros de un papel. En este caso la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por la acción capilar o por la influencia de la gravedad.

5.3.1.3 Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases, debido al riguroso control a que se somete cada una de las variables que intervienen en el proceso, pueden utilizarse no solo para separar, sino también como método de identificación y determinación cuantitativa de cada componente, siempre que se reúnan ciertas condiciones que a veces son difíciles de obtener.

Los cromatógrafos de gases contienen esencialmente:

- ◆ Una fuente de gas comprimido. Proporciona la fase móvil (gas portador); los gases más utilizados son hidrogeno, helio, nitrógeno y argón.
- ◆ Un regulador de presión o flujo del gas portador.
- ◆ Inyector. Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente de gas portador. Existe cierta variedad de diseño según el tipo de muestra que se trata de analizar. El más común es el inyector de líquidos que puede utilizarse para sólidos (en disolución) y gases (mediante jeringas especiales): Se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente a una temperatura superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra.
- ◆ Columna cromatográfica
- ◆ El horno, en cuyo interior se sitúa la columna que debe poseer una buena regulación de temperatura.
- ◆ El detector. En un dispositivo que permite medir de manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia a analizar.
- ◆ Sistema electrónico de amplificación y medida de la señal eléctrica enviada por el detector y registrador de la misma.

5.3.1.4 Extracción y cuantificación de PHAs por cromatografía de gases

El método más común disponible en la actualidad para el análisis de PHAs en las células bacterianas es la cromatografía gaseosa (GC). El método de GC involucra la hidrólisis y metanólisis subsecuente del PHA en las células enteras en la presencia de ácido sulfúrico y cloroformo. Este método es muy laborioso e involucra el uso extenso de solventes. Originalmente fue propuesto por Braunegg et al., (1979) y después se profundizó y modificó por Comeau et al., (1988).

El método de extracción involucra una hidrolización del polímero y la conversión a un metilo-éster del fragmento del monómero 3-hidroxicanoato (3HA). Una solución de alcohol acidificada (es decir ácido sulfúrico con metanol) y un solvente (cloroformo) se agregan a la muestra que se digiere a 100°C. Después se separan las fases para su respectiva cuantificación en el cromatógrafo de gases. Se ha modificado este método para la cuantificación de PHB a través del uso de un solvente diferente (dicloroetano) e incluso se ha usado otra solución de alcohol acidificado (HCl con alcohol propílico). (Oehmen et al., 2005).

Varios grupos de investigación demostraron una alta eficiencia en la cuantificación de polihidroxibutirato (PHB) a pesar de las variaciones en el solvente (cloroformo, dicloroetano, diclorometano) y en las soluciones con alcohol acidificado (por ejemplo el ácido sulfúrico en el metanol o el HCl con alcohol propílico).

Hay actualmente muchas variaciones al método de extracción usando cloroformo y alcohol acidificado, pero todavía no se conocen las ventajas o desventajas si se llegan a variar las concentraciones de cualquiera de estas soluciones. La concentración del ácido sulfúrico en el metanol ha sido variada de 3% a 10% e incluso al 20%. Otros han variado el tiempo de extracción de 3.5 h a 6 h e incluso a 20 h.

El método de GC que se escogió para el análisis de PHAs, haciendo uso de un procedimiento de extracción con ácido sulfúrico en solución con metanol y utilizando el cloroformo como solvente. (Oehmen et al., 2005).

5.3.2 Descripción del método de cuantificación de PHA empleado

Una muestra de 10 ml es tomada del reactor. Se le agregan 5 gotas de formaldehído al 7% para detener inmediatamente cualquier actividad de degradación de PHA. Se centrifuga la muestra durante 5 min a 5000 rpm y se retira el sobrenadante. La muestra se deja secar una noche en el horno a 120 °C para evaporar toda el agua; esta es una modificación al método usual que requiere liofilizar la biomasa y que hace menos tardado el proceso y ha demostrado que no interfiere con los resultados esperados, ya que se hicieron experimentos con ambos métodos para comprobarlo. (Gurieff y Lant, 2007).

Cuando se seca la biomasa se deja enfriar y se agregan 2 ml de metanol acidificado y 2 ml de cloroformo. Las muestras se digieren a 100°C durante 20 horas. El metanol acidificado se usa con 3% de ácido. Al terminar la digestión las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se les agrega 1 mL de agua para alcanzar la separación de fases. Se deja sedimentar una hora y se toma la fase orgánica de la muestra que se encuentra en la parte inferior del vial, se hace con pipetas de vidrio para evitar que el cloroformo arrastre polímero de pipetas de plástico e interfiera con el resultado. La muestra se pasa por el cromatógrafo de gases.

Para la cromatografía de gases se utiliza una curva de calibración con 4 estándares que se encuentran en un rango de acuerdo a las concentraciones esperadas de PHA, utilizando como estándar un copolímero PHB-PHV. De acuerdo a los resultados esperados en este caso se utilizan estándares de 1, 2, 4 y 6 mg para las curvas de calibración.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Estudios de ciclo

Se realizaron 4 estudios de ciclo de 6 horas en donde se obtuvieron diversos resultados, tal como se ha descrito anteriormente. Se tomaron muestras para realizar técnicas analíticas de SST, DQO, COT, y PHA por cromatografía en diferentes tiempos (Serafim, et al., 2004). El más representativo de estos ciclos fue el tercer ciclo, debido a que el reactor ya se encontraba aclimatado. En la tabla 6.1 se presentan algunos resultados.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Hora</i>	<i>peso A</i>	<i>peso B</i>	<i>peso C</i>	<i>SST (mg/l)</i>	<i>SSV (mg/l)</i>	<i>DQO</i>	<i>pH</i>	<i>COT mgC/L</i>	<i>COT(AGV) mgC/L</i>
0	08:00	0.1235	0.1339	0.1274	2080	1300	1623	8.24	33.35	88
15	08:15	0.1256	0.1330	0.1287	1480	860	1396	8.68	34.54	80
30	08:30	0.1235	0.1291	0.1253	1120	760	1393	9	24.46	0
45	08:45	0.1253	0.1327	0.1276	1480	1020	1400	9.28	12.87	0
60	09:00	0.1246	0.1316	0.1265	1400	1020	1379	9.34	5.96	0
90	09:30	0.1252	0.1326	0.1277	1480	980	1415	9.36	4.09	0
120	10:00	0.1250	0.1308	0.1270	1160	760	1369	9.34	7.87	0
150	10:30	0.1236	0.1295	0.1251	1180	880	1381	9.35	6.8	0
180	11:00	0.1242	0.1315	0.1267	1460	960	1395	9.33	7.12	0
240	12:00	0.1250	0.1316	0.1273	1320	860	343	9.32	7.34	0
300	13:00	0.1286	0.1359	0.1300	1460	1180	56	9.46	6.64	0
360	14:00	0.1285	0.1354	0.1297	1380	1140	56	9.38	5.92	0

Tabla 6.1 Resultados de un estudio de ciclo.

