Universidad Nacional Autónoma de México

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN INGENIERIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

Evaluación de un sistema de producción de polihidroxialcanoatos usando lodos activados y biorreactores discontinuos

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

I N G . A M B I E N T A L - A G U A

P R E S E N T A :

Nancy Grisell Ramírez Herrera

TUTOR:

Dr. Alejandro Vargas Casillas

INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM

2009

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Secretario: Dr. Alejandro Vargas Casillas

Vocal: Dra. Mónica Meráz Rodríguez

1er Suplente: Dra. Gabriela Moeller Chávez

2do Suplente: Dr. Daniel Genaro Segura González

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Instituto de Ingeniería, UNAM Coordinación de Bioprocesos Ambientales

Instituto de Ingeniería, UNAM Campus Juriquilla, Querétaro

TUTOR DE TESIS:

NOMBRE

Dr. Alejandro Vargas Casillas

_____

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mi tutor el Dr Alejandro Vargas Casillas por aceptarme como su alumna de maestría, por sus enseñanzas, asesorías, motivación, amistad, amabilidad y por el apoyo constante en el proyecto.

Un agradecimiento especial al Dr. Germán Buitrón por el apoyo de los equipos de laboratorio y sus útiles consejos.

Agradezco al M . en B. Jaime Pérez Trevilla por la colaboración técnica, por ser mi amigo, por sus consejos, por ser una excelente persona y por todo el apoyo brindado. ¡MUCHAS GRACIAS!

Gracias a la M. en C. Gloria Moreno por su asesoría, por su apoyo incondicional dándome un espacio en Querétaro y por la amistad que me brindo.

Agradezco a mi Comité Tutoral en el transcurso de esta maestría, Dra Gabriela Moeller y Dr Víctor Luna Pabello.

Gracias a la Dra Mónica Meráz y el Dr Daniel Segura; por sus valiosas observaciones al trabajo.

Mil gracias a mis compañeras de trabajo, porque sin ellas no se habría podido realizar el proyecto, Nadima Simón, Luz Elena Aguirre y en especial a Mónica Arcos por sus consejos, apoyo y gran contribución en las técnicas de analíticas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por los significantes conocimiento adquiridos y por brindarme un panorama amplio en la actualidad, que me permitieron crecer como profesionista.

OTROS AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A **Dios** por permitirme cerrar otro ciclo en mi vida.

A mis **padres** Juan Manuel Ramírez y Guadalupe Herrera por darme su amor, apoyo incondicional y por darme fuerzas en seguir adelante.

A mis **hermanos** Ivan Elí por su asesoría y apoyo durante todos mis estudios, a Christián Agni por protegerme, cuidarme y ayudarme y por ultimo a mi hermano Misael por escucharme y apoyarme emocionalmente en duros momentos, siendo un gran amigo. ¡Los quiero mucho!

A mi querido **DAVID** ☺, por su amor sincero y puro, siendo mi apoyo incondicional, lo mas valioso e importante en mi vida, mi consejero, ¡mi mejor amigo!, mi **TODO**… Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi cuñada Claus por ser mi amiga y guía en mi vida. ¡Gracias!

A la Familia Sánchez López por ser mi segunda familia, mil gracias por su apoyo y cariño.

A la Familia Aguilar Treviño por el cariño que me transmitieron; en particular a la Sra. Leticia.

Un agradecimiento especial a Selene Alaide Cruz por su apoyo pero sobre todo por ser mi amiga en esta maestría.

Gracias a Carito Carvajal y Dorian Prato, por permitirme ser mis amigos, por su apoyo en mi viaje a Chile y por ser lindísimas personas.

A J.G.M. y G.M.J. mil gracias por su apoyo, las vivencias y experiencias que compartimos; en especial los momentos lunáticos llenos de estrellas.

Y por ultimo a mis amigos Myriam López y Oscar Trejo, que me brindaron alegría, sabios consejos y apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras iii
Lista de tablas v
Resumen vi
Abstract vii
Nomenclatura viii
Capítulo 1: Introducción 1
1.1. Panorama actual de los plásticos 2
1.2. Justificación 3
1.3. Hipótesis 4
1.4. Objetivo general 4
1.4. Objetivos específicos 4
Capítulo 2: Antecedentes 5
2.1. Plásticos 6
2.1.1. Características de los plásticos 6
2.1.2. El PHA como una alternativa ambiental 6
2.3. Polihidroxialcanoatos 8
2.3.1. Estructura y características del PHA 8
2.3.2. Producción de PHA bajo condiciones dinámicas 10
2.3.3. Procesos de producción en el mercado 12
2.4. Producción de PHAs con cultivos mixtos 14
2.4.1. Uso de cultivos mixtos 14
2.4.1.1. Factores que afectan la producción de PHA 18
2.4.1.1.1. Efecto de la fuente de Carbono 18
2.4.1.1.2. Efecto de la relación C/N 19
2.4.1.1.3. Efecto del pH 20
2.4.1.1.4. Efecto de la temperatura 20
2.4.1.1.5. Efecto del oxígeno disuelto 21
2.4.2. Acumulación de PHA en sistemas de tratamiento avanzados 22
2.4.3. Ventajas 23
2.5. Producción de PHAs con lodos activados 23
2.5.3. Investigaciones enfocadas en la producción de PHAs con lodos 23
Capítulo 3: Metodología 31
3.1. Sistema de producción de PHA usando lodos activados y biorreactores 32
3.2. Materiales 35
3.2.1. Inóculo 35
3.2.2. Características del Reactor de Enriquecimiento Selectivo 35
3.2.2.1. Características del RES en la UNAM-DF 35
3.2.2.2. Características del RES UNAM-Juriquilla 37
3.2.3. Características del Reactor de Producción 39
3.2.3.1. Características del RPP en la UNAM-DF 39
3.2.3.2. Características del RPP en la UNAM-Juriquilla 40
3.3. Métodos 41
3.3.1. Técnicas analíticas 41

3.4. Programa de control automático 43
Capítulo 4: Resultados y discusiones 46
4.1. Caracterización de la biomasa.....47
4.1.1. Caracterización de la biomasa del "Bloque I" UNAM-DF 47
4.1.2. Caracterización de la biomasa del "Bloque II" UNAM-Juriquilla 53
4.2. Resultados del Reactor de Enriquecimiento Selectivo 56
4.3. Resultados del Reactor de Producción 62
Capítulo 5: Conclusiones.....72
Capítulo 6: Recomendaciones.....74
Bibliografía.....76
Anexo A: Metabolismo bioquímico de la producción de PHAs.....A
Anexo B: Respirometria "Bloque I" UNAM-DF..... F
Anexo C: Análisis de SSV "Bloque II" UNAM-Juriquilla..... G
Anexo D: Respirometria "Bloque II" UNAM-Juriquilla..... G
Anexo E: Tabla de datos de productividad de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque I" UNAM-DF..... H
Anexo F: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque I" UNAM-DF..... H
Anexo G: Tabla de datos de productividad de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque II" UNAM-Juriquilla..... I
Anexo H: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque II" UNAM-Juriquilla..... I
Anexo I: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por Lote "Bloque I" UNAM-DF..... J
Anexo J: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por pulsos "Bloque I" UNAM-DF..... J
Anexo K: Respirometrías con diferente concentración "Bloque II" UNAM-Juriquilla.....K
Anexo L: Tabla con las pendientes de las respirometrías con diferente concentración "Bloque II" UNAM-Juriquilla..... N
Anexo M: Tabla de las respirometrías con diferente concentración "Bloque II" UNAM-Juriquilla ..... O
Anexo N: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por pulsos "Bloque II" UNAM-Juriquilla ..... O
Anexo Ñ: Análisis de la técnica de cuantificación de PHA..... P

LISTA DE FIGURAS

Figura *Página*

2.1. Estructura química general del polihidroxialcanoato 9

2.2. Alimentación dinámica aerobia 15

2.3. Rutas de producción de PHA en condiciones de abundancia/ayuno 16

2.4. Sistema propuesto para la producción de PHAs por lodos activados 25

2.5. Etapas de un reactor SBR 26

2.6. Diagrama de flujo del proceso propuesto para la producción de PHAs 27

2.7. OD_{max} y OD_{min} durante la alimentación de tres pulsos 30

3.1. Prototipo del diseño experimental 34

3.2. Control automático del sistema de producción de PHA 43

3.3. Gráfica de control de oxígeno disuelto, volumen, temperatura y flujo de aire 44

4.1. Monitoreo de los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) del RES 47

4.2. Evolución de la tasa de respiración durante el Bloque I 49

4.3. Evolución del COT durante un ciclo característico Bloque I 50

4.4. Tinciones con Negro de Sudán 51

4.5. Microfografías de biomasa teñida con negro de sudán y safranina (a) Ausencia de PHB (b) Presencia de PHB 51

4.6. Cromatograma de un estudio exploratorio del reactor de producción UNAM-DF 52

4.7. Monitoreo de los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) durante la Operación del bloque II (UNAM-Juriquilla) 54

4.8. Evolución de la tasa de respiración para el Bloque II 55

4.9. Cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo Bloque I UNAM-DF 56

4.10. Velocidad especifica de producción durante el Bloque I (UNAM-DF) 57

4.11. Cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo Bloque II (UNAM-Juriquilla) 58

4.12. Evolución de la velocidad especifica para el Bloque II 59
4.13. Evolución de PHA en peso seco celular para los Bloques I y II 60
4.14. Tiempo de retención celular en el RES 61
4.15. Cinética del régimen de alimentación en lote en el RPP del Bloque I (UNAM-DF) 63
4.16. Cinética del régimen de alimentación por pulso en el Bloque I (UNAM-DF) 64
4.17. Fracción de PHA en peso seco celular para el RPP bajo dos regímenes de alimentación en el Bloque I 65
4.18. Velocidad especifica de consumo de oxígeno contra concentración 66
4.19. Velocidad especifica de producción de PHA durante las pruebas respirométricas 67
4.20. Cinética usando un régimen de alimentación por pulsos automatizados en el RPP durante el Bloque II (UNAM-Juriquilla) 68
4.21. Comparación del peso seco celular del RES con el RPP 69
4.22. Comparación del peso seco celular del Bloque I con respecto al Bloque II 70

LISTA DE TABLAS

Tabla *Página*

2.1. Comparación de algunas propiedades del PET y PP con el PHB 8

2.2. Organismos almacenadores de PHA's 13

2.3. Propiedades mecánicas y térmicas de copolímeros P(3HB–co-3HV).... 19

3.1. Características del reactor SBR 35

3.2. Tiempo de un ciclo del RES en la UNAM-DF 36

3.3. Medio mineral de la alimentación del RES 37

3.4. Tiempo de un ciclo del RES en la UNAM-Juriquilla 37

3.5. Intervalos de muestreo del Reactor de Enriquecimiento 38

3.6. Intervalos de muestreo del Reactor de Producción 40

4.1. Resultados obtenidos en investigaciones recientes 71

RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son sintetizados por muchas especies de bacterias y Arqueas presentes en los lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales. Estos polímeros se acumulan en inclusiones intracelulares que son utilizados como reserva de carbono y energía, bajo condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo.

Los PHA son termoplásticos y poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo. Pueden ser totalmente degradados por las bacterias que los producen, así como por otras bacterias, hongos y algas. 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 aborda la puesta en marcha de un sistema de dos biorreactores discontinuos en serie para la producción de PHAs empleando agua residual con alta carga orgánica como fuente de carbono, proponiendo diferentes configuraciones de operación que hacen más eficiente el proceso y usando lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales como inóculo.

El sistema está diseñado en dos etapas: de enriquecimiento selectivo y de producción. En la primera se obtiene un consorcio microbiano apto para la acumulación de PHAs, imponiendo una presión selectiva ante el estrés generado por la inducción de períodos de ayuno y abundancia, teniendo como respuesta la acumulación de gránulos de polihidroxibutirato (PHB) intracelulares como reserva de carbono. En la segunda etapa los lodos enriquecidos son sometidos a un régimen de alimentación que incrementa su tasa de acumulación de PHA, obteniéndose una máxima acumulación de PHA de 64.09% en peso seco celular. El objetivo final es contar con un sistema que por un lado reduzca la cantidad de lodo purgado de una planta de lodos activados y por otro lado produzca PHAs.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are synthesized by many species of bacteria and Archae belonging to different genera found in the activated sludge of conventional wastewater treatment plants These polymers accumulate as intracellular inclusions that are used as carbon and energy reservoir, under conditions of growth characterized by an excess in the carbon source and by limitation of other nutrients, such as nitrogen or phosphorous.

PHAs are thermoplastics and possess similar properties to those of plastics derived from petroleum. They can be completely degraded by the bacteria that produce them, and by other bacteria, fungi and algae. In spite of the evident advantages of the PHAs compared to petrochemical plastics, their use is very limited due to their high production costs. For this reason, this project presents the experimental set-up of a system of two discontinuous reactors in series for the production of PHAs using wastewater with a high organic load as source of carbon, proposing different operation configurations that make the process more efficient and using activated sludge coming from a municipal wastewater treatment plant as inoculum.

The system is designed in two stages: selective enrichment and PHA production. In the first stage it is possible to select for the microorganisms accumulating PHAs, by imposing a selective pressure before the stress generated by alternating feast and famine periods, having as response the accumulation of polyhydroxybutyrate intracellular granules (PHB) as carbon. In the second stage, the enriched sludge is subjected to a feeding regime that increases its rate of accumulation of PHAs, obtaining a maximum accumulation of PHA of 64.09% cell dry weight. The final objective is to have a system, that on one hand, reduces the quantity of purged sludge of an activated sludge treatment plant, and on the other, produces PHAs.

NOMENCLATURA

Acum.	Acumulación de polihidroxialcanoato
AGVs	Ácidos Grasos Volátiles
ATP	Adenosina Trifosfato
CoA	Coenzima A
COT	Carbono Orgánico Total
CAT	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EBPR	Remoción de Fósforo Biológico
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
GAOs	Organismos Acumuladores de Glucógeno
HAc	Acetato
NADH	Nicotín Adenín Dinucleótido Reducido
NADPH	Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato Reducido
OD	Oxígeno Disuelto [mg/l]
PAOs	Organismos Acumuladores de Fosfato
PET	Polietileno Tereftalato
pH	Potencial de hidrogeno
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato
PLA	Ácido Poliláctico
PNUMA	Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente
q_p	Velocidad especifica de producción
RBCOD	Demanda Química de Oxígeno Rápidamente Biodegradable
RES	Reactor de Enriquecimiento Selectivo
RPP	Reactor de Producción de PHA
r.p.m.	Revoluciones Por Minuto
SBR	Sequencing Batch Reactor (Reactor Discontinuo Secuencial)
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
SST	Sólidos Suspendidos Totales
TRC	Tiempo de Retención Celular
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
UNAM-DF	Instituto de Ingeniería - UNAM, Coordinación de Bioprocesos Ambientales
UNAM-Juriquilla	Instituto de Ingeniería – UNAM Campus Juriquilla, Querétaro
X [mg] ó [mgDQO]	Biomasa activa en miligramos ó miligramos de DQO

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

C a p í t u l o 1

INTRODUCCIÓN

1.1. PANORAMA ACTUAL DE LOS PLÁSTICOS

Los plásticos, en su mayoría, son derivados del petróleo, aunque algunos se pueden obtener a partir de otras sustancias naturales. Algunas de las propiedades que los han hecho tan ampliamente usados son: la facilidad con que pueden ser moldeados, su impermeabilidad, su baja densidad, su baja conductividad eléctrica, su resistencia a la corrosión y su resistencia a diversos factores químicos y biológicos y, principalmente, su bajo costo. Sin embargo, han resultado inconvenientes por el manejo de los desechos que se generan con su uso.

En México, el consumo anual de plásticos por habitante en 2006 se estimaba en 43 kg del total consumido, que son más de un millón de toneladas por año. Una porción considerable va destinada a las celdas de confinamiento en rellenos sanitarios, donde no sólo ocupan espacio, sino que además tienen un tiempo de vida media muy largo. Según datos manejados por el PNUMA (Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente) en 1996, una botella de PET (polietileno tereftalato) tarda en degradarse 500 años dentro de un tiradero (ANIPAC, 2007).

Debido a esta problemática (sobreproducción y lenta degradación), se buscan otras alternativas, como son los biopolímeros, entre los que se encuentran los polihidroxialcanoatos (PHAs).

La principal ventaja de estos biopolímeros es que se biodegradan muy rápido, hasta un 80% en sólo siete semanas. La desventaja es que el proceso de elaboración es muy costoso; se calcula que producir por fermentación bacteriana un kilogramo de PHA cuesta 15 dólares americanos, mientras que hacer un kilogramo de plástico convencional cuesta sólo un dólar. Esto se debe a que las bacterias requieren fuentes externas de alimento costosas y los procesos de producción son complejos (Roselia, 2007). Entre las compañías importantes que producen biopolímeros se encuentran Zeneca, Monsanto, Metabolix (a partir de bacterias acumuladoras de PHA y de plantas transgénicas), Procter & Gamble y la empresa japonesa Kaneka Corporation.

Para disminuir los costos de producción recientemente se ha propuesto emplear cultivos mixtos provenientes de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que se ha observado que es posible favorecer el predominio de bacterias acumuladoras de PHAs en el cultivo mediante una operación adecuada del biorreactor de enriquecimiento de biomasa. Los sistemas de producción de PHAs se han hecho en dos pasos: seleccionando la biomasa con capacidad de almacenamiento del biopolímero (enriquecimiento selectivo); en la segunda etapa (producción de PHA) la alimentación de sustrato es suministrada por pulsos, de tal manera que los microorganismos especializados se saturen intracelularmente del biopolímero. Los resultados hasta el momento son muy prometedores, habiéndose reportado acumulaciones de hasta el 79% (Dionisi et al., 2004; Serafim et al., 2006; Arcos, 2007; Westerberg, 2007). También se ha visto que un proceso de producción de PHA usando cultivos mixtos podría ser económicamente viable (Gurieff y Lant, 2007).

En el presente trabajo se establecieron condiciones de operación para favorecer la acumulación del biopolímero, teniendo como meta obtener resultados de rendimiento iguales o mayores en comparación con estudios anteriores, mediante técnicas de control automático. La información obtenida sirve de base para trabajos futuros de modelación matemática del proceso con aguas residuales reales.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Para la producción de los PHAs a escala industrial se utilizan biorreactores con cepas puras (*Ralstonia eutropha, Escherichia coli, Pseudomonas putia,* etc.), pero el costo es muy elevado, ya que emplean como sustrato generalmente la glucosa y ácidos grasos volátiles. Esto hace que el proceso sea costoso. Este trabajo presenta una opción para reducir los costos mediante el uso de aguas residuales municipales, ya que bajo ciertas condiciones de operación, los microorganismos llevan a cabo la degradación de la materia orgánica presente en el agua hasta almacenar PHAs en forma de inclusiones intracelulares. Con esto se busca proponer un sistema de producción de plásticos biodegradables a partir de un desecho industrial, resultando en beneficios económicos y ambientales.

1.3. HIPÓTESIS

Los lodos activados de plantas de tratamiento de agua residual municipal son susceptibles de ser aclimatados para la acumulación de polihidroxialcanoatos y mediante una operación adecuada del sistema productor de estos polímeros es posible alcanzar acumulaciones superiores al 60% en peso seco celular.

1.4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de polihidroxialcanoatos (plásticos biodegradables) en un sistema de dos biorreactores piloto experimental y evaluar configuraciones y modos de operación que hagan más eficiente el proceso.