En los siguientes apartados se comentan algunos de estos resultados, además de reportar y comentar los resultados obtenidos con las técnicas cualitativas y cuantitativas de detección de presencia de PHAs en cultivos mixtos.

6.2 Resultados de técnicas analíticas estándar

Desde que se ocuparon los lodos activados de la planta de tratamiento de agua residual municipal C.U. se tomaron mediciones SST y SSV (figura 6.1), en el reactor SBR donde se observa que mientras se acondiciona el reactor existe varianza de los mismos, aproximadamente fue un mes para que los lodos activados se acondicionaran y esto se puede ver en la gráfica, donde se vuelve una tendencia lineal.

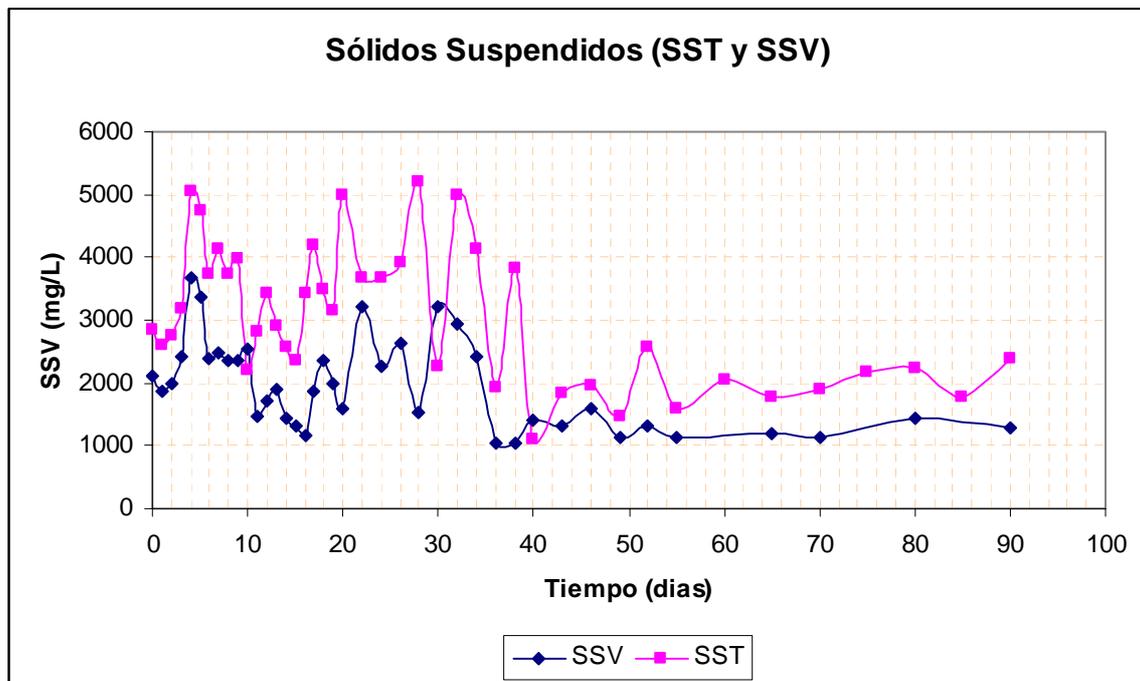


Figura 6.1 Monitoreo de los SST y SSV durante el periodo de 90 días.

Una curva de la evolución de los sólidos suspendidos durante un ciclo de enriquecimiento selectivo se muestra en la figura 6.2. Se observa que aparentemente al inicio del ciclo disminuyen por la dilución y existen algunos cambios a lo largo del ciclo, pero éstos se mantienen aproximadamente

constantes. Cabe resaltar que la técnica analítica tiene una alta incertidumbre, por lo que las variaciones observadas no son significativas.

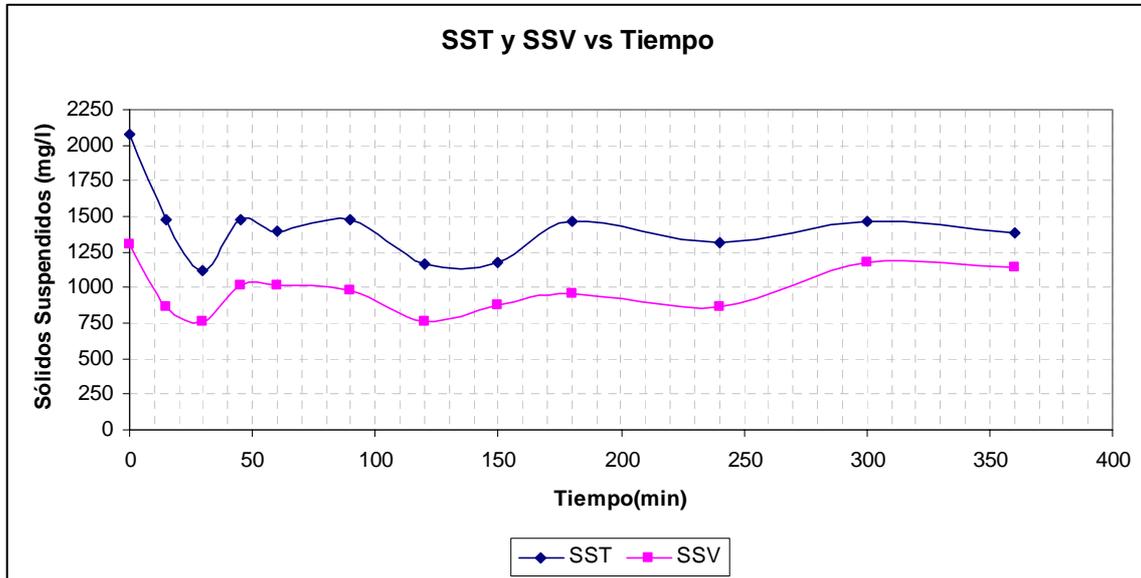


Figura 6.2 SST y SSV del tercer estudio de ciclo.

La evolución del carbono orgánico total (COT) y del pH se muestran en la figura 6.3. El COT, tal como se esperaba, desaparece al terminar la fase de abundancia de sustrato, y es en este momento que se supone que existe la mayor acumulación de PHA; esto sucede en la primera hora. Por otro lado el reactor presenta un aumento mínimo alcalino del pH, debido a una disociación de los ácidos grasos. Este aumento de pH concuerda con la disminución pronunciada del carbono, demostrando que existe un equilibrio entre el ácido acético y el ácido propiónico y no se difunden intracelularmente en los microorganismos de los 100 minutos en adelante.

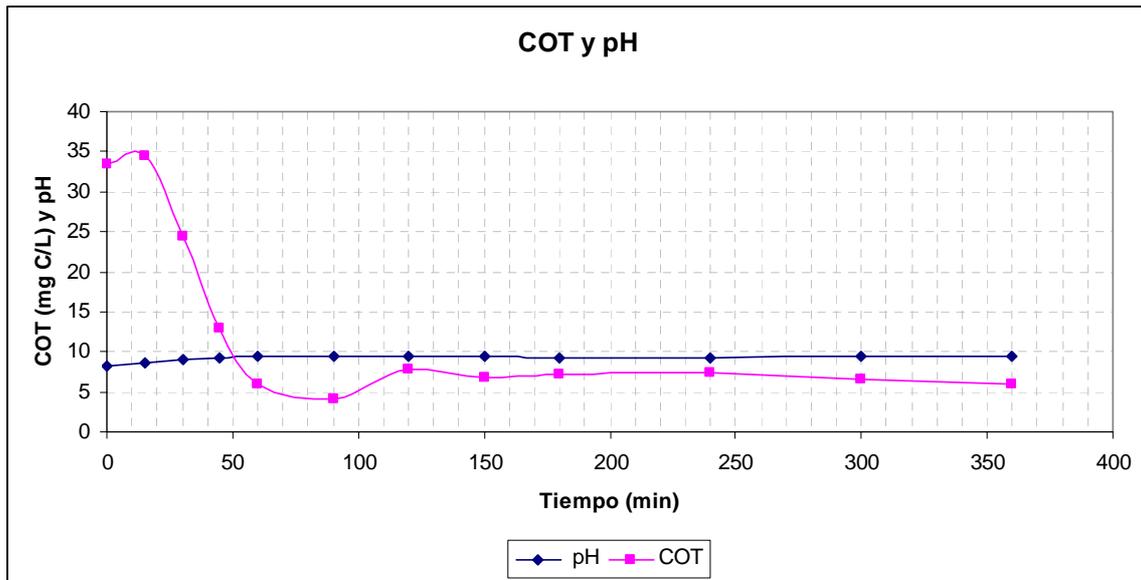


Figura 6.3 Carbono Orgánico Total (COT) y pH.

Aunque se ha dicho que el pH es un parámetro de control de gran importancia, y se han realizado estudios donde la variación del mismo repercute en el rendimiento del PHA, la experiencia durante el desarrollo de este trabajo fue que era mejor dejar que alcanzara su equilibrio sin forzarlo; es decir, un control muy severo del pH puede resultar contraproducente.

La disminución en el COT también coincide, como era de esperarse, con el agotamiento de los ácidos grasos volátiles, los cuales son consumidos aproximadamente a la media hora del inicio del ciclo. Este se ilustra en la figura 6.4 para el tercer estudio de ciclo.

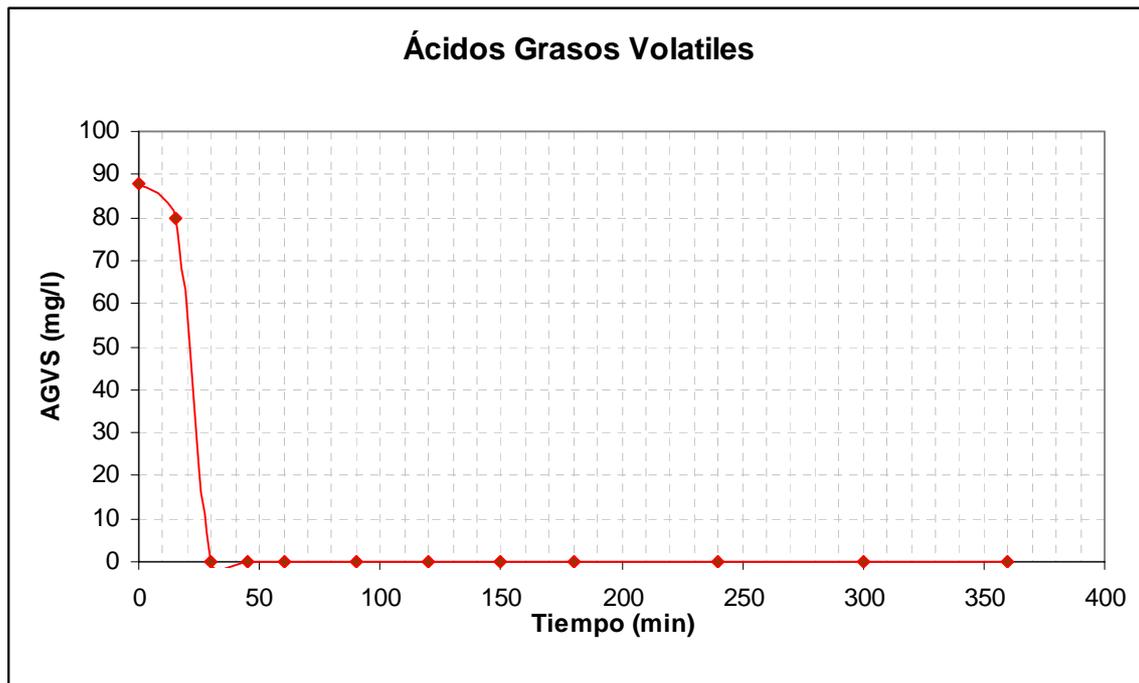


Figura 6.4 Consumo de ácidos Grasos Volátiles en el tercer ciclo.