1.5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer condiciones de operación adecuadas para el reactor de enriquecimiento selectivo (concentración óptima de alimentación, TRC y pH), con el fin de obtener una biomasa con capacidad de almacenamiento de PHA a partir de lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales.

- Probar una estrategia de alimentación controlada para el biorreactor de producción de PHA, buscando maximizar la acumulación intracelular del bipolímero.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

C a p í t u l o 2

ANTECEDENTES

2.1. PLÁSTICOS

2.1.1. Características de los plásticos

Los plásticos han sido una parte importante en la vida contemporánea de la humanidad gracias a sus propiedades deseables, que incluyen la durabilidad y la resistencia a la degradación (Lee, 1996).

Los plásticos no degradables acumulan como desecho sólido millones de toneladas por año. Recientemente, debido al problema de contaminación global y la sobreproducción de los residuos sólidos se ha creado un gran interés en el desarrollo de plásticos biodegradables que tengan las mismas propiedades físicas y químicas de los plásticos sintéticos convencionales (Lee, 1996).

Algunos de los plásticos biodegradables en desarrollo incluyen a los PHAs, los poliláctidos, los poliésteres alifáticos, los polisacáridos y los copolímeros y/o mezclas de estos. (Lee, 1996).

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. Entre toda la variedad de plásticos biodegradables, el polihidroxialcanoato (PHA) ha llamado mucho la atención porque sus propiedades son similares a las de algunos plásticos convencionales como el polipropileno y además es 100% biodegradable (Lee, 1996).

2.1.2. El PHA como una alternativa ambiental

Los PHAs (polihidroxialcanoatos), que incluyen al PHB (polihidroxibutirato), son formados y acumulados por varias especies de bacterias y Arqueas bajo condiciones de crecimiento desequilibrado. Estos polímeros se han encontrado en el lodo del alcantarillado y en sedimentos marinos (Jianyu, 2001).

Los PHAs han sido estudiados exhaustivamente durante la remoción de fósforo biológico en aguas residuales, en el cual el fosfato es tomado bajo condiciones aerobias a expensas de la descomposición del PHA. Este mismo se forma de los ácidos orgánicos como el ácido acético bajo condiciones anaerobias (Jianyu, 2001).

Los PHAs son una buena alternativa para sustituir a los plásticos sintéticos que son utilizados como empaques con un ciclo de vida corta. Estos polímeros tienen propiedades mecánicas similares a los polímeros sintéticos como el polipropileno y además son biodegradables en el medio ambiente (ver la Tabla 2.1)(Patnaik, 2005). Algunos procesos innovadores han sido investigados para producir PHAs con sistemas simultáneos de componentes orgánicos de aguas residuales con residuos industriales o municipales. En tratamientos biológicos o químicos convencionales de residuos orgánicos, resulta interesante cuando se tiene una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) como por ejemplo la industria procesadora de alimentos (Jianyu, 2001; Lee, 1996).

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 (Jianyu, 2001).

Comparando la producción de PHAs por fermentación de glucosa y ácidos orgánicos bajo condiciones controladas, con la producción de PHAs con el tratamiento de residuos, se puede analizar que existen varios cuellos de botella que deben identificarse y resolverse para hacer una tecnología robusta. Por ejemplo, los desechos orgánicos normalmente contienen compuestos complejos y sólidos que deben hidrolizarse primero y deben digerirse bajo condiciones anaerobias a los intermediarios metabólicos simples como ácidos orgánicos, que a su vez pueden ser los consumidos por las bacterias productoras de PHA para la síntesis del polímero. Los ácidos orgánicos de la fermentación son normalmente tóxicos (a concentraciones altas) a las para las bacterias productoras de PHA, por lo que se requiere un buen control de concentraciones de los ácidos y la biomasa para alcanzar una tasa de producción del polímero apropiada.

En la remoción de fósforo biológico, se forman PHAs en condiciones anaerobias usando como energía la descomposición de los poli-fosfatos, obteniendo concentraciones menores del 5% de PHA.

Una gran cantidad de energía del ciclo de los ácidos tricarboxilicos (CAT) bajo condiciones aerobias se dispone para la producción del macropolímero; que puede ser superior al 70-80% del peso seco logrado en la fermentación de glucosa y ácidos grasos por alimentación por lote (Jianyu, 2001).

Tabla 2.1. Comparación de algunas propiedades del PET y PP con el PHB (Patnaik, 2005)

Propiedad	Polietileno Tereftalato (PET)	Polipropileno (PP)	Polihidroxibutirato (PHB)
Punto de fusión °C	176	171 – 186	171 – 182
Punto de congelación °C	69	- 15	5 – 10
Cristalinidad	30 – 50	65 – 70	65 – 80
Densidad g/cm^3	1.385	0.905 – 0.940	1.23 – 1.25
Peso molecular x 10^5	2.4	2.2 – 7.0	1 – 8
Modulo de Young G Pa	2.9	1.7	3.5 – 4.0
Resistencia a la tensión, M Pa	70	39	40
Resistencia a UV	Pobre	Pobre	Bueno
Resistencia a solventes	Bueno	Bueno	Pobre
Permeabilidad al Oxígeno cm^3/ m^2/ átomo/ día	4.9	1700	45
Biodegradabilidad	Nada	Nada	Bueno
Absorción del agua, % peso	0.0	0.0	0.2

2.3. POLIHIDROXIALCANOATOS

2.3.1. Estructura y características del PHA

Los PHAs son homo- ó hetero-poliésteres que son sintetizados por diferentes procariontes bajo condiciones específicas. Estos polímeros son importantes por tres razones (Patnaik, 2005):

1) Pueden producirse cantidades grandes como recursos renovables;
2) Pueden guardarse grandes cantidades de energía para mantenimiento celular;
3) Son biodegradables.

La mayoría de los PHAs son poliésteres alifáticos con la estructura general que se muestra en la figura 2.1. Una molécula típica de PHA contiene x = 1,000–30,000 unidades, y n generalmente es igual a 1 para la mayoría de los PHAs. Cuando R=CH_3 se tiene el poli–β-hidroxibutirato (PHB), y cuando R=CH_2-CH_3 se trata del poli-β-hidroxivalerato (PHV). Juntos estos dos polímeros constituyen el polímero comercialmente útil, con el PHB como el dominante (Patnaik, 2005).

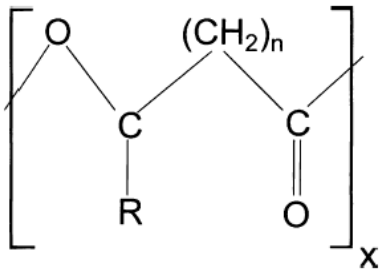


Figura 2.1. Estructura química general del polihidroxialcanoato

Durante los años cincuenta, Macrae y Wilkinson (1958) observaron al microorganismo *B. megaterium* que acumulaba rápidamente PHB cuando la proporción de glucosa y nitrógeno en el medio del cultivo era alta, y la subsecuente degradación ocurría con la ausencia de una fuente exógena de carbono y energía. Se demostró entonces la degradación de acetato y la función de la coenzima A como elementos en el panorama de síntesis del PHB, siendo la base para estudios posteriores (Patnaik, 2005).

Macrae y Wilkinson (1958) explicaron la actividad de síntesis de poli-β-hidroxibutirato de diferentes organismos. Subsecuentemente diferentes investigadores revisaron la vía metabólica creando un modelo de la síntesis del PHB.

Los organismos que se usaron fueron *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter sp.* y *Cyanobacterium sp.*. Los objetivos de los trabajos abarcaron las propiedades físicas y químicas, la estructura cristalina, la morfología del gránulo y nuevos métodos de cuantificación. Dos aspectos que eran sobre todo importantes eran la regulación metabólica del PHB, su síntesis y su relevancia fisiológica en las células (Patnaik, 2005).

Dawes y Senio (1973) señalaron que es un material de supervivencia para algunos organismos y por eso lo guardan intracelularmente. Mostraron que la formación del PHB era favorecida por las condiciones de una concentración alta de NADPH, alta acetilcoenzima A y bajas concentraciones de coenzima A (CoA) libre. Estas condiciones se dan cuando existe limitación de algún factor de crecimiento, como el nitrógeno, fósforo o azufre.

Es un hecho que el control de las concentraciones del carbono y de la fuente de nitrógeno tiene una influencia importante sobre la producción del PHB. Estos aspectos se han descrito más detalladamente por otros investigadores (Lee, 1996, Patnaik, 2005).

En el ANEXO A se detalla la bioquímica del metabolismo de acumulación de PHA.

A continuación se reseña la acumulación del polímero bajo condiciones dinámicas, que posteriormente será la base para explicar el metabolismo bioquímico de almacenamiento del PHA en lodos activados.

2.3.2. Producción de PHA bajo condiciones dinámicas

La respuesta de los cultivos bacterianos ante la presencia de condiciones dinámicas en el medio es variada, pero dos fenómenos importantes son el crecimiento y el almacenamiento (Majone et al., 1999).

Cuando un cultivo crece bajo ciertas condiciones particulares, los microorganismos adaptan sus características fisiológicas a ese medio (adaptación fisiológica). Esto se conoce como aclimatación (Buitrón, 2007). Cuando el medio alcanza condiciones de estado relativamente estables, la adaptación fisiológica llega a una adaptación final, donde los microorganismos son capaces de crecer en ese medio y ya no ocurre más adaptación (crecimiento balanceado) (Majone et al., 1999).

Durante la aclimatación ocurren diferentes fenómenos, como son: la selección y multiplicación de microorganismos especializados, las transformaciones fisiológicas en el sistema metabólico de los microorganismos, las alteraciones a nivel de regulación y producción enzimática, la producción de enzimas inducidas y los cambios genéticos (Buitrón, 2007).

En el enriquecimiento selectivo, los microorganismos crecen selectivamente sobre otros, lo cual produce una mayor proporción de la biomasa total ya adaptada al medio. Este mecanismo es la base de la mayor parte de los experimentos de producción de PHA bacteriano.

La presencia de condiciones dinámicas (sustrato, tiempo de retención celular, pH, aeración, etc.) en el medio puede ocasionar como respuesta el almacenamiento intracelular de compuestos (polihidroxialcanoatos, glucogéno, etc.), vinculados con la formación de biomasa (determinada como sólidos volátiles), obteniendo así un rápido aumento en la tasa de consumo de sustrato. Sin embargo estos sólidos volátiles no sólo reflejan entonces el material celular, sino también el polímero (PHAs) de reserva.

La síntesis del polímero es más factible que el aumento del material celular, por lo que se requiere menos tiempo de adaptación fisiológica al medio, siendo más rápida la respuesta de almacenamiento que el mecanismo de crecimiento celular (Majone et al, 1999). Es este tipo de respuesta la que se ha tomado en cuenta para el diseño de sistemas para producción de PHA con lodos activados.

En el mecanismo de acumulación y liberación del polímero puede ocurrir que la célula tome el sustrato y lo vaya almacenado sin ninguna modificación en el interior o transformándolo en compuestos de bajo peso molecular. Por razones termodinámicas (presión osmótica, etc.), la tasa de acumulación de metabolitos intermediarios es mucho menor que la acumulación de polímeros. Esto implica que la acumulación del biopolímero puede ser un mecanismo para evitar la acumulación de compuestos tóxicos en la célula. Se ha observado también la liberación de metabolitos solubles o polímeros extracelulares (Majone et al, 1999).

La remoción de sustrato puede suceder por un sencillo proceso de sorción del sustrato soluble de la fase líquida. El tipo de respuesta dependerá del tipo de biomasa presente y las condiciones a las que esté sometida. Por supuesto, la respuesta más común será la de crecimiento, mientras que las respuestas de almacenamiento y liberación de compuestos se observarán cuando la tasa de crecimiento sea lenta o la tasa de asimilación del material absorbido sea muy baja en comparación con la condición dinámica. Por esta razón la respuesta de acumulación es posible que ocurra bajo condiciones dinámicas de alimentación de un sustrato soluble (Majone et al, 1999).

Los compuestos acumulados intracelularmente bajo condiciones de alta concentración de sustrato serán consumidos como sustratos internos cuando la fuente de alimentación externa se encuentre en una concentración limitante. Los microorganismos que tienen la capacidad de consumir sus reservas acumuladas, tendrán una ventaja competitiva sobre el resto, y esto es importante al tratar de seleccionar una especie de un cultivo mixto.

La observación de estas respuestas ante condiciones dinámicas del medio ha permitido desarrollar sistemas con cepas puras y cultivos mixtos como medio de obtención del bioplástico, y que ha dado como resultado ventajas y desventajas en los procesos comercializados de producción de PHA en el mercado, que a continuación se mencionan.

2.3.3. Procesos de producción en el mercado

Se han identificado diversos procesos por los cuales se puede llegar a la producción de PHAs. De hecho, en todas las plantas de tratamiento de aguas residuales existe la producción de PHAs.

De acuerdo a Khanna et al. (2005) existen dos grupos de bacterias capaces de producir estos polímeros. El primer grupo de bacterias requiere de limitación de un nutriente esencial como es nitrógeno, fósforo, magnesio o sulfuro para la síntesis de PHAs a partir 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 *Azobacter vinelandii*, y *Escherichia coli*., no requieren de la limitación de un nutriente para la síntesis de PHA y pueden acumular polímero durante su crecimiento.

Se puede obtener una alta producción de PHA usando procesos por lote alimentado (*fed- batch*) o por fermentación continua. Para el cultivo de bacterias del primer grupo comúnmente se utiliza un proceso de dos pasos. Una concentración de biomasa deseada se obtiene sin limitación de nutriente en el primer paso, después del cual se alimenta un nutriente en cantidad limitante en el segundo paso para permitir la síntesis eficiente de PHA. Durante la limitación de nutriente en la segunda etapa, la concentración residual de células (definida como la concentración celular menos la concentración de PHA) permanece prácticamente constante y la concentración de células aumenta sólo debido a la acumulación de PHA interna.

La selección de microorganismos para la producción de PHA debe basarse en diferentes factores, tales como:

- Habilidad de la célula para utilizar una fuente barata de carbono
- Tasa de crecimiento
- Tasa de síntesis de polímero
- La máxima acumulación posible de polímero

Algunos tipos de bacterias y otros organismos, así como la utilización de sustratos para producción de PHA pueden verse en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Organismos almacenadores de PHAs (Lee, 1996)

Nombre	Tipo de sustrato	% Acumulación alcanzado	Observaciones
A. eutrophus	Glucosa, fructuosa y ácido acético	38.9-76	Con limitación de fosfato. 50 h alcanza la mayor producción
A. latus	Glucosa, sacarosa	50-87	5 h alcanza la mayor producción
Metilobacterium	Metanol	30-33	170 h alcanza la mayor producción
Pseudomonas	Formato a decanoato y hexanoato, glucosa y ácido grasos volátiles	11.6 g/l	
E. coli	Diversos	80-90	Sin limitación de sustrato pero es dependiente de la cantidad de acetil-CoA
Bacterias con sustrato de bajo costo	Valerato, ácido butírico, molasa, residuos de aceites, fructosa, lactosa, sacarosa, glucosa en medios minerales	25-80	Se ha investigado en lodos activados
Plantas transgénicas	Formados de la acetil-CoA	7.7 en semillas	Se cree que los plásticos producidos en plantas tendrían precios comparables a los de los obtenidos por bacterias

A pesar de que los PHA son reconocidos como candidatos para hacer plásticos biodegradables, aún tienen como limitación para su producción a gran escala su alto precio en comparación con los plásticos convencionales (Lee, 1996). Esto se debe principalmente a que sólo se han alcanzado porcentajes de acumulación en peso seco celular[1] competitivos en cepas puras y usando sustratos que resultan caros a gran escala.

2.4. PRODUCCIÓN DE PHAs CON CULTIVOS MIXTOS

2.4.1. Uso de cultivos mixtos

El uso de cultivos donde la biomasa es un consorcio de microorganismos, como los lodos activados de plantas de tratamiento, ha sido propuesto recientemente. Esto reduce el costo de la materia prima y por lo tanto del proceso en general, y además representa un valor agregado al poder obtener un producto de alto valor a partir de desechos (Doi et al., 1992).

La acumulación de PHA con cultivos mixtos ocurre en sistemas donde el donante de electrones y la disponibilidad del aceptor de electrones se encuentran separados (por ejemplo en una dinámica aerobio/anaerobio) o porque el sustrato no está disponible en forma constante para los microorganismos. En el primer caso, el PHA tiene una relación directa con el metabolismo de PAOs (del inglés: organismos acumuladores de fosfato) y GAOs (del inglés: organismos acumuladores de glucógeno). El segundo caso implica un caso de crecimiento bajo condiciones no estables.

El almacenamiento de PHA en cultivos mixtos es particularmente importante si el lodo es sometido a períodos consecutivos de disponibilidad de sustrato (abundancia) y períodos de ausencia de sustrato (ayuno). Este proceso se conoce como *alimentación dinámica aerobia* o de *ayuno y abundancia*. Bajo estas condiciones dinámicas, la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para crecimiento y para acumulación de polímero cuando hay presencia en exceso de la fuente de carbono, y cuando el sustrato es agotado pueden utilizar el polímero acumulado como fuente de energía y fuente de carbono (figura 2.2).

[1] Peso seco celular es la acumulación del biopolímero almacenado intracelulrarmente expresado en fracción másica o porcentual [mg PHA L^{-1}/mg PHA L^{-1}]

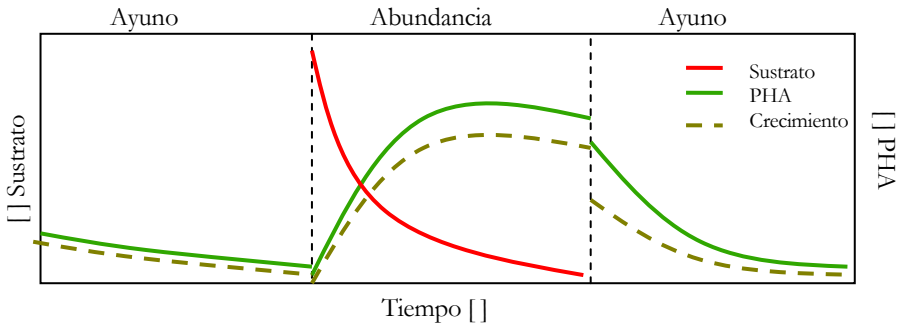


Figura 2.2. Alimentación dinámica aerobia (Serafim et al 2006a).

El fenómeno de almacenamiento es dominante (<70% en base Cmol) en relación con el crecimiento (Lemos et al., 2006). En el caso de cultivos mixtos no se necesita que existan condiciones limitantes para el crecimiento, como generalmente se estudia en cultivos puros, donde se limita la cantidad disponible de un nutriente esencial para favorecer la acumulación del polímero intracelular (Reis et al., 2003).