6.3 Determinación cualitativa de PHA

La técnica cualitativa de tinción con negro de Sudan se realizó para observar la presencia de PHB. En caso de existir se presenta una coloración en los gránulos intracelulares de color azul-negro y el citoplasma aparece de color rosa.

En la figura 6.5 no se observa la presencia del PHB, esto se debe a que las condiciones de reactor de enriquecimiento selectivo (SBR) no son las adecuadas.

En las siguientes imágenes de las figuras 6.6 a 6.8 se muestran algunos de los resultados óptimos obtenidos; cuando reactor se encuentra funcionando adecuadamente. La muestra fue tomada al final de un ciclo del reactor de

enriquecimiento selectivo (SBR). Donde se observa la presencia de PHA en los gránulos teñidos de negro y las paredes rosadas (Burdon, 1946).

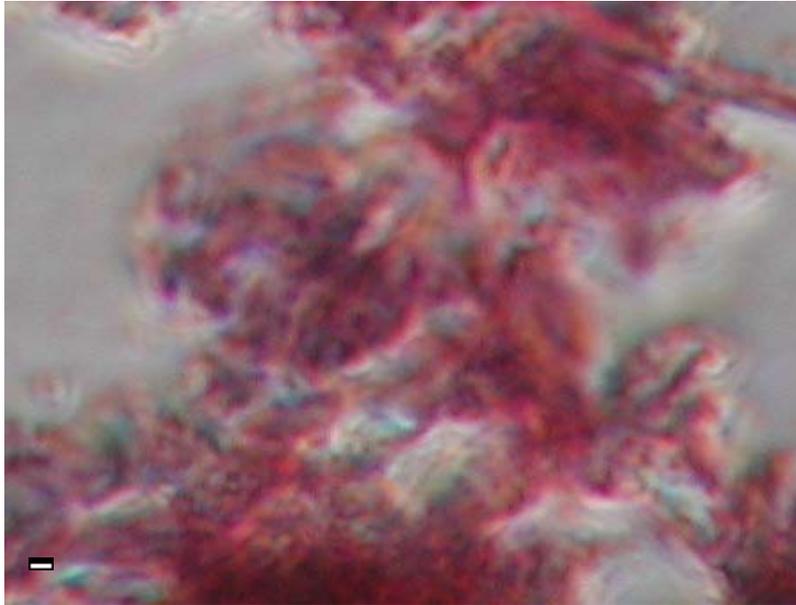


Figura 6.5 Ausencia de PHB (objetivo 100X, barra 2.0 μ m)

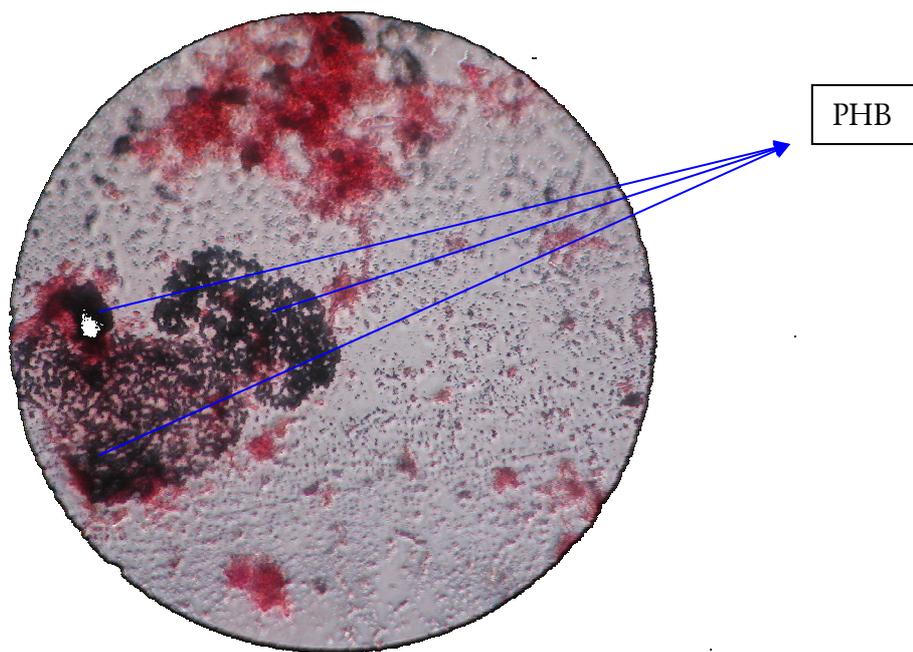


Figura 6.6 Muestra 1 en el microscopio (objetivo 100X).

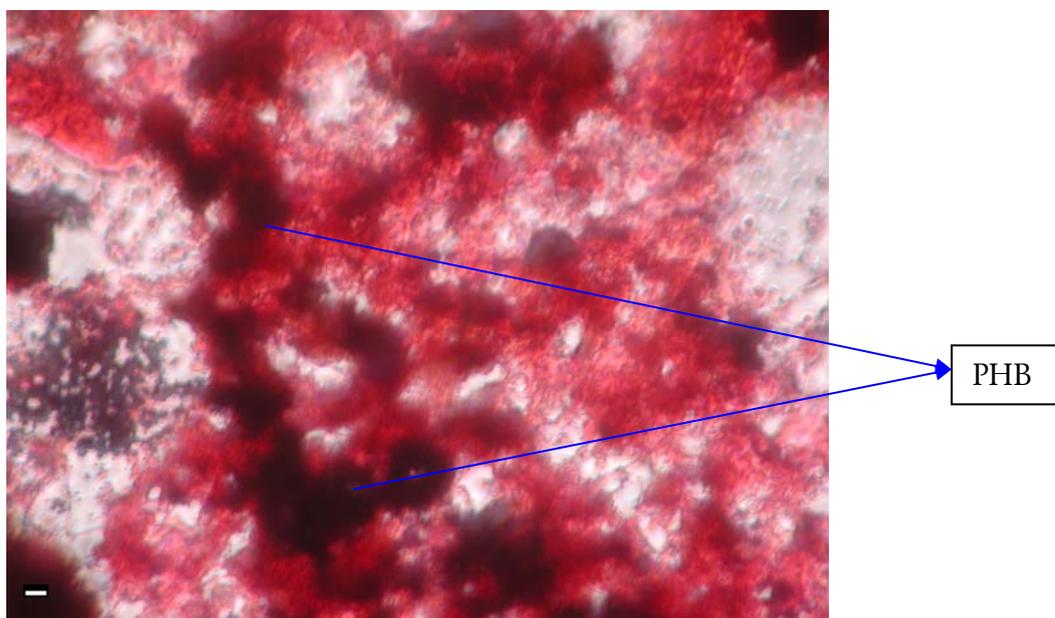


Figura 6.7 Muestra 2 en el microscopio (objetivo 100X, barra 2.0 μ m).