La tasa de acumulación de material de reserva es más alta que la tasa de crecimiento. Esto se debe a las condiciones desbalanceadas, ya que si el sustrato se suministrara constantemente la tasa de crecimiento sería mayor que la de acumulación debido a la adaptación fisiológica que se ha explicado. Se ha visto que la tasa de toma de sustrato es relativamente independiente de la historia celular. Entre más tiempo estén en contacto con el sustrato, su tasa de crecimiento será cada vez mayor. Por otro lado, la tasa de acumulación de PHA tiene mucho que ver con la historia celular. Se ha observado que los lodos jóvenes tienen tasas menores de acumulación de PHA que aquellos de mayor edad celular (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

Bajo las condiciones de ayuno y abundancia en períodos consecutivos, parece ser que en la fase de abundancia entre un 66% a un 100% del sustrato es consumido para almacenamiento y el restante es usado para crecimiento y mantenimiento. Las tasas de crecimiento celular en las fases de abundancia y ayuno son similares, pero el almacenamiento es mayor en la fase de abundancia en relación con la de ayuno (figura 2.2). Se han utilizado diversos sistemas con reactores secuenciales en lote (SBR) para la producción de PHA con cultivos mixtos. Los SBR han sido operados con varias condiciones y etapas: microaerofílicos/aerobios (Satoh et al., 1998), anaerobio/aerobio (Satoh et al, 1998) y completamente aerobio (Serafim et al., 2004; Dionisi et al., 2004; Beun et al., 2002).

Se ha observado también que la cantidad y naturaleza del PHA acumulado depende en gran medida de las condiciones de operación, así como de los sustratos utilizados (desde aguas residuales sintéticas hasta aguas residuales industriales). La figura 2.3 muestra un esquema de las rutas metabólicas para producción de PHA en condiciones de abundancia y ayuno.

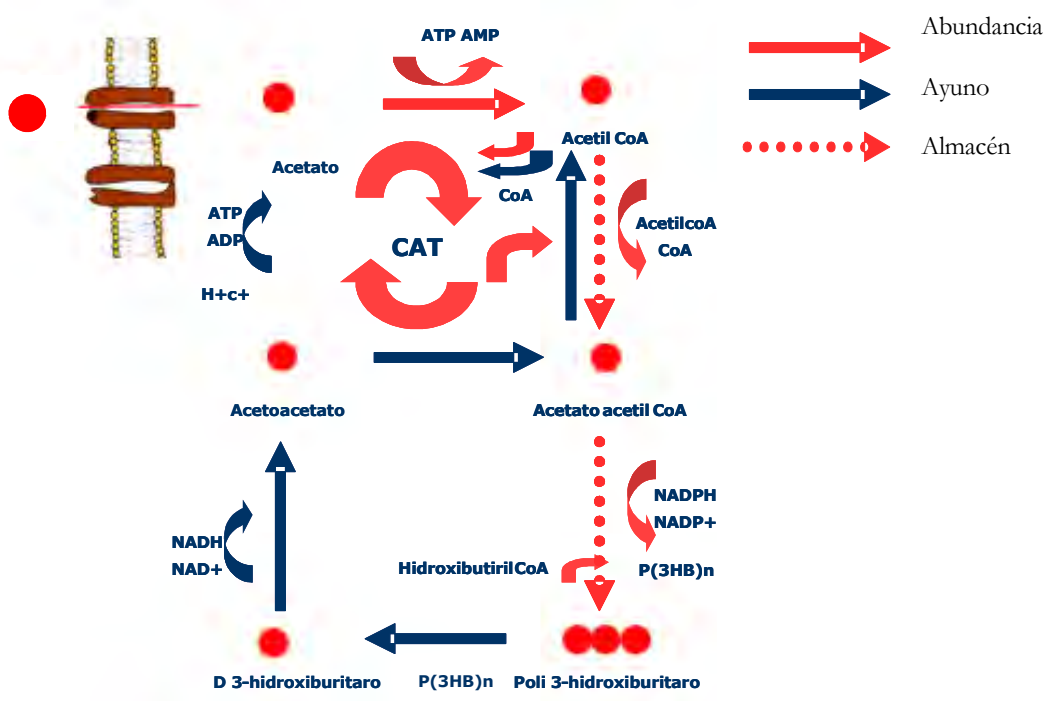


Figura 2.3. Rutas de producción de PHA en condiciones de abundancia/ayuno.

En su mayoría, los sistemas diseñados para la producción de PHA en cultivos mixtos se han hecho en dos pasos, utilizando primero un reactor llamado *de enriquecimiento selectivo (RES)* y posteriormente otro llamado *de producción (RPP)*. El primero es un reactor SBR que, partiendo de un inóculo con alta concentración de biomasa determinada como sólidos volátiles, se somete a ciclos dinámicos de suministro de sustrato (Serafim et al., 2004; Dionisi et al., 2004), donde generalmente se alternan períodos de abundancia de sustrato contra períodos de ayuno. De esta manera, la biomasa alcanza una adaptación fisiológica al medio y condiciones, predominando finalmente aquellos microorganismos capaces de almacenar PHA y sobrevivir durante los periodos de ausencia de sustrato. Después de seleccionar la biomasa con capacidad de almacenamiento de PHA se retira parte de ésta y se transfiere al reactor de cultivo de PHA (*RPP*), donde esta biomasa se somete a nuevas condiciones aumentando la concentración del sustrato alimentado y racionando la alimentación en pulsos temporalmente espaciados para llevar a la biomasa a un punto de saturación de acumulación intracelular de PHA.

La mayor parte de las investigaciones recientes con cultivos mixtos se basan en este tipo de sistemas ya que han demostrado obtener buenos resultados (Dionisi et al., 2004; Beun et al., 2002) con tasas de acumulación mucho mayores que en los sistemas diseñados con etapas alternadas aerobias/anaerobias y logrando un alto contenido de PHA y alta productividad (Reis et al, 2003).

La producción de PHA en cultivos mixtos puede verse reducida en costos si se utilizan fuentes de desecho de carbono orgánico como sustratos. Los residuos formados de carbohidratos no son un buen sustrato por sí mismos para la producción de PHA porque éstos son transformados preferentemente en glucógeno. Sin embargo, pueden ser convertidos sí son previamente prefermentados hacia ácidos grasos volátiles (AGVs). El acetato es el sustrato más utilizado y éste es almacenado preferentemente como homopolímero PHB, el cual tiene propiedades mecánicas y térmicas no muy favorables. Por ello se han utilizado mezclas de otros AGVs para obtener copolímeros que formen plásticos de mejores características. Por ejemplo, mezclas de ácido propiónico y acético se han utilizado para obtener copolímeros de P(3HB-co-3HV) (Khanna y Srivastava, 2005).

Otro tipo de sustratos que se han utilizado son lactato, succinato, piruvato y malato así como etanol, aspartato, glutamato y glucosa (Lemos et al., 2004).

La ruta metabólica de biosíntesis de PHA es afectada por varios factores como son: la fuente de carbono, la relación C/N, el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto (OD), que a continuación se explican con detalle.

2.4.1.1. Factores que afectan la producción de PHA

2.4.1.1.1. Efecto de la fuente de carbono

Los homopolímeros de la familia de los PHA se obtienen cuando se presenta una sola fuente de carbono específica. Sin embargo, al estar presentes más de un solo tipo de sustrato se pueden formar copolímeros. El más conocido es el copolímero P (3HB-co-3HV), cuyas propiedades dependen en gran medida de su composición.

Lemos et al. (1998) demostraron que el consumo de acetato por organismos acumuladores de fosfatos (los llamados PAOs) lleva a la producción de un copolímero de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV), con las unidades de HB dominantes (69%–100% HB; 0%–31% HV). Con el propionato, las unidades de HV están principalmente incorporadas en el polímero. El rendimiento de polímero ($Y_{P/S}$) se observó que disminuía a partir del acetato (0.97) al propionato (0.61) al butirato (0.21).

Un experimento (Dionisi et al., 2004) mostró que tomando ácidos acético, láctico y propiónico como únicas fuentes del carbono bajo condiciones aerobias, estos mismos se almacenaron en forma de homopolimeros (PHB de acético o ácido láctico, PHV del ácido propiónico), mientras que el copolímero (HB/HV) se formó cuando el ácido propiónico estaba presente junto con el acido láctico y/o ácido acético (Patnaik , 2005).

Doi (1990) observó que a medida que aumenta el porcentaje de 3HV en el copolímero, éste es más flexible y más duro, mientras que el esfuerzo último a la tensión disminuye y la elongación requerida para la ruptura aumenta. En la tabla 2.3 se resumen los valores de algunas propiedades para el copolímero 3HB-co-3HV para diferentes proporciones de homopolímero en su composición. Otros copolímeros que se han investigado son el hidroxibutirato y el hidroxivalerato (HB y el HV) (Reis et al., 2003).

Tabla 2.3. Propiedades mecánicas y térmicas de copolímeros P(3HB–co-3HV) (Doi, 1990)

Composición (mol%)		Temperatura de fusion [°C]	Transición de cristal [°C]	Temperatura de distorsión al calor [°C]	Módulo de Young (GPa)	Esfuerzo a tensión (MPa)
3-HB	3–HV					
100	0	179	10	157	3.5	40
97	3	170	8	140	2.9	38
91	9	162	6	125	1.9	37
86	14	150	4	112	1.5	35
80	20	145	-1	99	1.2	32
75	25	137	-6	92	0.7	30

2.4.1.1.2. Efecto de la relación C/N

Una consideración importante en la biosíntesis del PHA es que se debe tener suficiente fuente de carbono y menos cantidad de nitrógeno; si se tiene una alta cantidad de carbono sobre el nitrógeno este resulta perjudicial. Con una cantidad promedio de nitrógeno libre con exceso de fuente de carbono, se tiene como resultado una tasa de consumo de PHA mucho menor que la tasa de producción (Doi et al., 1990), pero la biosíntesis decrece cuando se termina el nitrógeno. Se ha descrito la dinámica de la dependencia del NADPH con la concentración de amonio, pero todavía existe incertidumbre sobre su mecanismo regulatorio.

Experimentos realizados sugieren que la proporción optima C:N es 20, ya que valores más altos resultan en inhibición en las células y a bajas concentraciones de iones amonio promueven una tasa especifica adecuada (por unidad de biomasa) de producción del PHB pero la productividad de biomasa decrece (Patnaik, 2005).

Katoh et al. (1999) explicó que en términos metabólicos, el flux de distribución en la célula y las fases de producción del PHB dependen de la concentración del NADPH; y que juega un papel importante como armazón en la regulación metabólica, aunque esto todavía no se ha podido comprobar científicamente (Patnaik, 2005).

2.4.1.1.3. Efecto del pH

Para los PAOs, la estequiometría, el consumo del glucógeno y la acumulación del PHA son independientes del pH en el rango de 6.5-8.0. La cantidad de fósforo relacionado por mol de acetato consumido (P/HAc) es linealmente dependiente del pH, porque el requerimiento adicional de energía para el transporte del acetato tiene un alto pH (Filipe et al., 2001b). Filipe et al. (2001b) mostraron que a altos valores de pH en la fase anaerobia resulta perjudicial para los llamados GAOs (organismos acumuladores de glucógeno). Un experimento (Serafim et al., 2004) mostraba que durante el proceso aerobio, la producción de PHB era mayor cuando el pH no era controlado que cuando se controlaba de 7 a 8.3, porque cuando el pH no fue controlado solamente el 12% del sustrato fue usado para energía y la otra fracción (88%) se dirigió como reserva y crecimiento. En cambio, en donde se controló el pH a 7.0, el 44% del sustrato fue utilizado por la célula en forma de energía y el 56% fue utilizado como reserva y crecimiento. (Dionisi et al., 2004).

2.4.1.1.4. Efecto de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre la acumulación del PHB en un reactor discontinuo secuencial (SBR) alimentado con acetato fue estudiado por Krishna et al. (1999) bajo condiciones limitantes de fuente de carbono. La tasa de formación de PHB fue decayendo mientras incrementaba la temperatura porque aumentaba la tasa anabólica a elevadas temperaturas.

2.4.1.1.5. Efecto del oxigeno disuelto

En ausencia de oxígeno, o bajo condiciones microaerofílicas, los polímeros de almacenamiento pueden servir como donadores de electrones para la desnitrificación cuando el sustrato externo se ha consumido (Beun et al 2001; Jones et al 1990a). Alleman e Irvine (1980) analizaron que operando estrategias pensadas para el almacenamiento celular, como el SBR, este puede reducir o eliminar el carbono de aguas residuales con una baja proporción de carbono/nitrógeno.

Pero se tiene el problema del crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos que provoca un fenómeno conocido como "bulking", responsable de la mayoría de los problemas que ocurren en los sistemas de lodos activados. Aunque este problema ha estado presente por más de la mitad un siglo, no se tiene aún una solución definitiva (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

En los tanques de contacto aerobio del sistema de lodos activados, la relación entre la concentración de oxígeno disuelto y los polímeros de almacenamiento y sus efectos con la sedimentación del lodo es todavía incierta (Martins et al., 2003).

En sistemas convencionales de tratamiento de agua residual en que el almacenamiento no juega un papel importante, el sustrato orgánico biodegradable se oxida rápidamente durante la fase de aeración y el consumo de nitrógeno juega un papel menor (Beccari et al 1998; Beun et al 2001; Carta et al 2001; Dircks et al 1999; Majone et al 1999).

No se desea que el consumo de sustrato se incline a crecimiento de biomasa, ya que el crecimiento microbiano juega un papel insignificante en el consumo de nitrógeno. Además, es deseable limitar el crecimiento de organismos heterótrofos debido al exceso de lodo; por consiguiente es importante la fase de llenado del reactor tal que la cantidad máxima de reducción de equivalentes del sustrato se guarden para el consumo de nitrógeno, en lugar de oxidarse o producir biomasa. El metabolismo de PHB en cultivos mixtos se ha estudiado recientemente (Beun 2001; Beun et al 2002; Majone et al, 1996; Van Loosdrecht et al 1997); enfocándose al efecto de la proporción del suministro de oxígeno en la conversión del acetato a PHB.

2.4.2. Acumulación de PHA en sistemas de tratamiento avanzado

En sistemas de tratamiento avanzado para la remoción de fósforo de aguas residuales (EBPR por sus siglas en inglés: *enhanced biological phosphorus removal*) compiten dos tipos de microorganismos (Dai et al, 2007). Los PAOs son conocidos por su capacidad de acumular polímeros de reserva (PHA, glucógeno y polifosfatos). Estos organismos utilizan la energía almacenada en forma de poli-P para almacenar sustrato externo en forma de PHA cuando no hay un aceptor de electrones (oxígeno o nitrato) disponible para generar energía (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

Los GAOs dependen de sustratos que pueden ser fermentados y almacenan los productos de la fermentación en vez de excretarlos. Los GAOs pueden utilizar también el glucógeno almacenado para fermentación de PHB. La energía liberada en el proceso de la glucólisis es usada para acumular productos de fermentación en forma de PHB (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

Bajo condiciones anaerobias, los GAOs ganan energía a través de la hidrólisis de sus fuentes de glucógeno intracelulares hacia acetil-CoA y propionil-CoA. La energía es después utilizada para tomar sustratos y metabolizarlos a acetil-CoA (Dai et al, 2007).

Subsecuentemente la enzima propionil-CoA, formada con el glucógeno, y la acetil-CoA, formada tanto del acetato como del glucógeno, son condensadas formando 3HB, 3HV y 3HMV. Bajo condiciones aerobias los PHA formados son utilizados como fuentes de carbono y energía para crecimiento y reposición de fuentes de glucógeno.

El uso de estas bacterias elimina la necesidad de utilizar mezclas de fuentes de carbono debido a la presencia del glucógeno (Dai et al., 2007), obteniéndose un contenido de PHA en célula seca de 14-41%, que se encuentra aún por debajo del contenido alcanzado con cultivos puros.

2.4.3. Ventajas

La acumulación de PHA en cultivos mixtos puede alcanzar más del 60% de peso celular seco (calculado como PHA/SSV). Al ser comparado con la producción de PHA con cultivos puros (más de 80%), este 60% es aún bajo para competir con los procesos con cultivos puros, económicamente hablando. También es bajo considerando que el costo de extracción del polímero para una acumulación de 50% de PHB es de 4.8 USD/kg mientras que con un 88% el costo baja hasta 0.92USD/Kg (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

Según un estudio que compara los costos de producción de PHB y PHV usando cultivos puros y usando cultivos mixtos y sustratos de bajo costo, se puede reducir el costo de producción debido principalmente al uso de sustratos baratos (85% más bajo) y debido a los costos capitales por inversión (50% más bajos) (Meesters, 1998).

En un estudio comparativo en cuanto al impacto ambiental que tiene el proceso de producción de PHA con cultivos mixtos con respecto a la producción de metano, bajo un enfoque de análisis integral de proceso, se concluyó que el proceso de producción de PHA es más amigable al ambiente que el de metano, aún considerando el uso de solventes para su extracción (Gurieff y Lant., 2007).

Además deben considerarse ventajas las propiedades de bicompatibilidad y biodegradabiliad características de los PHAs que son una clara ventaja sobre los de origen petroquímico (Serafim et al., 2006).

2.5. PRODUCCIÓN DE PHAs CON LODOS ACTIVADOS

2.5.1. Investigaciones enfocadas en la producción de PHAs con lodos activados

El uso de cultivos mixtos en lugar de las cepas puras trae algunas ventajas: el proceso puede llevarse a cabo más fácilmente sin la necesidad de condiciones estériles, y puede obtenerse el producto sin el riesgo de contaminación (Dionisi et al., 2004; Reis et al., 2003).

El uso de lodos activados es considerado como una fuente para la producción de bioplásticos (Satoh et al 1998). Por otro lado, la tasa de consumo de sustrato y la tasa de producción de los lodos activados normalmente son muy bajos (Beccari et al., 2002; Dircks et al., 2001) porque la biomasa no es muy activa cuando el lodo tiene una mayor edad celular (es decir, presenta una carga orgánica baja); sólo una parte de los microorganismos puede almacenar PHAs; y la demanda química de oxigeno rápidamente biodegradable (RBCOD) es normalmente baja (menos de 0.2 g/L).

Algunos investigadores han propuesto adecuar sistemas de tratamiento de aguas residuales para la producción simultánea de PHA. Por ejemplo, Satoh et al. (2001) han investigado la producción del PHA usando lodos activados, debido a que estos sistemas de producción tienen grandes ventajas comparadas con cepas puras. Primeramente, este sistema de producción se obtiene de residuos como el alcantarillado, agua residual y lodo. Segundo, el costo de producción de PHA es bajo porque el sistema de la producción es más simple y las materias primas son más baratas.

El sistema de producción de los PHAs como plásticos biodegradables a partir del lodo activado es esquemáticamente propuesto en figura 2.4. Primeramente, el lodo activado con un potencial alto de producción de PHA se aclimata en el Reactor de Enriquecimiento Selectivo (RES) en condiciones aerobias-anaerobias aerobias-microaerofilicas (Satoh, 2001).

En el reactor RES deben tratarse las aguas residuales simultáneamente. Aquí, el contenido de PHA en el lodo activado no es muy alto. En segunda instancia, el lodo activado aclimatado del RES debe ser transferido al reactor de producción de PHA (RPP). En el RPP, el agua residual contiene una alta concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) que son alimentados como fuente de carbono para la producción de PHA y el contenido de PHA en los lodos activados es muy alto. Entonces, el PHA se extrae de las bacterias y se purifica (Satoh, 2001).