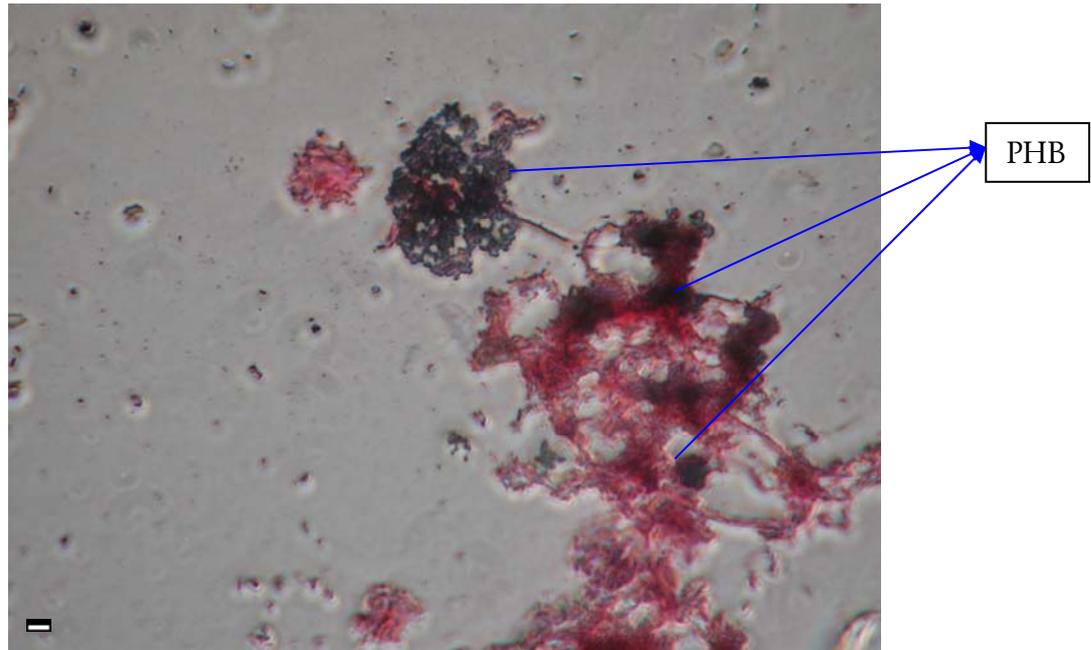


Figura 6.8 Muestra 3 en el microscopio (objetivo 100X, barra 2.0 μ m).

De las tinciones realizadas, se observó la presencia de PHB, pero no se sabe que cantidad hay de él, por lo cual la técnica cualitativa es un método exploratorio para saber si existe PHB. Por otra parte tampoco se puede detectar si existen otros tipos de PHA. Sin embargo sirvió para conocer si las condiciones del reactor eran adecuadas para producir PHA.

6.4 Cuantificación de PHA por cromatografía de gases

Aunque es notoria la presencia de PHA como gránulos intracelulares al realizar las tinciones, la cuantificación de este compuesto no arrojó resultados favorables. Los resultados obtenidos son diferentes a los esperados (Oehmen et al., 2005). En la figura 6.9 se observa el cromatograma del estudio de ciclo estudiado comparado con el estándar del copolímero PHB:PHV (Sigma Aldrich). Donde los picos fueron

imperceptibles, por lo que se asumió que había poca concentración de PHA en las muestras. Esto se puede deber a que la técnica de cromatografía de gases era hecha por primera vez y se procedió a realizar algunos cambios en la agitación (200 rpm, 300 rpm y 500 rpm), aireación hasta cambiar por lodo nuevo de la planta de tratamiento de agua residual del C.U.; ya que el lodo presento características cualitativas no deseables como cambio de color (café verdoso), consistencia viscosa mala sedimentación y mal olor. La figura 6.10, en cambio, muestra un cromatograma hecho posteriormente. Se observa una mayor producción de PHA, ya que se tiene un pico mas pronunciado en comparación del cromatograma anterior.