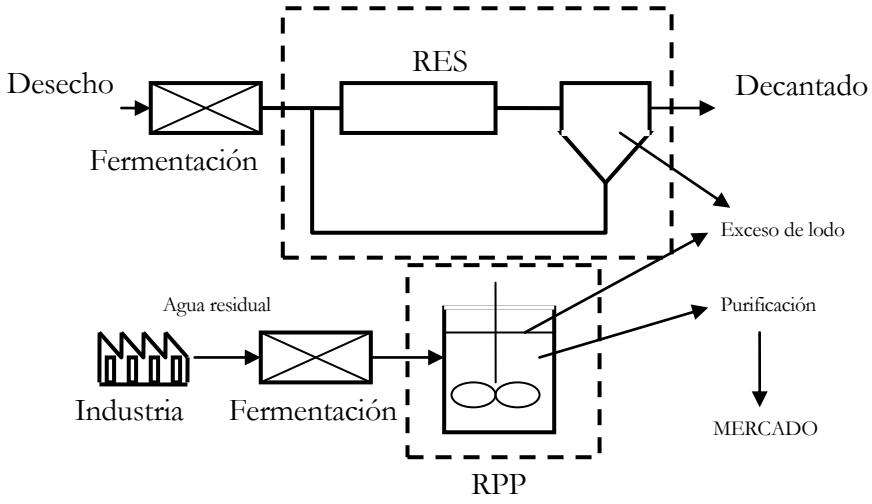


Figura 2.4. Sistema propuesto para la producción de PHAs por lodos activados

Otras investigaciones más recientes apuntan hacia el uso de sistemas más especializados en la producción de PHAs, ya que para producir altas tasas de PHA deben enriquecerse los microorganismos del lodo activado para que puedan almacenar el PHA con bajas tasas de carga orgánica y fuentes de carbono (Dionisi et al., 2004; Reis et al., 2003).

Basado en estas consideraciones, se propuso un nuevo proceso (Majone et al., 1999) para la producción de PHAs a partir de residuos, en el cual se involucra una combinación de un proceso anaerobio (fermentación acidogénica) y un proceso aerobio (el enriquecimiento del lodo activado). El proceso aerobio usa cultivos mixtos con un alto índice de producción, el cual se divide en dos etapas: la etapa de enriquecimiento y la etapa de producción a partir de los lodos activados bajo el alimento periódico aerobio de ácidos grasos volátiles (etapa de cultivo) (Dionisi et al., 2004; Reis et al., 2003).

En la primera fase se presenta la fermentación acidogénica, que es la transformación, con una tasa alta, de una alta concentración de residuos biodegradables a acetato y otros ácidos carboxílicos, que son el sustrato más conveniente para la producción de PHAs en los microorganismos.

El uso de desechos como materia prima para la producción de PHAs como una fuente de carbono es mucho más barato que utilizar glucosa y propionato, usados en los procesos comerciales actuales.

En la segunda fase, el lodo activado (totalmente en condiciones aerobias) se opera a una carga orgánica medio-alta con una alimentación periódica en un reactor SBR con el fin de enriquecer y producir un lodo con una respuesta de almacenamiento alta. El reactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés: *sequencing batch reactor*) 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. El exceso de biomasa se purga en cualquier punto de este ciclo. La purga frecuente hace que de un ciclo al siguiente se mantenga una relación de masas casi constante entre el sustrato afluente y la biomasa (Irvine, 1992); esto se ilustra en la figura 2.5.

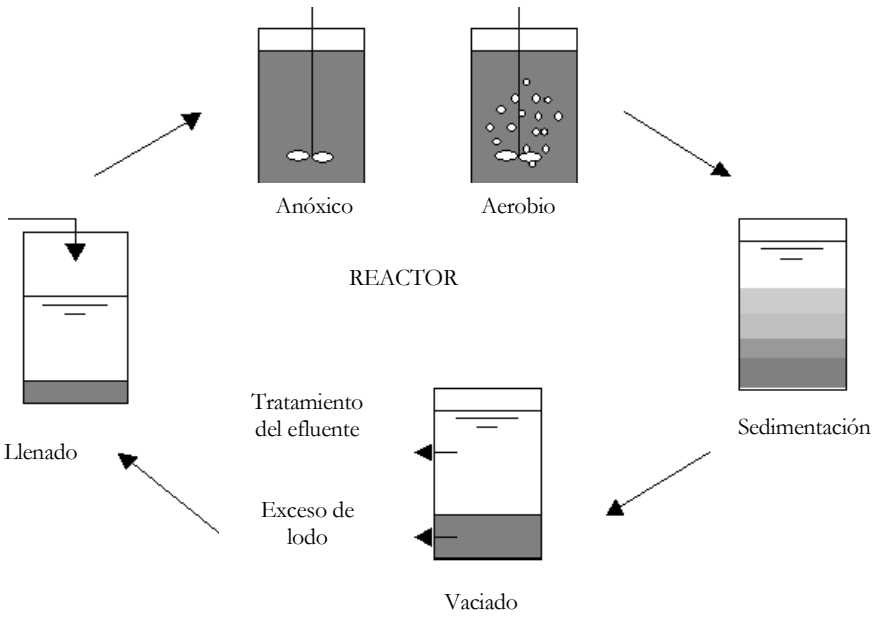


Figura 2.5. Etapas de un reactor SBR

De hecho, el reactor SBR con su alimentación periódica crea una variación de abundancia y falta de sustrato que favorecerá a los microorganismos a guardar el sustrato rápidamente (durante la fase de exceso) y después a utilizar su reserva para el crecimiento (durante la fase de ayuno) (Majone et al., 1999; Reis et al., 2003).

El exceso de lodo que se produce tiene una respuesta del almacenamiento alta que se tomaría en una tercera fase, que se operaría de nuevo en un SBR pero a una carga orgánica superior para saturar la capacidad de almacenaje del lodo. El lodo enriquecido se emplea para la producción de PHA en otro reactor en condiciones óptimas y después se extrae y purifica (Dionisi, 2004) (ver figura 2.6.).

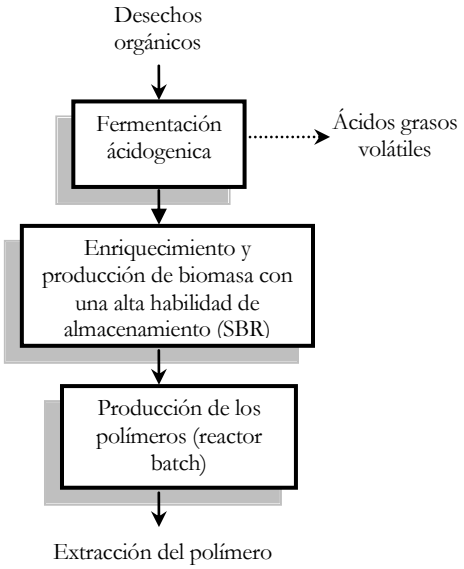


Figura 2.6. Diagrama de flujo del proceso propuesto para la producción de PHAs

La configuración del reactor de enriquecimiento selectivo y las condiciones de operación que se han reportado indican el uso de un SBR alimentado dinámicamente. Por ejemplo, Serafim et al. (2004) han usado un SBR utilizando como inóculo lodo activado sometido a condiciones aerobias de alimentación dinámica operado por un largo tiempo bajo limitación de amoniaco, demostrando tener una capacidad estable para llevar a cabo el almacenamiento de polihidroxibutirato (PHB), reflejando como resultado una selección de un cultivo con una capacidad alta de almacenamiento del biopolímero.

Se operaron dos SBR, de los cuales uno fue operado normalmente y el otro con régimen de alimentación controlado por la concentración de oxígeno; las condiciones de operación se llevaron a cabo con la inoculación con lodo activado; el régimen de alimentación fue en períodos cortos de abundancia con largos períodos de ayuno de sustrato. En el primer reactor el tiempo de retención hidráulico fue de un día, el tiempo de retención celular fue de 10 días, sin controlar el pH y a una temperatura optima de 22 °C.

En el segundo reactor se controló por el oxígeno disuelto. Su inoculación se hizo con lodos del primer reactor, teniendo una concentración celular final de 2g/L. La alimentación se realizó por pulsos distribuidos a lo largo del ciclo; su tiempo de retención hidráulico fue variable, su tiempo de retención celular fue de 10 días, sin control de pH y a una temperatura optima de 22°C.

Se suscitaron problemas por inhibición por lo que se realizaron diferentes modos de aportación de sustrato: continuamente, logrando un rendimiento de Y_{PHB}= 56.2%, y mediante al adición de un pulso de sustrato de 180 Cmmol, obteniendo un máximo contenido de PHB de 67.5%..

Por otro lado, Dionisi et al. (2004) utilizaron una alimentación sintética con ácido propiónico, acético y láctico (concentración general de 8.5g DQO L^{-1}), en el cual se alimentó cada 2 h por un día. Las condiciones de operación del reactor SBR fueron: un tiempo de retención hidráulico de un día, control de pH con un valor de 7.5, OD de 7-8 mg/L, temperatura de 25 °C y agitación con una propela mecánica a 900 r.p.m A esta carga alta, la presión selectiva debida al régimen alimenticio fue efectiva para obtener una biomasa con capacidad de almacenamiento mayor a los lodos activados.

Para el reactor de producción del polímero se han utilizado cepas como *R. eutropha* y la estrategia de fermentación más empleada es el cultivo por lote, en el cual las células crecen hasta una determinada concentración sin limitación de nutriente; luego un nutriente esencial es limitado para permitir la síntesis de PHAs. Durante esta etapa, la concentración de biomasa permanece constante, presentándose acumulación del polímero (Ryu, 1997).

Para perfeccionar el sistema de producción del polímero a partir de una cepa pura se han desarrollado modelos matemáticos que describen la dinámica para predecir y optimizar el proceso con el hallazgo de los parámetros óptimos (Shahrokh, 2004).

El modelo cinético desarrollado por Mulchandani (1989) para la producción de PHB se ha investigado y modificado para ser transformado en un modelo a partir de un sistema de lote alimentado (fed-batch), a partir del cual se realizó la optimización del proceso, obteniendo buenos resultados comparado con un sistema de lote convencional (Shahrokh, 2004).

Serafim et al. (2004) comparan la alimentación del reactor de producción empleando un pulso de sustrato (batch) con la alimentación usando tres pulsos con una concentración de acetato de 180 Cmmol/L, lo cual permitió tener una selección de una población microbiana con una alta capacidad de almacenamiento de PHB. Las concentraciones bajas de amoniaco favorecieron la acumulación de PHB.

Sin embargo esta concentración fue inhibitoria para el proceso del mecanismo de almacenamiento. Para evitar esto se probó alimentar el acetato en 3 pulso, o bien continuamente. Se obtuvo el mayor almacenamiento usando tres pulsos con un 78.5%; este valor es parecido al obtenido con cepas puras. Las condiciones de operación del reactor de producción fueron: una agitación a 250 r.p.m., sin control de pH y temperatura regulada a 22 °C.

Por su parte, Dionisi et al. (2004) tuvieron como respuesta inmediata en los resultados obtenidos del reactor de producción un rendimiento de acumulación de 649mg PHA, ya que se realizaron dos pruebas de corta y larga duración. Notaron que si se aumentaba el tiempo de exceso de sustrato a más de dos horas bajaba la tasa de almacenamiento, aumentando la tasa de crecimiento de la biomasa.

Gurieff (2007), por otro lado, propone considerar el oxígeno disuelto como una variable de control para agregar tantos pulsos de sustrato como se requieran hasta saturar de PHA a la biomasa. La señal de OD es satisfactoria usándola como técnica de control automático mediante una alimentación por pulsos en un sistema alimentado por lote cuando el nivel del umbral es definido por un pulso de sustrato, monitoreándose la disminución del OD causado por la adición de sustrato. Esta misma idea es reportada por Westerberg et al. (2007). Su experimento consistió en un reactor con un sistema de alimentación de lote alimentado y fijando un punto de referencia para el OD (se establece un valor de OD para que automáticamente se agregue el pulso al llegar a éste).

La máxima cantidad de polímero obtenido fue de 0.56 g/g en una cinética de 6 horas y el rango de rendimiento de 0.45 a 0.75 g DQO/g DQO con suero de queso como sustrato.

Un riesgo que se tuvo al utilizar suero de queso como sustrato es que su alta concentración en el reactor reduce el crecimiento celular. La inhibición de la biomasa para almacenar el polímero es un factor importante que reduce el consumo de sustrato y la tasa de consumo de oxígeno durante el experimento. Los resultados en el estudio del experimento de Westerberg et al. (2007) indicaron que la cantidad máxima de acumulación del polímero en la biomasa estaba entre 0.5 y 0.6 g/g, y el modelado del sistema mostró inhibición del producto. Esto es notorio en la forma de la curva de OD, observándose saturación en la biomasa. La figura 2.7 muestra la idea detrás del algoritmo de control para la adición de los pulsos de sustrato.

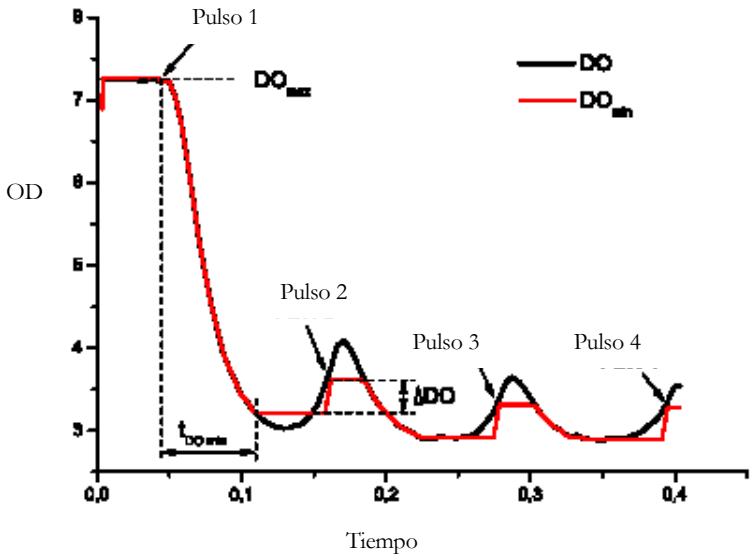


Figura 2.7. OD_{max} y OD_{min} durante la alimentación de tres pulsos (Westerberg et al., 2007)

Capítulo 3

METODOLOGÍA

C a p í t u l o 3

METODOLOGÍA

3.1. SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE PHA USANDO LODOS ACTIVADOS Y BIORREACTORES

La experimentación se realizó en dos bloques. El primer bloque (denominado Bloque I) se desarrolló en la UNAM-DF utilizando lodos provenientes de las plantas de tratamiento de Ciudad Universitaria y del Cerro de la Estrella. En este bloque se analizaron las condiciones de operación del sistema en general, principalmente del primer reactor enfocado a la aclimatación, el estudio en su mayoria fue exploratorio. En el segundo bloque (Bloque II), se probó el régimen de alimentación controlada para incrementar la producción de PHA; este bloque se realizó en la UNAM-Juriquilla en base a los resultados obtenidos del Bloque I.

El sistema experimental está compuesto por dos reactores de tipo SBR conectados en serie. En el primero se aclimata y enriquece el lodo inoculado para producir polihidroxialcanoatos (PHA). Este primer reactor, llamado *reactor de enriquecimiento selectivo* (RES), se operó como un reactor discontinuo secuencial (SBR) pero sin la fase de sedimentación que usualmente existe en un SBR convencional. El otro reactor, llamado *reactor de producción de polihidroxialcanoatos* (RPP), opera en lote, alimentado por pulsos de sustrato, sin etapa de sedimentación y retirando todo el licor mezclado al final de la reacción, cuando los microorganismos productores de PHA han alcanzado la saturación del polímero. Ambos reactores están instrumentados y son controlados desde una computadora personal.

El RES fue inoculado con lodos de la recirculación del sedimentador secundario al tanque de aeración de una planta de tratamiento de agua residual de lodos activados. La alimentación de estos lodos consistiría en desechos orgánicos que han pasado por un fermentador para ser degradados hasta ácidos grasos volátiles. Sin embargo en el sistema estudiado se empleó agua residual sintética preparada con ácidos grasos volátiles como fuente de carbono en un medio mineral.

La aclimatación se logra al estar sometidos los microorganismos a condiciones de estrés, obteniéndose un cultivo enriquecido selectivamente para producción de PHAs. Para generar este estrés se alternan fases de abundancia de sustrato y de ayuno prolongado. Durante los periodos de abundancia, se limitan los nutrientes y se almacenan los polímeros como reservas en grandes cantidades, mientras que durante los periodos de ayuno estos mismos son utilizados para mantenimiento celular. Una vez obtenido este cultivo enriquecido se purga una fracción de licor mezclado (lodos enriquecidos y agua) del volumen total del reactor para pasarlo a la siguiente etapa del sistema. Al purgar este volumen del RES es necesario reemplazarlo con la suficiente cantidad de lodos frescos para mantener la cantidad de biomasa relativamente constante.

Esta renovación de lodos tiene como propósito enriquecer selectivamente a los lodos entrantes, con lo cual se garantiza una producción constante de PHAs y a su vez el aprovechamiento de lodos de la planta de tratamiento. En el RPP, el cultivo purgado del RES se somete a un régimen de alimentación controlado para lograr la máxima acumulación posible de PHA y la inhibición de cualquier actividad para evitar degradación de los PHAs. Al final de la etapa, cuando los microorganismos están saturados de PHAs, se retira todo el volumen de trabajo para proceder a la extracción (ver figura 3.1). Este último proceso no se estudió, sino que sólo se cuantificó la cantidad porcentual de polímero promedio en las células.

El trabajo realizado consistió en la obtención de un inóculo activo de lodos activados para el sistema de biorreactores, la aclimatación de los lodos, la definición del régimen alimentación para el RES, la definición del tiempo de retención celular en el sistema, la definición de la duración de las etapas del proceso, las definición del volumen de transferencia para la purga de licor mezclado y la definición del régimen de alimentación para el RPP. Los parámetros controlados fueron la temperatura, la agitación y la aeración.

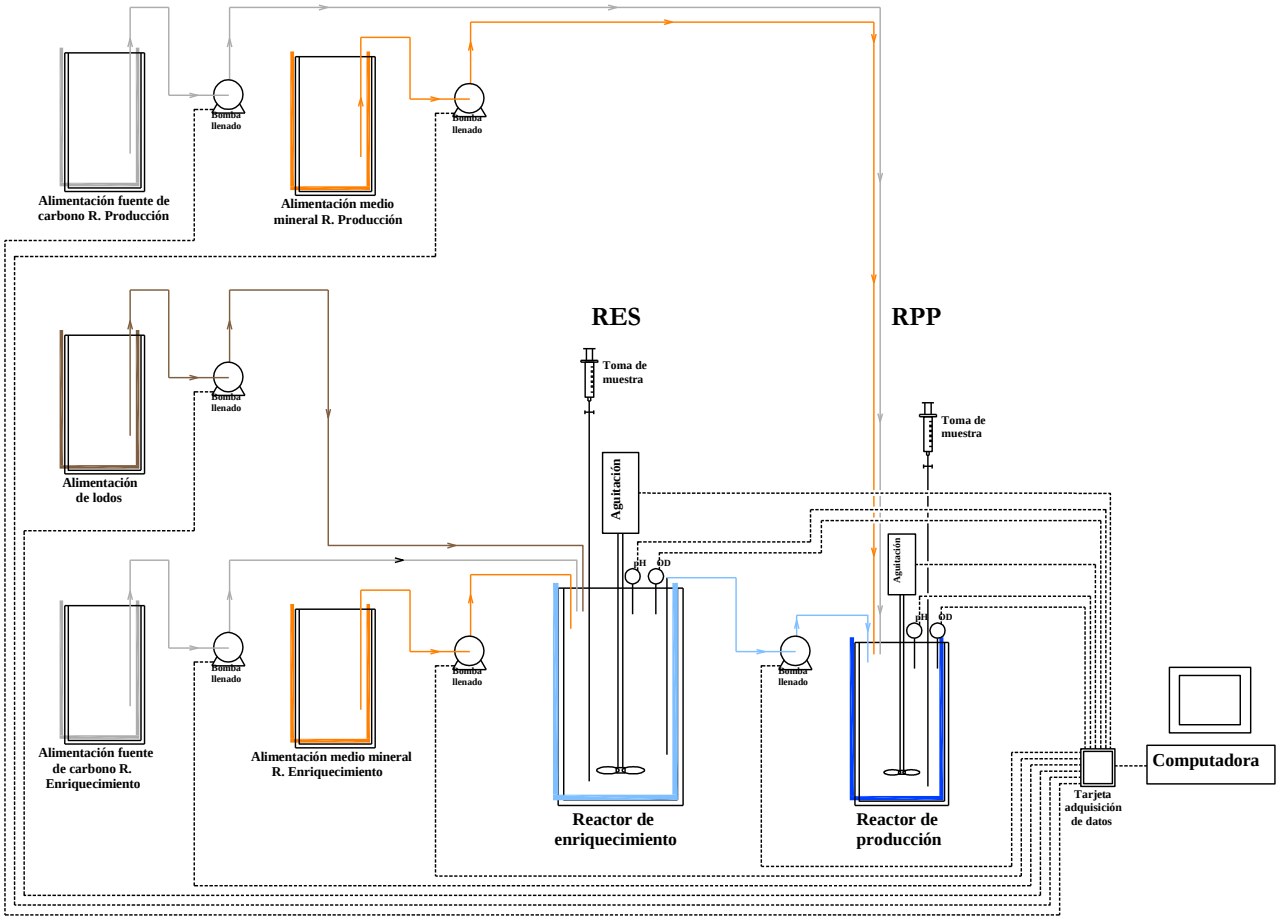


Figura 3.1. Prototipo del diseño experimental.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Inóculo

Se aclimataron y enriquecieron lodos activados provenientes de tres plantas de tratamiento de aguas residuales municipales: Cerro de la Estrella, D.F., Ciudad Universitaria UNAM, D.F., y Santa Rosa Jáuregui; Querétaro.

3.2.2. Características del Reactor de Enriquecimiento Selectivo (RES)

3.2.2.1. Características del RES en la UNAM - DF

Se utilizó un reactor Applikon® con las características mostradas en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características del reactor SBR

Parámetro	Descripción
Volumen máximo de trabajo	6.9 l
Volumen mínimo de trabajo	2.01 l
Volumen de trabajo	5.41 l
Volumen de chaqueta para control de temperatura	4.2 l
Puerto central M	Agitación
Puerto G de ¾"	Oxígeno disuelto
5 puertos	pH, mV, etc.
2 Puertos de 12 (mm)	Tubería
Puerto de 10 (mm)	Baffles
Puerto de 2 (mm)	Conexión de control de nivel

El volumen de trabajo elegido fue de 4 litros de los 5.41 litros disponibles en el reactor; se utilizaron los puertos de pH, agitación, oxígeno disuelto y temperatura.

La aclimatación de los lodos provenientes de la planta de tratamiento del Cerro de la Estrella y de Ciudad Universitaria se llevó a cabo inoculando el reactor con una concentración de 3700 mgSSV/L. La concentración de sustrato en el influente se fijó inicialmente en 0.375 gDQO/L, correspondiente a una carga orgánica de 1.5 gDQO/L/día de acuerdo a Serafim et al (2004).

La duración de las distintas fases de operación como SBR se muestra en la tabla 3.2, obteniéndose tiempos de ciclo de 6 horas (4 ciclos diarios).

Tabla 3.2. Tiempo de un ciclo del RES en la UNAM-DF

Etapa	Duración [min]
Llenado	5
Reacción	340
Sedimentación	10
Vaciado	5

La aeración del reactor se logró mediante un controlador de flujo másico (Aalborg GFC-17) y un difusor cerámico en el fondo del reactor. El flujo de aire se mantuvo constante a 4 L/min. La agitación se fijó en 500 r.p.m. usando un controlador Applikon® ADI 1020 y una propela de tipo Rushton.

El reactor fue alimentado con una mezcla dos ácidos grasos volátiles (AGVs): ácido acético y ácido propiónico en proporción 70:30 como DQO, con una concentración de 0.375 gDQO/L. Además se preparó un medio mineral con los compuestos y concentraciones indicados en la tabla 3.3, al que además se le agregó tiourea a 0.02 g/L para inhibir la nitrificación, evitando así la formación de nitratos y nitritos. Para simular el agua residual que provendría de un fermentador acidogénico, durante la alimentación al reactor el medio mineral y la mezcla de AGVs se agregaron por separado accionando dos bombas peristálticas en paralelo (MasterFlex 7523); esto último se tuvo que hacer para evitar la degradación de los AGVs en presencia de medio mineral durante su almacenamiento. El volumen de intercambio entre los dos reactores fue de 1 L de licor mezclado y este mismo volumen fue el que se suministro durante la fase de abundancia.

El control de temperatura se llevó a cabo recirculando agua a través de la chaqueta que envuelve al reactor usando un recirculador de inmersión colocado en un tanque externo (Cole-Parmer 01266-30)). Durante esta primera etapa la temperatura se mantuvo alrededor de 25ºC con un TRH de 1 día.

Tabla 3.3. Medio mineral de la alimentación del RES

Compuesto	Nombre	Concentración [mg/L]	Concentración en medio mineral alimentación [mg/L]
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	8500	255
K_2HPO_4	Fosfato dibásico de potasio	10875	326.25
$Na_2HPO_4.7H_2O$	Fosfato dibásico de sodio heptahidratado	25152	754.56
NH_4Cl	Cloruro de amonio	2500	75
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado	8670	104.04
$CaCl.2H_2O$	Cloruro de calcio dihidratado	36400	54.6
$FeCl_3.6H_2O$	Cloruro ferrico hexahidratado	250	1.75
$MnCl_2.4H_2O$	Cloruro de manganeso tetrahidratado	35.3	0.2471
H_3BO_3	Ácido borico	57.2	0.4004
$ZnCl_2$	Cloruro de zinc	20.3	0.1421
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	Molibdato de amonio	24.7	0.2429
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	55.5	0.3885
$FeCl_3.6H_2O$	Cloruro férrico hexahidratado	54	0.378

3.2.2.2. Características del RES en la UNAM - Juriquilla

La aclimatación de los lodos para el RES en la UNAM-Juriquilla se hizo de manera similar al de UNAM-DF, pero la concentración del inóculo fue de 2250 mgSSV/L con lodos provenientes de la planta de Santa Rosa Jáuregui, Querétaro. El sistema empleado fue prácticamente el mismo, cambiando ligeramente sus condiciones de operación como se indica en la tabla 3.4. Dada la baja sedimentabilidad inicial de los lodos se decidió sacrificar tiempo de reacción (ayuno) por mayor tiempo de sedimentación.

Tabla 3.4. Tiempo de un ciclo del RES en la UNAM-Juriquilla

Etapa	Duración [min]
Llenado	5
Reacción	320
Sedimentación	30
Vaciado	5

A lo largo de la experimentación se realizaron varios *estudios de ciclo*, los cuales requieren monitorear al RES para obtener cinéticas de acumulación y consumo de PHA. En este sentido, se toman muestras del reactor a intervalos de tiempo irregulares, que se indican en la tabla 3.5 y que fueron los mismos en ambos bloques experimentales (UNAM-DF y UNAM-Juriquilla).

Tabla 3.5. Intervalos de muestreo en estudios de ciclo del RES

Muestra	Tiempo [horas]
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

Los intervalos de muestreo fueron definidos al realizar una experimentación previa, midiendo el carbono orgánico total (COT), habiendo observado que la acumulación de PHA se realiza en las primeras tres horas del ciclo, siendo máxima durante la primera hora. Así, la frecuencia de muestreo es de cada 0.25 horas durante la primera hora, durante las siguientes dos horas se toman muestras a intervalos de 0.5 horas y finalmente cada hora durante el resto de la fase de reacción, que es cuando el PHA es consumido.

3.2.3. Características del Reactor de producción (RPP)

3.2.3.1. Características del RPP en la UNAM-DF

Como ya se había mencionado, al final de la fase de reacción, 1 L de licor mezclado del RES es transferido al RPP, el cual trabaja en lote, siendo alimentado por pulsos de sustrato y medio mineral a lo largo de la reacción. Al final de ésta se retira todo el licor mezclado, saturado de PHA, y se desecha. En una aplicación a gran escala, este licor mezclado sería sometido a la extracción del polímero. La aplicación de los pulsos de alimentación se hace de forma automatizada con base en mediciones del oxígeno disuelto (OD). Además se registró el pH a lo largo de la reacción.

La aeración se logró mediante controladores de flujo másico (Aalborg GFC-17) y un difusor cerámico colocado el fondo del reactor. La temperatura no fue controlada y osciló entre 20°C y 27°C.

El RPP fue alimentado con una mezcla de ácido acético y propiónico en proporción 70:30 como DQO, con concentración global de 25 gDQO/L, alimentado en pulsos de 1 mL cada uno. En cada pulso también se alimentó medio mineral.

Las pruebas en el RPP sólo fueron exploratorias durante este Bloque I. El objetivo fue determinar la estrategia de alimentación adecuada para producir la mayor saturación de PHA intracelular en un inóculo enriquecido proveniente del RES. Para ello se ensayó la aplicación de pulsos de alimentación de forma manual; los tiempos de reacción fueron variables de 6 a 8 horas y se aplicaron pulsos de alimentación de distinto tamaño. La aplicación de los pulsos se hizo observando el perfil del oxígeno disuelto (OD), administrando un pulso cada vez que el valor de OD sobrepasaba un valor de referencia, indicando que el sustrato adicionado se había ya agotado.

En los estudios de ciclo se siguió el perfil de COT, SSV, SST, AGVs y PHA; en ambos reactores se midió el pH de manera puntual (Oakton modelo 510), mientras que el OD fue monitoreado en línea con sondas y transmisores industriales (Endress+Hauser COS41 y COS61).

3.2.3.2. Características del RPP en la UNAM – Juriquilla

Las alimentación del RPP en la UNAM-Juriquilla se preparó de forma similar al de la UNAM-DF, pero incrementando la concentración global a 100 gDQO/L. Con la experiencia ganada durante la experimentación con el RPP de la UNAM-DF, se programó un algoritmo de control automático de adición de pulsos de alimentación, con el cual se probaron dos regímenes de alimentación: en lote (todo el sustrato al inicio de la reacción) y por pulsos controlados. El algoritmo de control automático usa el perfil del OD medido en línea como variable de respuesta y se detalla en la sección 3.4.

Para analizar el contenido intracelular de PHA se tomaron muestras del RPP durante algunos ciclos como se detalla en la tabla 3.6. Estos intervalos se definieron de acuerdo a la experiencia ganada durante la operación del mismo.

Tabla 3.6. Intervalos de muestreo en estudios de ciclo del RPP

Muestra	Tiempo [horas]
1	0
2	0.5
3	1
4	1.5
5	2
6	2.5
7	3
8	4
9	5
10	6

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Técnicas analíticas

Para determinar los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en todos los reactores se empleó el método estándar gravimétrico (APHA, 1992). Se utilizaron muestras de 5 ml y filtros de 2.0 μm de tamaño de poro. El índice volumétrico de lodos (IVL) también se determinó por métodos estándar (APHA, 1992).

Para seguir el perfil de ácidos grasos volátiles se usó también un método estándar (APHA 1992). Se retira 1 mL de sobrenadante filtrado y se mezcla con 100 μL de ácido fórmico al 7% w/v para conservación de la muestra y posteriormente se analiza por cromatografía de gases. En este caso se empleó un cromatógrafo Agilent 6890N equipado con una columna Zebron ZB-FFPA (15m x 0.53mm x 1 μm) y detector de ionización de flama (FDI). El flujo de nitrógeno como gas acarreador fue de 30 mL/min. Las temperaturas del inyector y detector fueron 230 y 250°C respectivamente; la temperatura del horno fue de 65°C por 20 min., incrementándose a una velocidad de 50°C/min hasta 135°C, misma que se mantuvo por 4.5 min. Por medio de una curva de calibración con estándares se realizó la cuantificación. Se determinaron los ácidos acético y propiónico.

El carbono orgánico se midió con un analizador de carbono total. El equipo utilizado fue un analizador modelo TOC-5000 Shimadzu TM y como gas de arrastre se utilizó aire de alta pureza. La muestra de carbono orgánico se llevó a cabo con el sobrenadante filtrado, al cual se le adicionan 40 μL de HCl 1:10.

La cuantificación de PHA se midió por la técnica propuesta por Braunegg et al. (1979) con las modificaciones propuestas por Oehmen et al. (2004) y por Gurieff (2007). Una muestra de 10 mL se toma del reactor y se le agregan 5 gotas de formaldehído al 7% para inhibir inmediatamente cualquier actividad de degradación de PHA; se centrifuga durante 5 min a 4000 r.p.m. y se retira el sobrenadante. La muestra se deja secar una noche en el horno a 120°C para evaporar toda el agua (Gurieff 2007). Cuando se seca, se deja enfriar y se agregan 2 mL de metanol acidificado y 2 mL de cloroformo por muestra. Las muestras se digieren a 100°C durante 20 horas. El metanol acidificado se usa con 3% de ácido sulfúrico y una

concentración de 100 mg/L de benzoato de sodio como estándar interno, para evitar errores de inyección (Comeau et al, 1988). Al terminar la digestión, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se les agrega 1 mL de agua destilada para lograr la separación de fases; se agitan en un aparato Vortex durante 1 min cada una. Las muestras se dejan sedimentar por una hora y se toma la fase orgánica de la muestra, que se encuentra en la parte de abajo del vial. Esto último se hace con pipetas Pasteur de vidrio para evitar que el cloroformo arrastre polímero de pipetas de plástico e interfiera con el resultado. La muestra se analiza entonces por cromatografía de gases. En este estudio se usó para ello un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N operado con una columna DB-5 (30 m de largo x 0.25 mm I.D. x 0.25 μm de película), un radio de inyección con separación de 1:15 y helio como gas de arrastre (1.5 mL/min). La unidad de detección de ionización con flama (FID) fue operada a 300°C con una temperatura del puerto de inyección de 250°C. La temperatura inicial del horno fue de 80°C durante 1 min, se incrementó a razón de 10°C/min hasta llegar a 120°C, y después hasta 270°C a razón de 45°C/min, donde al final se mantiene por 3 minutos. Se realizó una curva de calibración con 4 estándares en un rango adecuado, tomando 3 μL de las muestras. Se utilizó un copolímero de ácido R-3-hidroxibutírico (3HB) y ácido R-3-hidroxivalérico (3HV) en proporción 8:2 (Sigma Aldrich).

La actividad metabólica de los microorganismos se determinó por medio de respirometría. Esta prueba se basó en la medición del consumo de oxígeno utilizado para oxidar los ácidos grasos volátiles. Se tomó una muestra de 10 mL de licor mezclado del RES, la cual posteriormente se inyectó a las soluciones previamente aereadas de medio mineral y AGVs. Estas pruebas se realizaron mediante el uso de un oxímetro YSI Modelo 5300 Biological Oxigen Monitor equipado con sensor de oxígeno YSI Modelo 5331.

Se realizaron también pruebas cualitativas para observar la presencia de PHB por medio de la tinción de Negro de Sudán y safranina. Los gránulos de PHA se tiñen de negro y las paredes celulares de rosa y citoplasma. Así se puede detectar la presencia de este compuesto al ser visto al microscopio óptico.

3.4. PROGRAMA DE CONTROL AUTOMÁTICO

Se automatizó el sistema colocando un programa realizado en LabVIEW® (National Instruments) por el grupo de investigación. En el programa se pueden modificar las condiciones de operación de los reactores. Con ello se ha obtenido una gran ventaja en disminución de tiempo y esfuerzo durante la realización de los experimentos.

En la figura 3.2 se muestra una de las ventanas del programa. Como se puede observar, el usuario tiene control de la adición de lodos, los tiempos de las etapas de un ciclo, el flujo de alimentación de entrada, el flujo de purga de licor mezclado y además el control de volumen de operación.

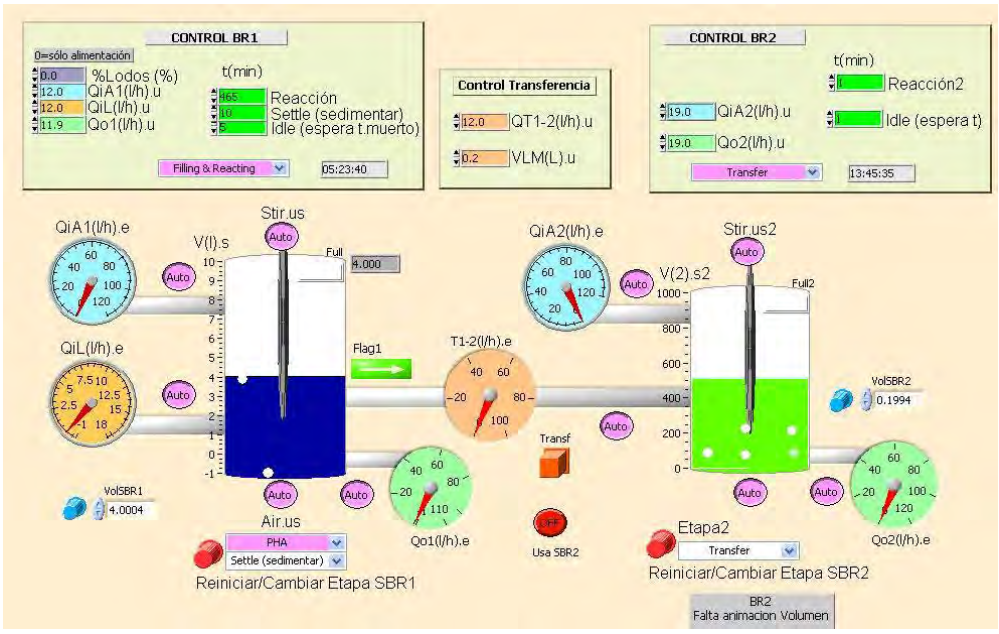


Figura 3.2. Control automático del sistema de producción de PHA

En la figura 3.3 se muestra la ventana que se muestra al usuario con los perfiles de las variables medidas, cuyos datos son guardados cada minuto en una base de datos. En particular, registra parámetros como oxigeno disuelto del RES y el RPP, flujo de aire y volumen.