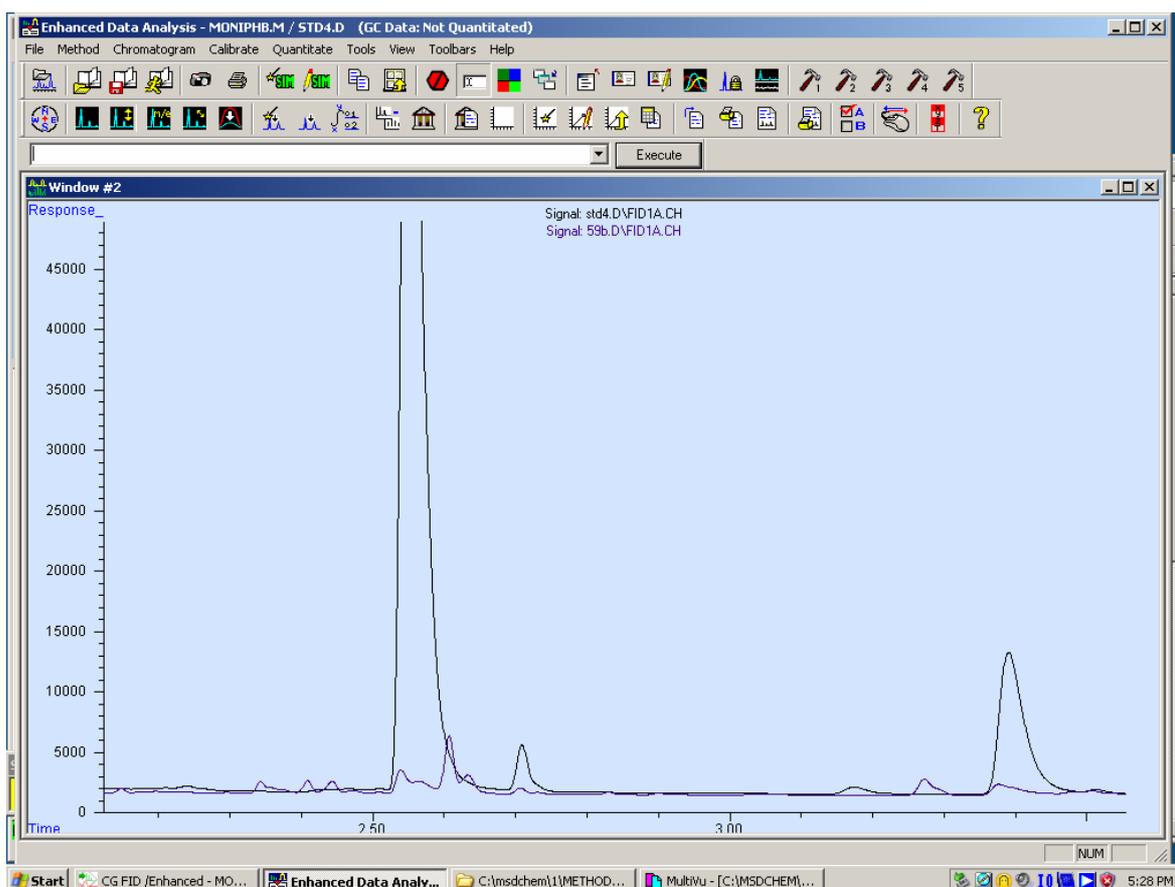


Figura 6.9 Cromatograma de un estudio de ciclo contra el estándar de PHB.

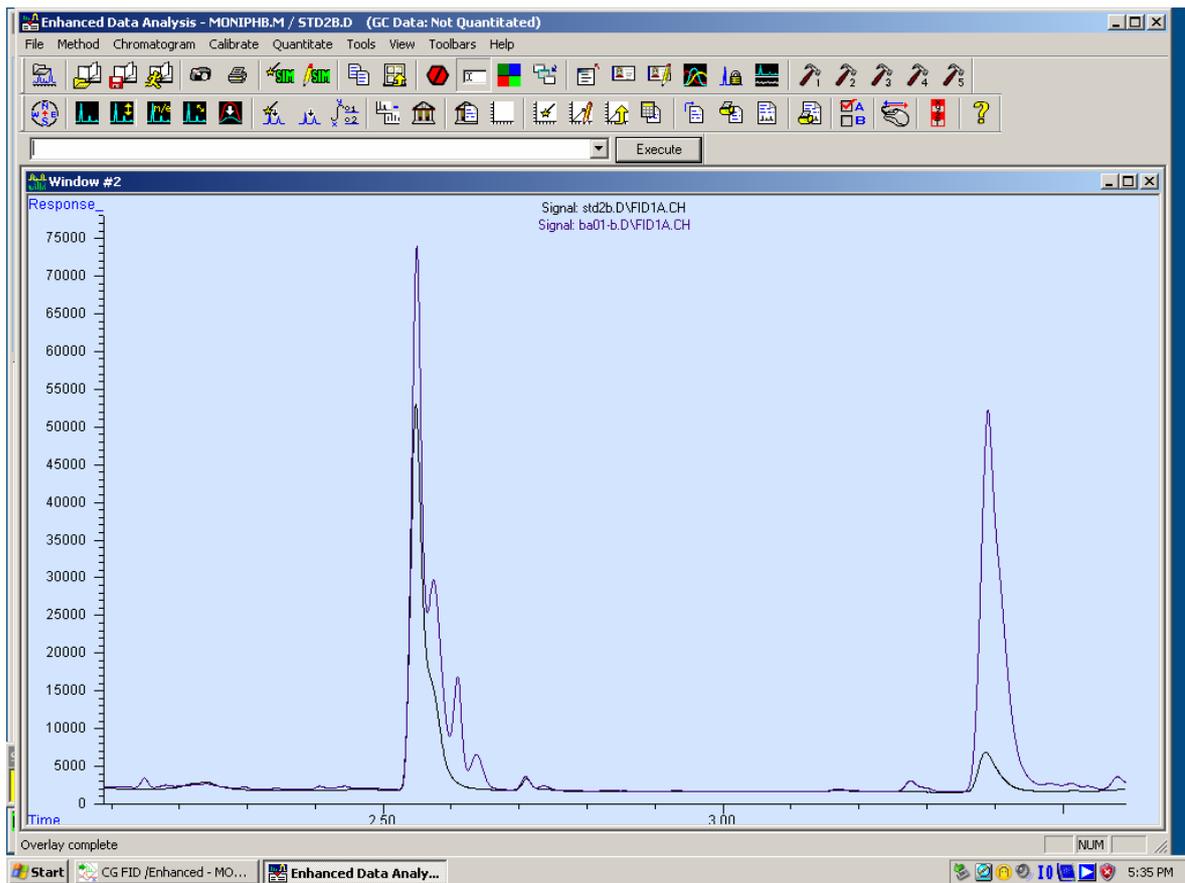


Figura 6.10 Cromatograma de un estudio del reactor de producción contra el estándar de PHB.

Al adecuar con mayor precisión la técnica de cromatografía y mejorando las condiciones del reactor de enriquecimiento se infiere que existe mayor producción de PHA. Entre los factores que hicieron esto posible fueron que la alimentación se realizó por separado, el medio mineral y los ácidos grasos volátiles por separado. También que se debe de mantener en refrigeración la alimentación para que no sea afectado por organismos externos al biorreactor.

Sin embargo la técnica es cara y existen restricciones para realizar dicha técnica, entre ellas el cambio de columna del cromatógrafo, y la limpieza del material donde se recomienda que sea nuevo, para que no presente ninguna alteración externa.

Por otra parte la cromatografía de gases requiere de mayor tiempo en la preparación de muestra y lecturas, que las otras técnicas. Debido a esto no se obtienen resultados inmediatos que puedan ser parámetro de decisiones en el transcurso del proceso. Se observa que la técnica produce efluentes de desechos tóxicos (solventes).

7. CONCLUSIONES

Se monitoreo la producción de polihidroxialcanoatos (PHA-plásticos biodegradables) en un sistema de biorreactores piloto experimental.

Se implementaron técnicas analíticas estándar para monitoreo de biorreactores, así como las técnicas cualitativas y cuantitativas de detección de presencia de PHA intracelular.