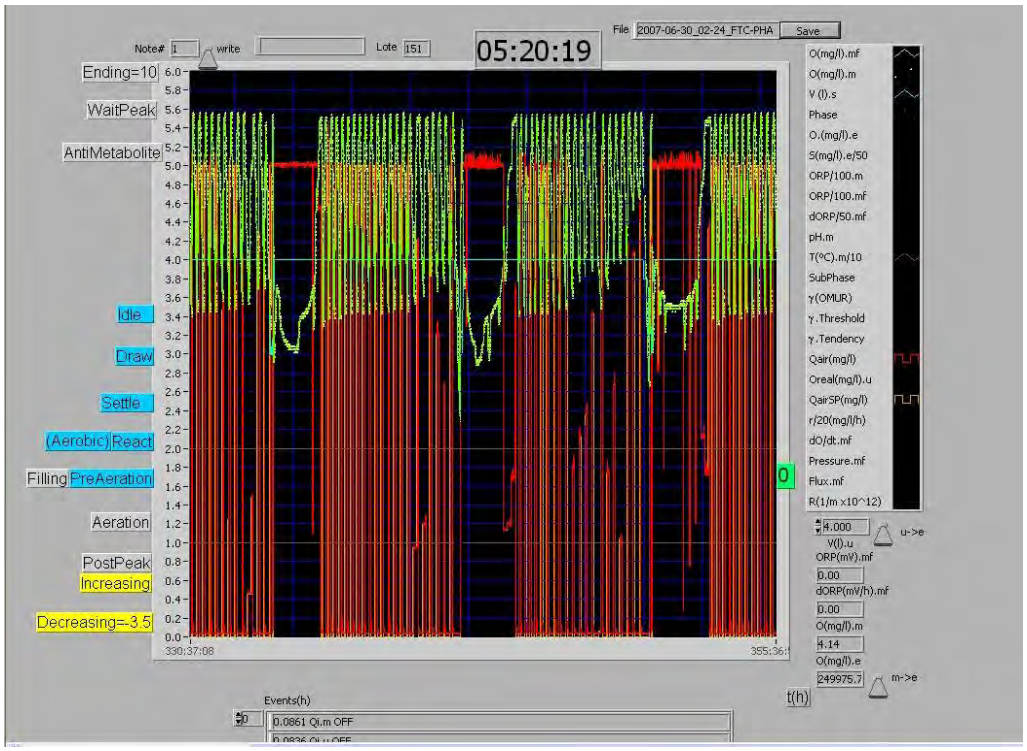


Figura 3.3. Gráfica de control de oxígeno disuelto, volumen, temperatura y flujo de aire

Para el RPP, durante el Bloque I (UNAM-DF) simplemente se registraba el oxígeno disuelto (OD) y el operador adicionaba un pulso de sustrato cuando observaba que el OD bajaba y volvía a subir a un valor fijado de antemano.

Para el Bloque II (UNAM-Juriquilla) la operación fue automatizada. La idea de la alimentación con pulsos es suministrar poco sustrato en cada pulso, para que los microorganismos aclimatados sinteticen PHA esperando un periodo de ayuno. Sin embargo, en cuanto este sustrato se agote, se suministra nuevamente sustrato. De esta manera se favorece una acumulación de PHA sostenida hasta alcanzar la saturación del polímero. Para detectar cuándo se ha agotado el sustrato, se usa la información contenida en la señal del OD medido en línea.

Después del pulso de sustrato, durante la acumulación de PHA, es de esperarse una gran actividad metabólica, por lo que tasa de consumo de oxígeno aumenta. La consecuencia de esto es una disminución en la concentración de OD. Cuando el sustrato se ha agotado, la actividad metabólica disminuye y por lo tanto también al tasa de respiración. Esto se refleja en un incremento del OD hacia un valor cercano al valor basal cercano a la saturación. El algoritmo de control detecta estos cambios para adicionar un siguiente pulso de sustrato.

El algoritmo de control calcula en línea la pendiente de la señal de OD. Primero espera que ésta sea negativa tras agregar un pulso de alimentación. Después espera que sea cero cuando empieza a subir el OD por haberse agotado el sustrato. Finalmente inicia la alimentación de otro pulso de sustrato cuando la pendiente es mayor que un valor preestablecido positivo y mayor que un cierto porcentaje del valor de OD máximo. Esta idea está basada en las investigaciones realizadas por Westerberg et al. (2007) con al diferencia de que en dicho trabajo se establece un valor fijo de referencia para el OD a partir del cual se adicionan los pulsos.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

C a p í t u l o 4

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

4.1.1. Caracterización de la biomasa del Bloque I (UNAM-DF)

El objetivo que se pretendió en el reactor de enriquecimiento fue aclimatar a los microorganismos, logrando una selección y multiplicación de los mismos. Esto último se debe a las transformaciones fisiológicas en su sistema metabólico, es decir, las alteraciones a nivel regulación y producción enzimática a partir de las condiciones de operación en la alimentación (abundancia y ayuno).

Dentro de la serie de experimentos del Bloque I se trabajó en la aclimatación en dos ocasiones. La figura 4.1 presenta la evolución de los SSV de la última aclimatación.

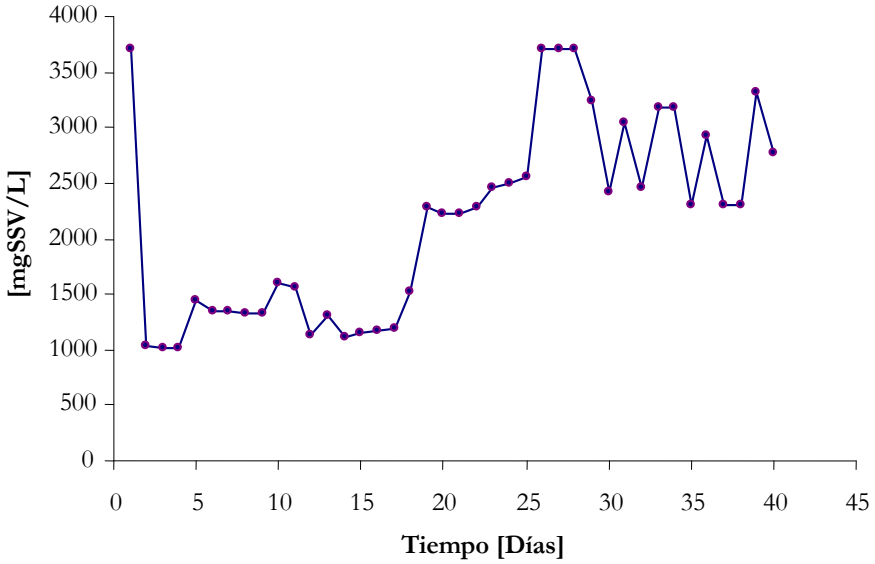


Figura 4.1. Monitoreo de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) del RES durante el Bloque I.

Se realizaron tomas de muestras periódicas al RES, pero al inicio de la experimentación los resultados no fueron favorables, ya que el lodo mostró características cualitativas no deseables (color café verdoso, consistencia viscosa, una sedimentación deficiente y un olor desagradable); atribuyéndose a la procedencia de la planta de tratamiento de aguas residuales del Cerro de la Estrella, en Iztapalapa, D.F.

Posteriormente se presentó un lavado del biorreactor, por lo que se controló la biomasa agregando lodo nuevo y variando el tiempo de reacción y sedimentación. Sin embargo no se obtuvieron buenos resultados al respecto, debido probablemente a la presencia excesiva de microorganismos filamentosos. Por esta razón se detuvo el estudio y se reinculó el reactor con lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.

El reactor se re-inoculó con 3700 mgSSV/L de lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, manteniéndolo con una agitación mecánica de 500 r.p.m. Inicialmente el índice volumétrico de lodos (IVL) fue de 176 mL/g, por lo que se tuvo que cambiar el tiempo de sedimentación a 70 minutos para no perder biomasa. Sin embargo, a partir del día 11 se empezó a observar una aceptable sedimentación; aunado a esto, en el programa de control automático se fueron modificando paulatinamente los tiempos de sedimentación hasta llegar a 10 minutos. A partir de ese momento se establecieron los tiempos del régimen de operación que se muestra en la tabla 3.2. Las características cualitativas del reactor después de la aclimatación fueron convenientes para la operación del reactor SBR (sin presencia de olor, color café claro, una eficiente sedimentación y evidente formación de flóculos).

En el día 18 de haber inoculado el reactor se observó un ligero crecimiento de los microorganismos hasta mantenerse en una concentración relativamente constante. Se consideró entonces que la actividad metabólica ya no era la misma; la biomasa se había tornado a células de de mayor edad que se denominará en adelante "lodo viejo". Esto se puede corroborar con el análisis de la respirometría donde se aprecia que la tasa de respiración disminuye y se mantiene constante por unos días, antes de volver a disminuir (ver figura 4.2).

Como la técnica de respirometría es una medida que interpreta la tasa de respiración del lodo activado, de los resultados obtenidos se puede decir que la actividad metabólica de la biomasa fue disminuyendo al transcurrir el tiempo. En los primeros días después de que se inoculó el reactor el consumo de la alimentación era relativamente rápido mientras que la concentración de sólidos volátiles disminuía (véase la figura 4.1).

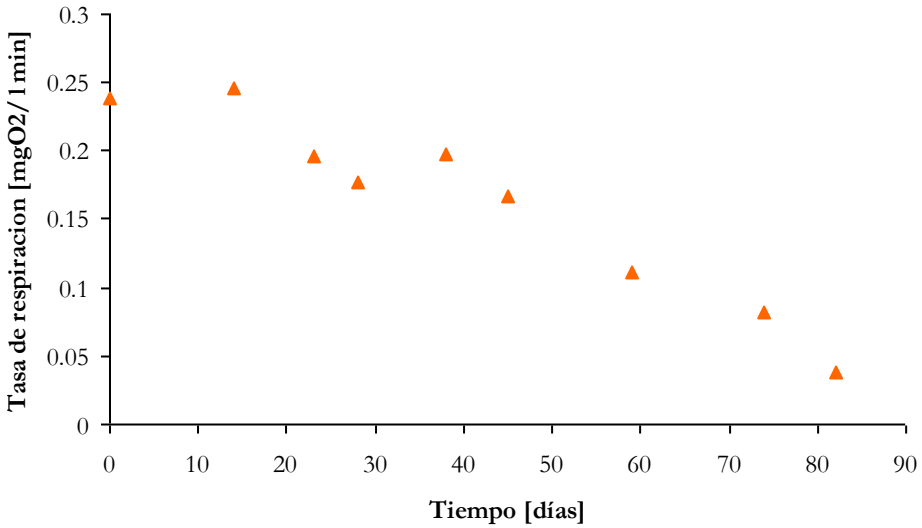


Figura 4.2. Evolución de la tasa de respiración durante el Bloque I (UNAM-DF).

A partir del día 23 se observa que la tasa de respiración se mantuvo en un rango de 0.17 – 0.19 mgO_2/ L-min, aunque para el día 30 comenzó a disminuir. Esto se atribuye a la edad del lodo. Relacionando este fenómeno con la figura 4.1, se observa que los sólidos suspendidos volátiles no se mantuvieron constantes después del día 30, sino que disminuyeron lentamente.

Los estudios de ciclo o cinéticas del RES y RPP muestran que los ácidos grasos son consumidos rápidamente a la media hora, provocando una fase de abundancia relativamente corta y una fase prolongada de ayuno (más adelante se explicarán con detalle) para un determinado tiempo de ciclo. Mediante un análisis realizado previamente del COT a diferentes intervalos de tiempo de reacción (véase la figura 4.3), se obtuvo la concentración efectiva en el reactor tras la alimentación, siendo de 0.375 g DQO/L. También se determinó el tiempo de reacción y sedimentación en el RES (ver tabla 3.3.); la población microbiana está bajo estrés y sobreviviendo sólo los microorganismos más aptos, por lo que el proceso de consumo de sustrato se dirige a energía y resistencia.

En el periodo en que la tasa de respiración se mantuvo constante, la biomasa aumentó, lo cual se interpreta como que el consumo de sustrato se dirige a crecimiento. Entonces puede considerarse que el lodo está ya aclimatado y apto para realizar pruebas de producción de PHA. Sin embargo, aún se desconocía si realmente se inclinaba a la vía metabólica de producción del biopolímero.

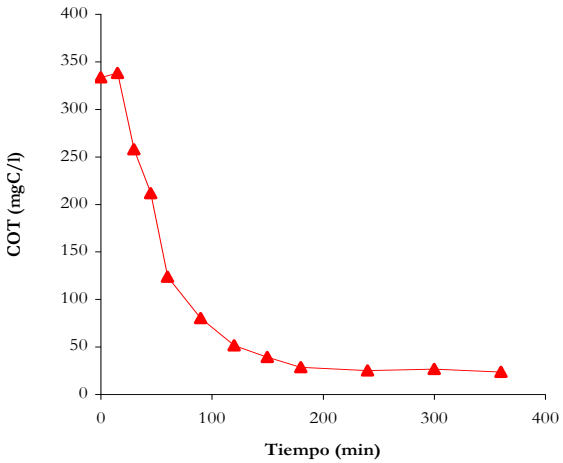
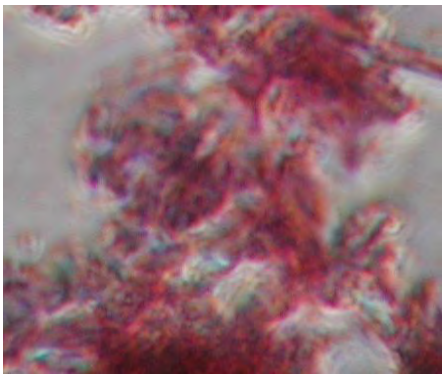


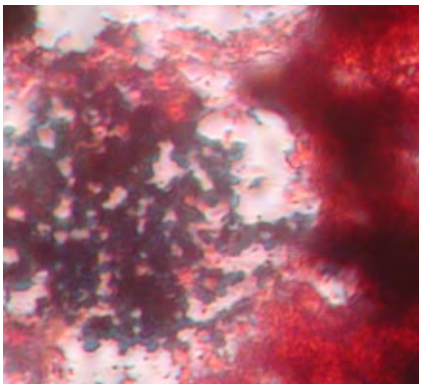
Figura 4.3. Evolución del COT durante un ciclo característico del Bloque I (UNAM-DF).

Se realizaron tinciones con negro de Sudán y safranina para poder considerar al RES como aclimatado y apto para la producción de PHA; también en los estudios de ciclo se realizaron estos análisis cualitativos en los dos reactores para corroborar los resultados obtenidos de los mismos.[1]

Figura 4.4. Tinciones con Negro de Sudán

Los resultados obtenidos se pueden ver en las imágenes de la figura 4.5.





(a) (b)

Fig 4.5. Microfotografías de biomasa teñida con negro de Sudán y safranina:
(a) Ausencia de PHB, (b) Presencia de PHB.

[1] En todos los estudios de ciclo se realizaron tinciones al inicio y al final de la cinética; también se realizaron durante el análisis rutinario y periódico (tomando una muestra cada día) en los RES del Bloque I y Bloque II.

Se logra apreciar la diferencia de colores indicando la presencia y ausencia del polímero. En estas tinciones las inclusiones intracelulares de PHA se tiñen de color negro, mientras que las paredes celulares lo hacen de color rojo.

Se tomaron varias muestras con su respectiva repetición, y en los resultados obtenidos en el microscopio se manifestó que al inicio de la re-inoculación del RES había ausencia de PHA (figura 4.5. (a)). Posteriormente, al ya considerar que la biomasa estaba enriquecida y aclimatada, se observó la presencia de gránulos intracelulares de PHA (figura 4.5. (b)).

Para comprobar la aclimatación de la biomasa de los resultados mostrados hasta el momento, se realizó un estudio de ciclo exploratorio con un litro de licor mezclado del RES mediante una alimentación por pulsos, con una concentración global en la alimentación de 100 gDQO/L, adicionando 1 mL en cada pulso de manera manual al observar que el oxígeno disuelto llegara al valor de referencia de 4.1 mg O_2/L tras un descenso después de agregar el pulso. Este modo de alimentación por pulsos se siguió durante 8 horas de reacción.

Al final de la cinética se tomó una muestra de biomasa para realizar un análisis cromatográfico, obteniéndose como resultado un cromatograma con dos curvas: una del analito (curva morada) y otra del estándar (curva negra) (figura 4.6). Se observa un pico pronunciado en la muestra de estudio en el tiempo de retención del estándar, lo que refleja la presencia de PHA. En esta prueba no se cuantificó el PHA aún.

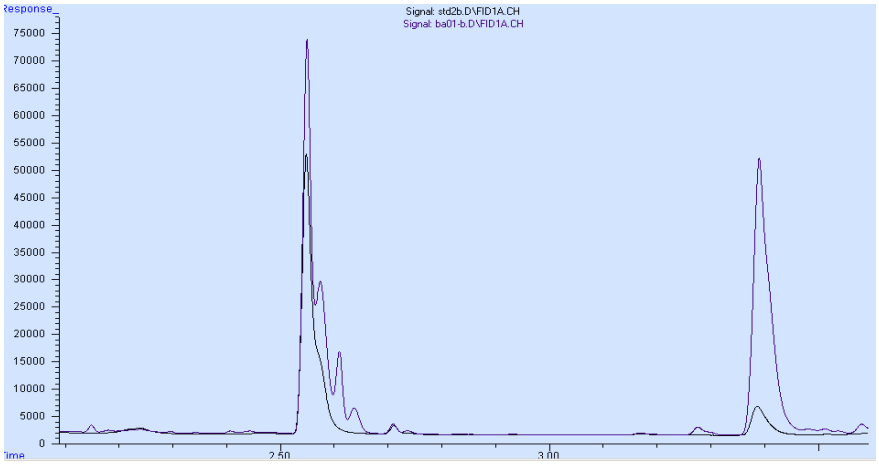


Figura 4.6. Cromatograma de un estudio exploratorio del reactor de producción UNAM-DF

Con base en el análisis de los resultados obtenidos de SSV, la actividad metabólica de consumo de oxígeno, el análisis cualitativo mediante tinciones de las muestras del reactor y el análisis cromatográfico de PHA, se concluye que una biomasa proveniente de una planta de tratamiento de agua residuales municipales es susceptible de ser aclimatada a la producción y acumulación del polímero a partir de las condiciones de operación propuestas. Esta fue la base primordial para el grupo de experimentos del Bloque II, realizados en la UNAM-Juriquilla.

4.1.2. Caracterización de la biomasa del Bloque II (UNAM-Juriquilla)

En el Bloque II el reactor se re-inoculó con lodo proveniente de la planta de tratamiento de agua residual de Santa Rosa Jaúregui en Querétaro, habiendo ya definido las condiciones de operación y de respuesta del RES durante el Bloque I. Se muestreó periódicamente tres veces por semana con una réplica (ANEXO C). Cabe mencionar que al arrancar el reactor (31 de enero de 2008), el lodo mostró características cualitativas indeseables, presentándose un color café oscuro, una deficiente sedimentación impidiendo determinar el IVL (se dejó por más de dos horas en una probeta de 1 L y nunca sedimentó), sin presencia de flóculos y olor desagradable, teniendo en un inicio una concentración 2250 mgSSV/L. Después de un lapso de tiempo, se presentó un lavado del biorreactor, disminuyendo la biomasa a un valor de 920 mgSSV/L. Por esta razón se dejó aerear por una noche. Interesantemente tras estas acciones se observaron cambios notables en la sedimentación, que paulatinamente fueron favorables para el sistema, sin necesidad de re-inocular nuevamente.

Como el crecimiento de biomasa fue lento comparado con el Bloque I, hubo cambios en el tiempo de sedimentación hasta que a partir del día 56 al 64 se logró mantener la concentración de sólidos constante (ver figura 4.7). Esto redundó en casi un mes de aclimatación.[2]

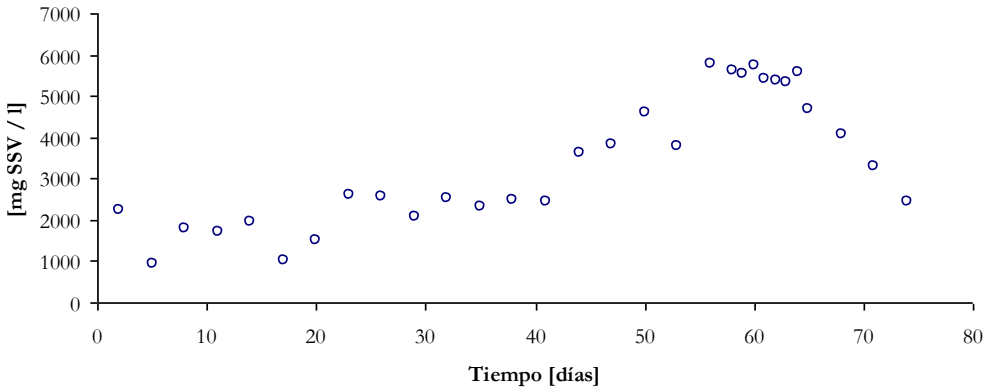


Figura 4.7. Monitoreo de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) durante la operación del Bloque II (UNAM-Juriquilla)

A partir del día 41 se empezó a observar crecimiento de biomasa y una eficiente sedimentación, por lo que paulatinamente se disminuyó el tiempo de sedimentación en el programa de control automático hasta llegar a 30 minutos. A partir de ese momento se establecieron los tiempos que se muestran en la tabla 3.4. Las características cualitativas del reactor después de la aclimatación fueron favorables en cuanto a olor, color, sedimentabilidad y presencia de flóculos.

Durante los primeros días después de haber inoculado el RES la tasa de respiración rondó los 0.1315 mgO_2/L-min (ver figura 4.8). Comparando este valor con los datos del Bloque I, se aprecia que es menor la tasa de consumo de sustrato, lo cual se atribuye a la fuente del inóculo.

Los sólidos suspendidos volátiles aumentaron muy lentamente, debido a su deficiencia de actividad metabólica.

[2] Al final del estudio de lo sólidos se observa una disminución de biomasa; eso es debido a que en ese tiempo se realizaron estudios de ciclos en los dos biorreactores.

La evolución de la tasa de respiración después de la inoculación indica un valor inicial relativamente estable de 0.1315 mgO_2/L-min hasta un máximo de 0.2352 mgO_2/L-min. Posteriormente, a partir del día 15 la tasa de respiración paulatinamente disminuyó hasta alcanzar los 0.0944 mgO_2/L-min al término del día 78. Al arrancar el reactor se observó un aumento de la concentración de biomasa, que posteriormente en el transcurso del estudio tendió a estabilizarse en un valor promedio de 5550 mgSSV/L, aunado a una disminución de la tasa de respiración. A partir de este momento es cuando se tomó lodo para realizar cinéticas de producción teniendo como referencia una tasa de respiración baja, típica de "lodo viejo". Se asumió entonces que el lodo estaba aclimatado y enriquecido, ya que en investigaciones anteriores se observó que los lodos jóvenes tienen tasas menores de acumulación de PHA que aquellos de mayor edad celular (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004). Se llegó a la misma conclusión con base en los resultados obtenidos de los estudios de ciclo durante el Bloque I, los cuales más adelante se explicarán.

Al igual que en el Bloque I, también aquí se realizaron pruebas cualitativas de tinción con negro de Sudán, dando un resultado positivo de acumulación de PHA.

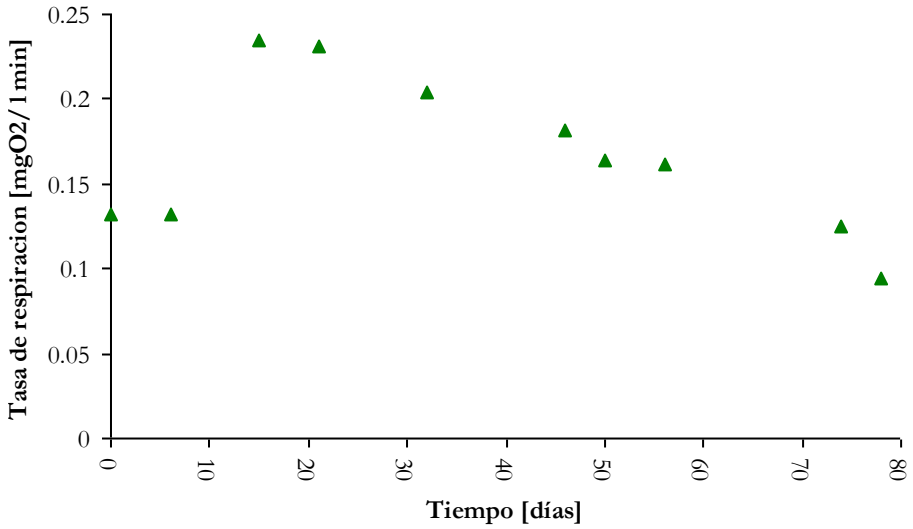


Figura 4.8. Evolución de la tasa de respiración para el Bloque II (UNAM-Juriquilla).

Comparando los resultados del Bloque I y del Bloque II, es claro que es posible obtener una biomasa enriquecida para la producción de PHA, aún cuando los lodos activados empleados como inóculo provengan de distintas fuentes. En el primer caso (Bloque I), la planta de tratamiento de CU recibe efluentes muy diversos y es de esperarse que la biomasa sea distinta a la que está presente en Santa Rosa Jáuregui, cuyos efluentes proceden del pueblo del mismo nombre, así como de una zona industrial cercana. Como deducción parcial se tiene que es posible enriquecer biomasa de diversa índole a partir de una correcta operación del RES. Las presiones selectivas que impone la operación mediante fases de abundancia y ayuno prolongado favorecen un consorcio microbiano con capacidad de acumular PHA intracelularmente.

4.2. RESULTADOS DEL REACTOR DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

En la figura 4.9 se presenta un ciclo representativo de la dinámica de acumulación de PHAs de las 7 réplicas que se realizaron en el tiempo de experimentación durante el Bloque I (UNAM-DF).

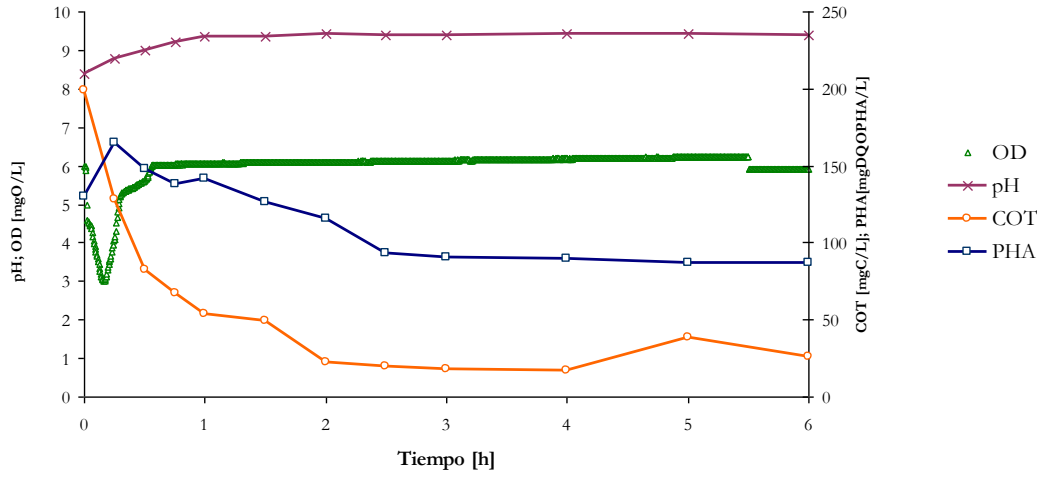


Figura 4.9. Cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo durante el Bloque I (UNAM-DF).

Se muestra el comportamiento esperado, en que la curva de oxígeno disuelto (OD) disminuye aproximadamente al mismo tiempo que se comienza a incrementar la acumulación de PHA, lo que remarca que el oxígeno disuelto es un parámetro de control de proceso y por consecuencia indicador de la acumulación y consumo de PHA en el proceso. En la curva presentada se observan dos pendientes durante la subida del OD, pero esto no es una cuestión metabólica de los microorganismos sino que se atribuye a la acumulación de biomasa en la zona sensible del sensor. El pH aumentó ligeramente, iniciando en 8.4 e incrementándose hasta 9.4; vale la pena recordar que no se tiene control de este parámetro. Los resultados obtenidos para este estudio de ciclo se presentan en el ANEXO E, donde se calcula la velocidad específica de producción, indicando la acumulación de PHA en determinado tiempo, así como la productividad del proceso. La máxima acumulación de PHA se logra en el tiempo t=0.25 horas; después se observa una disminución del biopolímero debido a la escasez de alimento, lo que motiva metabólicamente a consumir el mismo para el mantenimiento celular.

La figura 4.10 muestra la evolución durante un ciclo del RES de la tasa específica de acumulación de PHA. Se observa que la mayor cantidad de PHA que se obtuvo a los 15 minutos de la reacción y fue de 164.92 de PHA en mgDQO/L, por lo que el rendimiento máximo, en peso seco celular, es de 8.35 mgPHA/mgSSV (ver ANEXO F) con una tasa especifica de acumulación de PHA máxima de 0.1448 mgDQO/mgDQO-h.

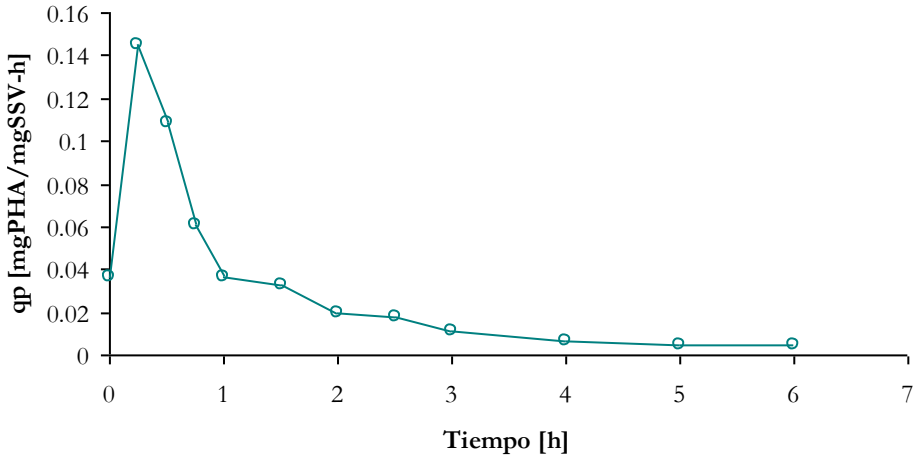


Figura 4.10. Velocidad especifica de producción durante el Bloque I (UNAM-DF).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se manifiesta que las condiciones de operación propuestas para el RES en general son efectivas para que la biomasa sea capaz de almacenar PHA mediante condiciones dinámicas de alimentación basadas en abundancia y ayuno de sustrato.

El estudio de las condiciones favorables para enriquecer la biomasa y hacerla productora de PHA continuó durante el Bloque II en la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, pero utilizando un consorcio microbiano de mayor edad celular. En este caso, los resultados de un estudio de ciclo se muestran en la figura 4.11.

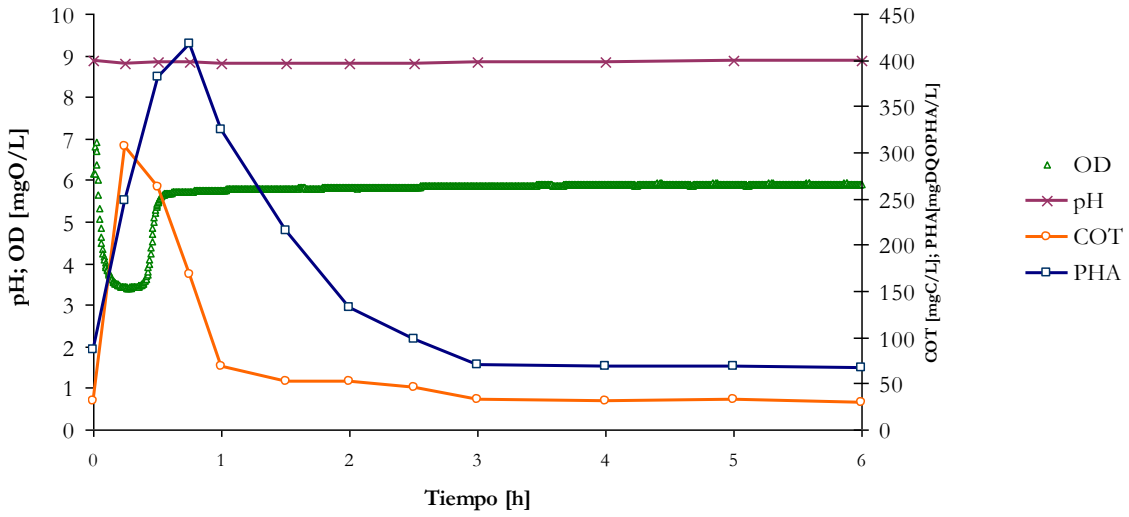


Figura 4.11. Cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo del Bloque II (UNAM-Juriquilla).

De 8 réplicas realizadas, en la figura 4.11 se presenta un ciclo representativo de la dinámica de acumulación de PHAs. De estas réplicas, tres de ellas se realizaron cuando la tasa de respiración se mantenía constante, pero se observó gran variabilidad entre los valores de PHA producido (medidos como mg de PHA). Se atribuye a que la primera réplica se realizó en el primer día, la segunda replica después de 4 días y la tercera en el séptimo día de haber iniciado un análisis detallado; la desviación estándar fue de 2.24 mgPHA, por lo que los datos no

fueron tomados en cuenta. Las otras 5 réplicas se realizaron consecutivamente para no obtener discrepancia en los resultados.

Al igual que en el caso anterior, el pH no varió significativamente y se mantuvo entre 8.80 y 8.89, sin tener control del mismo.

Comparando esta cinética con la del Bloque I, se observó que se tiene una mayor acumulación del PHA hasta agotarse el sustrato, obteniéndose una máxima acumulación a las t=0.75 horas, mismo que es consumido durante la fase de ayuno para mantenimiento celular. Los resultados obtenidos se presentan en el ANEXO G.

En este estudio de ciclo (figura 4.12) la mayor cantidad de PHA que se obtuvo fue a los 45 minutos de la reacción, lo cual resulta muy diferente a la cinética del Bloque I, debido a una actividad metabólica muy lenta. Sin embargo, el resultado fue de 416.65 mgDQO/L de PHA, siendo el rendimiento máximo, en peso seco celular, de 15.05 mgPHA/mgSSV (ver ANEXO H) con una tasa especifica de acumulación de PHA máxima de 0.1162 mgDQO/mgDQO-h.

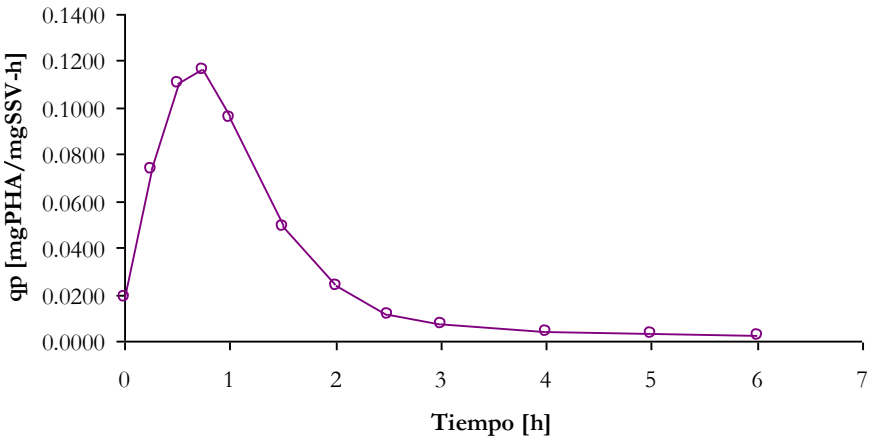


Figura 4.12. Evolución de la velocidad especifica para el Bloque II (UNAM-Juriquilla).

A continuación se muestra una comparación del peso seco de las cinéticas realizadas en ambos bloques: UNAM-DF y UNAM-Juriquilla.

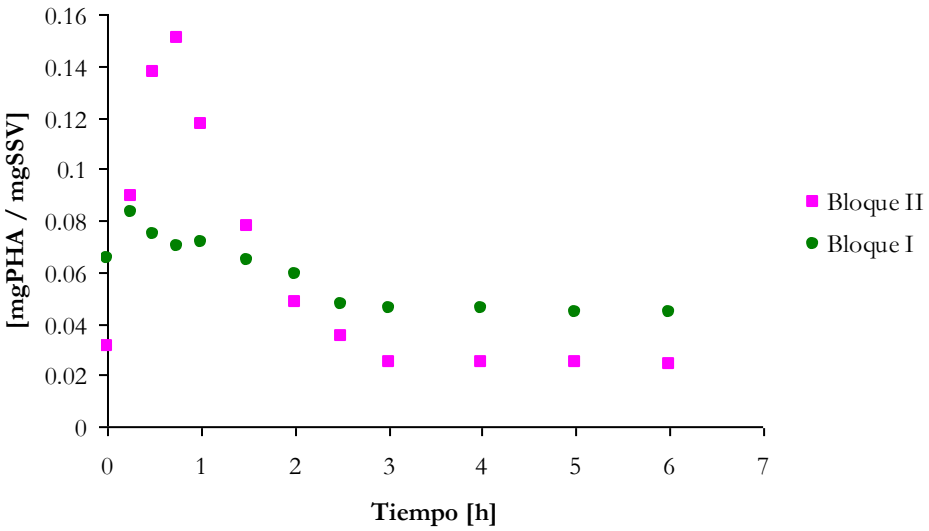


Figura 4.13. Evolución de PHA en peso seco celular para los Bloques I y II en el RES.

Comparando los resultados para ambos bloques experimentales, se observa que a partir de un "lodo viejo" se obtiene una mayor acumulación. Este podría explicarse considerando que los microorganismos no se limitan a llevar toda la energía del consumo de sustrato a la cadena respiratoria, sino que se enfocan a una fosforilación a nivel de sustrato, manifestándose en la acumulación del polímero como forma de prevención al ayuno, lo cual se asocia con la relativa estabilización de concentración de SSV ver la figura 4.7.

Las respirometría se utilizó como un indicador de que la biomasa estaba ya aclimatada, manifestando la actividad metabólica del consumo de sustrato en la célula, pero solamente expresa si los microorganismos son aptos para consumir acido acético y propiónico. No indica realmente si ya existe producción del polímero, y debe complementarse con el análisis cualitativo de las tinciones, el monitoreo de biomasa y la cuantificación de PHA.

En general el RES es una opción como un tratamiento avanzado en la remoción de material orgánico, en función de que en un lapso de 15 – 30 minutos es consumido en su totalidad, dando como resultado una tasa especifica de consumo de AGVs en un rango de 0.3885 – 0.4293 mgDQO/mgDQO-h, una tasa especifica de acumulación de PHA en un rango de 0.1162 – 0.1448 mgDQO/mgDQO-h y un máximo rendimiento en peso seco celular de 15.05 mgPHA/mgSSV. Operando bajo el régimen propuesto se tratan 72 gDQO/L – día, reflejando así una alternativa para las plantas de tratamiento de agua residual, con la ventaja de que además a partir de un desecho se logra un beneficio económico al obtener un producto de utilidad: el PHA.