El reactor de enriquecimiento selectivo logró el objetivo de mantener biomasa y seleccionar aquella capaz de almacenar PHA a partir del uso de cultivos mixtos y agua residual sintética con alto contenido de AGVs como sustrato. Las condiciones de aclimatación fueron adecuadas en el reactor de enriquecimiento y los microorganismos activos fueron aptos para la producción de PHAs.

Se adecuaron y mejoraron las técnicas de cuantificación existentes, para la determinación de PHAs. Un correcto monitoreo de esta variable en un futuro permitirá incrementar la productividad del mismo en el sistema. La técnica de cuantificación por cromatografía de gases parece ser la más adecuada por el momento para seguir la acumulación y consumo de PHAs en cultivos mixtos.

En el método de cuantificación por cromatografía se encontraron mejores resultados cuando se suministró por separado la alimentación y el medio mineral. A pesar de que es un método lento, presenta resultados óptimos en comparación de las otras técnicas. En investigaciones posteriores se debe tratar con los solventes tóxicos que genera dicha técnica.

Una recomendación es que se debe revisar el inóculo de lodos activados provenientes de la planta de tratamiento de agua residual municipal antes de agregarlos al reactor, que en ocasiones es inactivo. Ante esta situación se debe cambiar el tiempo de las etapas del ciclo, porque se vuelve más lento el consumo de alimento. En estos casos el siguiente paso de esta experimentación consiste en recuperar el reactor, ya que se ha observado que a pesar de que los organismos flagelados pueden acumular PHA, no son deseables debido a que evitan la buena sedimentabilidad, llevando a un lavado del reactor. Esto fue notorio al observar al microscopio las muestras del reactor de enriquecimiento, ya que se detectó la presencia de muchos organismos flagelados que hacen que no sedimente bien el reactor y que han demostrado ser causantes de reactores con espuma. Sin embargo la tinción con negro de Sudán indicó la presencia de PHA acumulado en estos microorganismos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Arcos, M. V. (2007). Tesis: Degradación De Aguas Residuales Y Producción De Polihidroxicanoatos Mediante Un Biorreactor Discontinuo, Instituto de Ingeniería, México D.F.
- ◆ Baptist, J.N. (1962). Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid, US Patent Application 3 044 942.
- ◆ Baptist, J.N. y Weber, F. X. (1963). Molded product containing poly- β -hydroxybutyric acid and method of making, US Patent Application 3 107 172.
- ◆ Barnard, G. N. y Sanders, J.K.M. (1989). The Poly- β -hydroxybutyrate Granule in Vivo, *The Journal of Biological Chemistry* **264**(6):3286-3291.
- ◆ Beun, J.; Dircksb, K.; Van Loosdrecht, M. y Heijnen, J. (2002). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, *Water Research* **36**:1167–1180.
- ◆ Braunegg, G.; Sonnleitner, B. y Lafferty, R. (1979). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in bacterial biomass. *European Journal of Applied Microbiology & Biotechnology* **6**: 29-37.
- ◆ Burdon, K. (1946). Fatty acid material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations, *Journal of Bacteriology* **52**:665–678.

- ◆ Capon, R. J.; Dunlop, R. W.; Ghisalberti, E. L. y Jefferies, P.R. (1983). Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and fresh water cyanobacteria, *Phytochemistry* **22**: 1181.
- ◆ Comeau, Y.; Hall, K. y Oldham, W. (1988). Determination of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly-3-Hydroxyvalerate in Activated Sludge by Gas-Liquid Chromatography. *Applied Environmental Microbiology*. **54**:2325-2327.
- ◆ Davis, J. B. (1964). Cellular Lipids of a *Nocardia* Grown on Propane and n-Butane, *Appl. Microbiol.* **12**: 301-304.
- ◆ Dawes, E. A. y Senior, P.J. (1973). The role and regulation of reserve polymers in micro-organisms, *Adv. Microb. Physiol.* **10**:135-266.
- ◆ Dawes, E. A. (1990). Novel Biodegradable Microbial Polymers, *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands, pp 417-455.
- ◆ Delgado, A.; Prieto S.; Amich, S. y Salve, M.L. (1994). Laboratorio De Microbiología, *Mc Graw-Hill*, España, pp.53-70.
- ◆ De Smet, M. J.; Eggink, G.; Witholt, B.; Kingma, J. y Wynbert, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane, *J. Bacterial.* **154**: 870.
- ◆ Dionisi, D.; Majone, M.; Papa, V. y Beccari, M. (2004). Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Feeding, *Biotechnology and bioengineering* **85**:569-579.
- ◆ Doi, Y.; Segawa A.; Nakamura S.; y Kunioka M. (1990). Production of biodegradable copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. In: *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, Dawes, E. A., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 37-48.

- ◆ Doi, Y. (1990). *Microbial Polyesters*, 1era Ed. New York: VCH. 156 pp.
- ◆ Doudoroff, M. y Stainer, R. Y. (1959). Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria, *Nature* (London) **189**:1440-1442.
- ◆ Durán, M. C. (1994). Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria química y de proceso, Facultad de Química, UNAM, México D.F. pp.32-74.
- ◆ Fuller, R. C. y Lenz. R. W. (1990). Natural Plastics. *Natural History* **5**:82-84.
- ◆ Griffin, G.J.L. (1994). Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers, *Blackie Academic & Professional*, New York pp 22-117.
- ◆ Gross, R. A.; De Mello, C.; Lenz, R. W.; Brandl, H. y Fuller, R.C. (1989). Biosynthesis and characterization of poly(β -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*, *Macromolecules* **22**:1106- 1115.
- ◆ Gurieff, N. y Lant, P. (2007). Comparative Life Cycle Assessment and Financial Analysis of Mixed Culture Polyhydroxyalkanoate Production. *Bioresource Technology* **98**: 3393–3403.
- ◆ Haywood. G. W.; Anderson, A. J.; Williams, D.R. y Dawes, E. A. (1991). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*, *Internat J. Biol. Macromol* **13**:83.
- ◆ Holmes, P. A.; Wright, L. F. y Collins, S. H. (1982). Copolyesters and process for their production, *European patent* No. 69 497.
- ◆ Holmes, P.A. (1985). Applications of PHB a microbially produced biodegradable thermoplastic, *Phys. Technol.* **16**: 32-36.

- ◆ Howells, E. R. (1982). Opportunities in biotechnology for the chemical industry, *Chem Ind.* **15**: 508-511.
- Kansiz M.; Billman-Jacobe H. y Mcnaughton D. (2000). Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer poly(b-hydroxybutyrate) in a Recombinant Escherichia coli Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics, *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8):3415-3420.
- ◆ Khanna, S.; Ashok, K. y Srivastava (2004). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates elsevier, *Process Biochemistry* **40**:607–619.
- ◆ Kunioka, M.; Kawaguchi, Y. y Doi, Y. (1989). Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**:569.
- ◆ Lee, S. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**:1-14.
- ◆ Lemoigne, M. (1925). The origin of Mrydroxybutyric acid obtained by bacterial process, *C. R. Acad. Sci.* **180**:1539.
- ◆ Lenz, R.W. y Marchessault, R.H. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, *Biomacromolecules* **6**(1): 1-8.
- ◆ Macrae, R. M. y Wilkinson, J.F. (1958). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*, *J. Gen. Microbiol.* **19**:210-222.
- ◆ Merrick, J.M. (1978). Metabolism of reserve materials In "Photosynthetic Bacteria" (eds R.K. Clayton y W.R. Sistrom), Plenum Press, New York, pp. 199-219.

- ◆ Merrick, J.M. y Douderoff, M. (1961). Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid in Bacteria, *Nature* (London), **189**:890-892.
- ◆ Misra A.K.; Thakur M.S.; Srinivas P.; y Karanth N.G. (2000). Screening of poly--hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transforms infrared spectroscopy. *Departments of Fermentation Technology and Bioengineering and Plantation Products, Spices and Flavour Technology, Central Food Technological Research Institute*, 1217-1220.
- ◆ Misra, S.; Valappil, S.; Roy, I. y Boccaccini, A. (2007). Fabrication and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) composite containing bioglass, *Biomacromolecules* **7**:2249-2258.
- ◆ Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T. y Tonomura, K. (1999). Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polycaprolactone by Filamentous Fungi, *Journal of fermentation and bioengineering* **80**:265-269.
- ◆ Odham, G.; Tunlid; Westerdahl, G.; y Jefferies, P.R. (1986). Combined determination of poly- β -hydroxyalkanoic acid and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas Chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection, *Appl. Environ. Microbiol*, **52**(4): 905-910.
- ◆ Oehmen, B.; Keller-Lehmann, R. J.; Zeng, Z.; Yuan, J. y Keller (2005). Optimization of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems, *Journal of chromatography* **1070**: 131-136.
- ◆ Ostle, A. y Holt, J. (1982). Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology* **44**:238-241.
- ◆ Pal, S.; Patra, A. y Paul, A. (2007). Studies on intracellular degradation of polyhydroxyalkanoic acid–polyethylene glycol copolymer accumulated by

- Azotobacter chroococcum MAL-201. *Journal of Biotechnology* **132**: 325-330.
- ◆ Ramsay, B. A.; Ramsay, R. A. y Cooper, D.G. (1989). Production of poly- β -hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol*, **55**: 584.
 - ◆ Ramsay, J. A.; Berger, E. y Ramsay, B. A. (1990). Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment, *Biotechnol. Tech.* **4**(4): 221.
 - ◆ Reis, M.; Serafim, L.; Lemos, P.; Ramos, A.; Aguiar, F. y Van Loosdrecht M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **25**:377–385.
 - ◆ Reusch, R. N. (1989). Poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **191**:377-381.
 - ◆ Reusch, R. N. y Sadoff, H. L. (1983). D-()-Poly- β -Hydroxybutyrate in Membranes of Genetically Competent Bacteria, *J. Bacterial* **156**(2):778-788.
 - ◆ Reusch, R. N.; Sparrow, A. W. y Gardiner, J. (1992). Biological complexes of poly- β -hydroxybutyrate, *Biochim. Biophys. Acta.* **1123**, 33-40.
 - ◆ Rittmann, B.E. y McCarty, P.L. (2001). Environmental Biotechnology: Principles and Applications. *McGraw-Hill* Series in Water Resources and Environmental Engineering.
 - ◆ Ryu, H.; Hahn, S.; Chang, Y. y Chang, H. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes*

- eutrophus with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering* **55**: 28-32.
- ◆ Sans, F. R. y Ribas, J. P. (1989). Ingeniería Ambiental: Contaminación y tratamientos. *Marcombo, Boixareu*, España pp. 93-125.
 - ◆ Scherer, T.; Clinton, R.; Lenza, R. y Goodwin, S. (1999). Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters, *Polymer Degradation and Stability* **64**:267-275.
 - ◆ Serafim, L.; Lemos. P.; Oliveira, R. y Reis, M. (2004). Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions, *Biotechnology and bioengineering* **87**:145-160.
 - ◆ Shahhosseini, S. (2004). Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* **39**:963–969.
 - ◆ Sharp, D. W. A. (1980). The Penguin Dictionary of Chemistry, *Penguin Books*, Harmondsworth, Middlesex, England,p.320.
 - ◆ Skoog, D. (1992). Análisis instrumental, *Mc Graw Hill*, España 4 edición, pp. 200-250.
 - ◆ Stanier, R. Y.; Palleroni, N. J. y Doudoroff, (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**:159.
 - ◆ Steinbüchel, A.; Debzi E.- M.; Marchessault, R. H. y Timm, A. (1993). Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*, *Appl. Microbiol., Biotechnol.* **39**: 443-449.
 - ◆ Takabatake, H.; Satoh, H.; Mino, T. y Matsuo, T. (2000). Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process, *Water Science and Technology* **42**: 351-356.

- ◆ Tortora, G.J.; Funke B.R. y Case C.L., (1993). Introducción a la Microbiología, *Acribia*, S.A. (ed), Zaragoza, España pp. 61-87.
- ◆ Weibull, C. (1953). Characterization of the protoplasmic constituents of *Bacillus menaterium*, *J. Bacterial.* **66**:696.
- ◆ Williamson, D.H. y Wilkinson, J.F. (1958). The isolation and estimation of poly-hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* **19**:198.
- ◆ Yoshie, N.; Sakurai, M.; Inoue, Y. y Chûjô, R. (1992). Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) from threonine, *Macromolecules* **25**:2046-2048.