De los datos obtenidos se obtuvo el análisis tiempo de retención celular (TRC) para el biorreactor RES que se muestra en la figura 4.14.

Se toma el tiempo de retención celular entre el rango de 17-21 días como un parámetro de operación para las condiciones de operación del RES porque a mayor tiempo se pierde biomasa debido la edad del lodo, se tiene una alta actividad metabólica, con ayuda de las cinéticas realizadas tanto en el bloque I y II se observo que a mayor edad celular se obtenia una tasa mayor de acumulación de PHA y por ultimo sabemos que a mayores tiempos de retención de sólidos se presenta una nitrificación (18-40 días) por lo que se encuentra en el intervalo optimo de sedimentabilidad y eficacia de depuración del lodo activado con los parámetros de diseño (Eckenfelder, 1980).

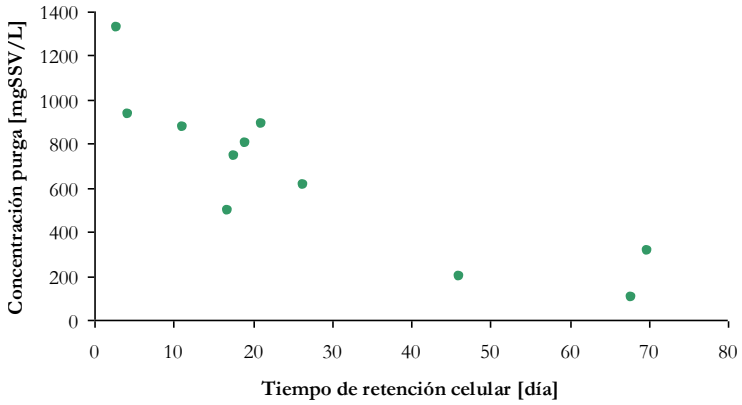


Figura 4.14. Tiempo de retención celular en el RES.

De los datos obtenidos tenemos una relación óptima alimento / microorganismos de 0.375 con una carga orgánica de 0.3 gDQO/ g SST·día, con una concentración de sólidos suspendidos volantes de 4000 mgSSV / L y un flujo de purga de 1 litro.

4.3. RESULTADOS DEL REACTOR DE PRODUCCIÓN

En esta sección se muestran los resultados obtenidos en el reactor de producción, tanto del Bloque I, en donde se analizó el régimen de alimentación (lote y pulsos), como del Bloque II, con un suministro de sustrato ya sólo por pulsos, El objetivo fue estudiar el efecto de régimen de alimentación en el reactor de producción de PHA (RPP) con el fin de optimizar el proceso en cuanto a la producción del biopolímero.

Para el RPP en la experimentación concerniente al Bloque I, se cambiaron las condiciones del régimen de alimentación, con una mayor concentración global (25 gDQO/L) que en el RES. En la figura 4.15 se muestran los resultados al suministrar todo el sustrato al inicio de la reacción (operación en lote). Tras la alimentación se observa una ligera disminución del oxigeno disuelto y un incremento lento de la concentración de PHA. Se consideró que fue por una inhibición a nivel de sustrato, ya que es sabido que a altas concentraciones de sustrato no se favorece la acumulación del biopolímero (Mulchandani, 1989). Se observa también un aligera disminución del PHA hacia el final del ciclo, debido al consumo del polímero para mantenimiento celular cuando ya se está en fase de ayuno. En la figura también se observa que el pH se mantuvo en un rango de 7.79 a 8.53.

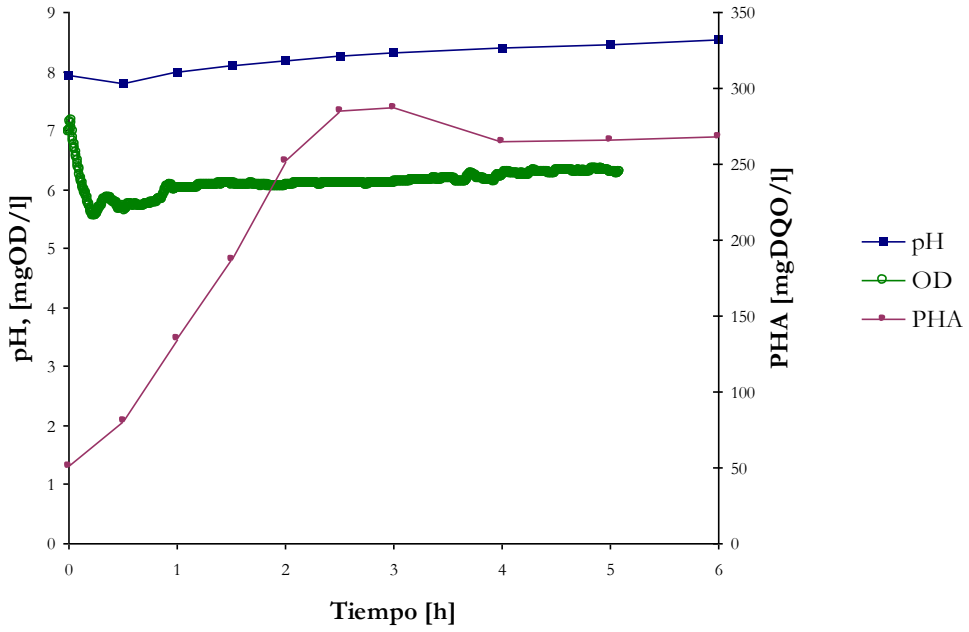


Figura 4.15. Cinética régimen de alimentación en lote en el RPP del Bloque I (UNAM-DF)

Con el fin de ensayar lo que sería el algoritmo de control propuesto para incrementar la producción de PHA en el RPP, en los experimentos del Bloque I se colocó una sonda de oxígeno disuelto y se monitoreó esta variable. Al agregar un pulso de sustrato de forma manual, el valor de OD disminuye debido a que la biomasa utiliza el oxígeno disuelto disponible para consumir el sustrato y almacenarlo en forma de PHA. Cuando se llega a la máxima acumulación de PHA el OD aumenta debido a que la tasa de respiración es menor en cuanto el PHA está siendo consumido. El siguiente pulso se agrega entonces cuando el OD alcanza un valor establecido de antemano. Para los experimentos realizados el valor de referencia se fijó en 4.1 mgOD/L. Para esta fase experimental, el algoritmo aún no estaba automatizado, hubo mucha variabilidad en alcanzar este punto. En todo caso la idea de este experimento era mantener a los microorganismos en una fase de abundancia prolongada, hasta saturarlos de PHA.

En la figura 4.16 se muestran los resultados obtenidos de acumulación del biopolímero. Se observa que al agregar los pulsos de 1 mL con una concentración en el reactor tras la alimentación de 0.025 gDQO/L, el oxígeno disuelto sigue la misma tendencia: disminuye y se incrementa, indicando que el sustrato es consumido y almacenado. Esto se repite hasta que la biomasa se satura de PHA, posteriormente se deja de alimentar y entonces se observa un ligero consumo del PHA acumulado. Es interesante notar cómo la acumulación de PHA bajo este régimen es constante hasta llegar a la saturación de las células.

El rango de pH estuvo en el intervalo de 7.51 a 8.84, que es la misma tendencia que en los otros estudios de ciclo.

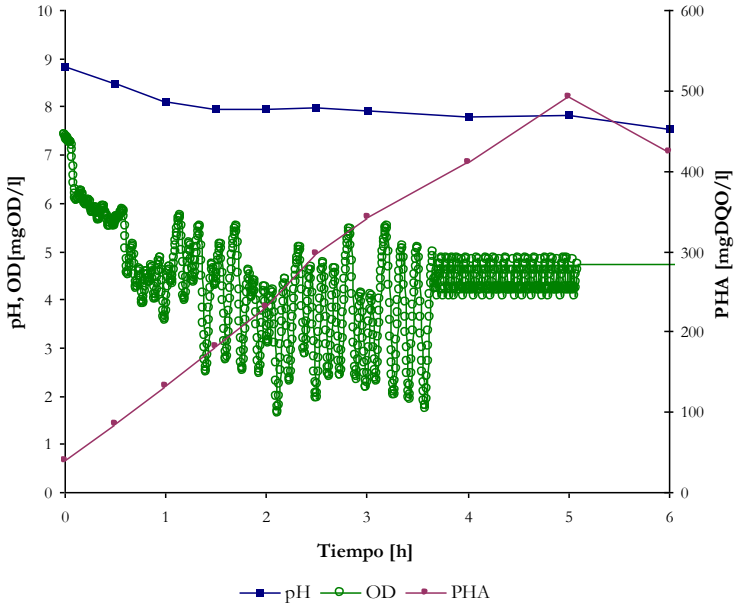


Figura 4.16. Cinética del régimen de alimentación por pulso en el Bloque I (UNAM-DF).

La figura 4.17 muestra una comparación de la evolución de la fracción de PHA en peso seco celular bajo los regímenes de alimentación por lote y con pulsos.

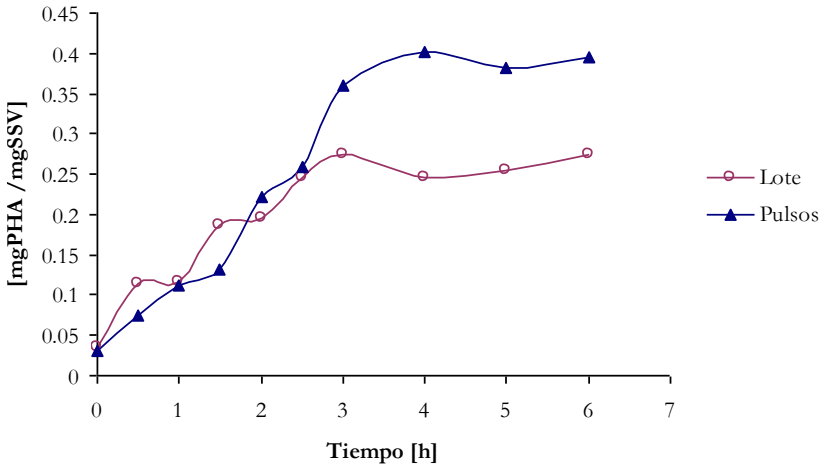


Figura 4.17. Fracción de PHA en peso seco celular para el RPP bajo dos regímenes de alimentación en el Bloque I.

En la figura 4.17 se ve claramente la diferencia de acumulación intracelular. Con el régimen de alimentación por lote la mayor cantidad de PHA que se obtuvo fue a las 3 horas debido a una asimilación muy lenta, ya que se tiene una mayor cantidad de sustrato. El resultado fue de 480.82 de PHA en mgDQO/L por lo que el rendimiento máximo, en peso seco celular, es de 0.2739 mgPHA/mgSSV (ver ANEXO I). Con el régimen de alimentación por pulsos se obtuvieron 824.09 mgDQO/L de PHA, teniendo un máximo rendimiento, en peso seco celular, de 0.4025 mgPHA/mgSSV (ver ANEXO J). Comparando ambos regímenes de alimentación es claro que por pulsos se obtiene mayor eficiencia de producción en el sentido de que se tiene una acumulación de casi el doble en el mismo tiempo. Los resultados aún así son bajos, si se comparan con otros reportados (Serafim et al 2004, Dionisi et al 2004, Westerberg et al. 2007, Arcos 2007).

Los mismos experimentos se repitieron para el Bloque II, pero cambiando la alimentación por pulsos a una completamente automatizada, como se detalla en la sección 3.4 de este trabajo. Al inicio de la experimentación en este bloque se pensó que una mayor concentración en el reactor colapsaría al sistema. Desde la perspectiva enzimática, la inhibición de la biomasa medida mediante respirometrías podría indicar qué es lo que esta pasando en el RPP. Así que se realizaron algunos experimentos previos para constatarlo.

Se propusieron concentraciones de 100, 80, 60, 25, 10 y 5 gDQO/L, las cuales son concentraciones altas. Mediante respirometrías se determinaron las velocidades específicas de consumo de sustrato en cada caso. Los resultados se muestran en la figura 4.18 y son los promedios de 3 réplicas. A altas concentraciones la velocidad de consumo de oxígeno es menor, aunque esto no refleja la acumulación del biopolímero.

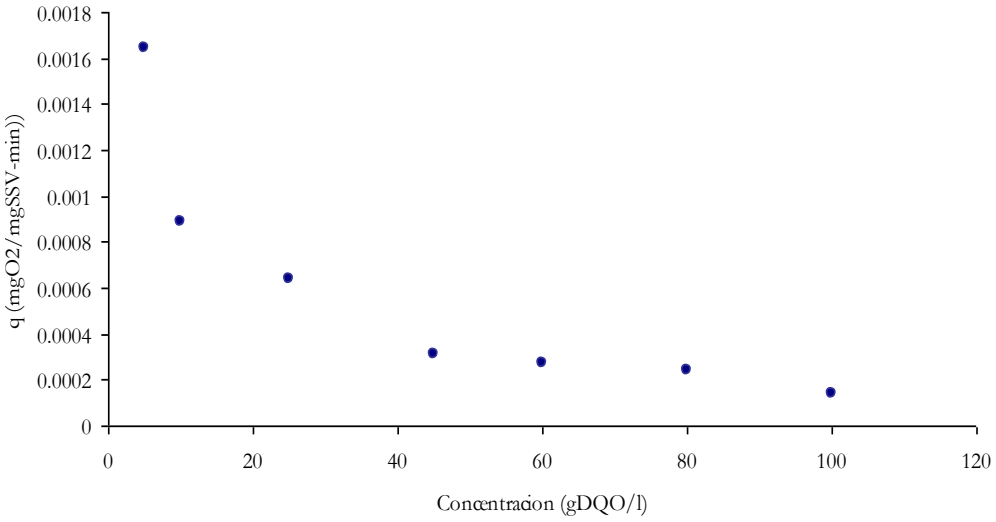


Figura 4.18. Velocidad especifica de consumo de oxígeno contra concentración

En el ANEXO K se observan las respirometrías realizadas en cada experimento de la respirometría se tomaron muestras al inicio y al final de cada experimento, cuantificando la cantidad de biopolímero intracelular que se produce en cada concentración propuesta.

En la figura 4.19 se muestra la velocidad especifica de producción de PHA, observándose una velocidad máxima de 72.70 mgDQO/mgDQO-min. Se esperaría que al comparar estos resultados con la velocidad de consumo de oxigeno se obtuviera una misma tendencia, ya que la relación entre consumo de oxigeno y de sustrato es proporcional a la acumulación del producto. La figura 4.19 muestra dos máximos en la velocidad de producción de PHA, pero los dos últimos datos (80 y 100 gDQO/L) no son tan confiables debido a la gran variabilidad de los resultados para las repeticiones realizadas. Eliminándose los dos últimos puntos de la figura se presenta una curva que sería acorde con algunos resultados que indican que en la producción de PHA existe inhibición por exceso de sustrato (Mulchandani et al. 1989; Shahrokh, 2004; Patnaik, 2005).

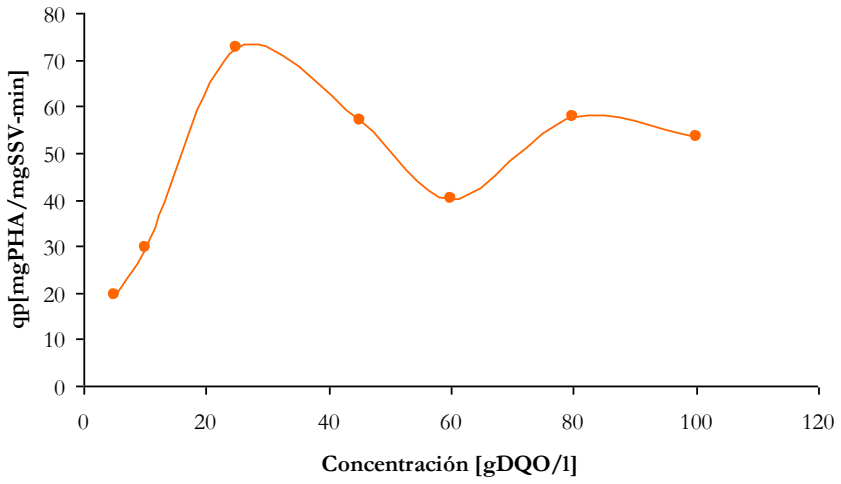


Figura 4.19. Velocidad especifica de producción de PHA durante las pruebas respirométricas.

En el caso de la alimentación por pulsos para el Bloque II (UNAM-Juriquilla), se realizaron 5 cinéticas con las mismas condiciones. Una cinética representativa se muestra en la figura 4.20, usando ya la automatización del proceso de adición de pulsos de alimentación La concentración de oxigeno disuelto osciló alrededor de 6.5 mgOD/L. Cada pulso agregado fue de aproximadamente de 1 mL y se pueden observar las oscilaciones de la curva de oxigeno disuelto al agregar cada pulso. De manera inmediata y proporcional se puede observar el aumento de PHA mientras se va agregando poco a poco el sustrato.

A los 30 minutos se bajó el flujo de aire de 2.25 L/min de 1.8 L/min, ya que no se podía distinguir una pendiente pronunciada; al final nuevamente se bajó el flujo a 0.85 L/min. Para este experimento en particular resultaron un total de 27 pulsos efectuados.

El pH se mantuvo en un rango de 9.02 a 9.11. No se incrementó el valor de pH como en los experimentos del Bloque I, atribuyéndose esto a que el agua en el lugar de la experimentación (Juriquilla) tiene muchas sales que la disocian de los ácidos grasos (el valor de pH del agua en Querétaro es de 9.56).

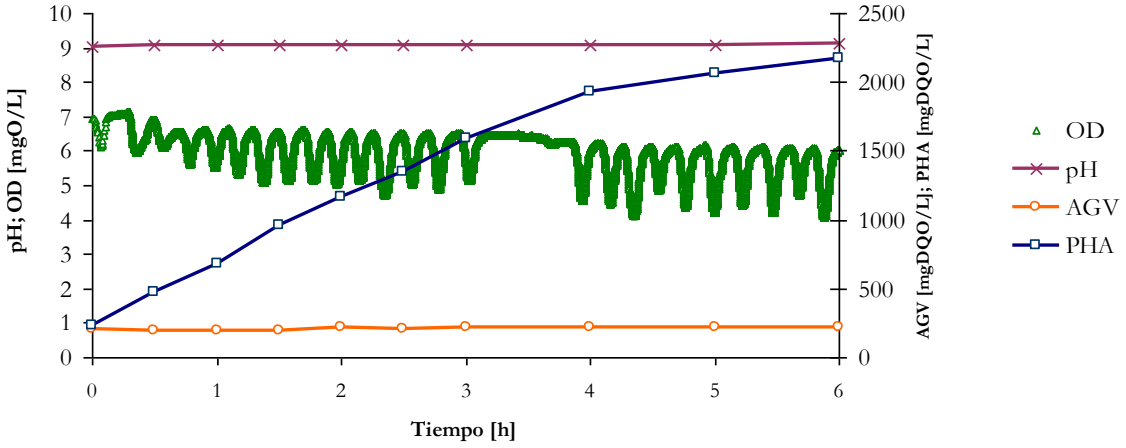


Figura 4.20. Cinética usando un régimen de alimentación por pulsos automatizado en el RPP durante el Bloque II (UNAM-Juriquilla).

Una comparación de la evolución de la fracción de PHA en pesos seco celular el RES con el RPP automatizado (ver tabla correspondiente en el ANEXO N) se puede observar en la figura 4.21.

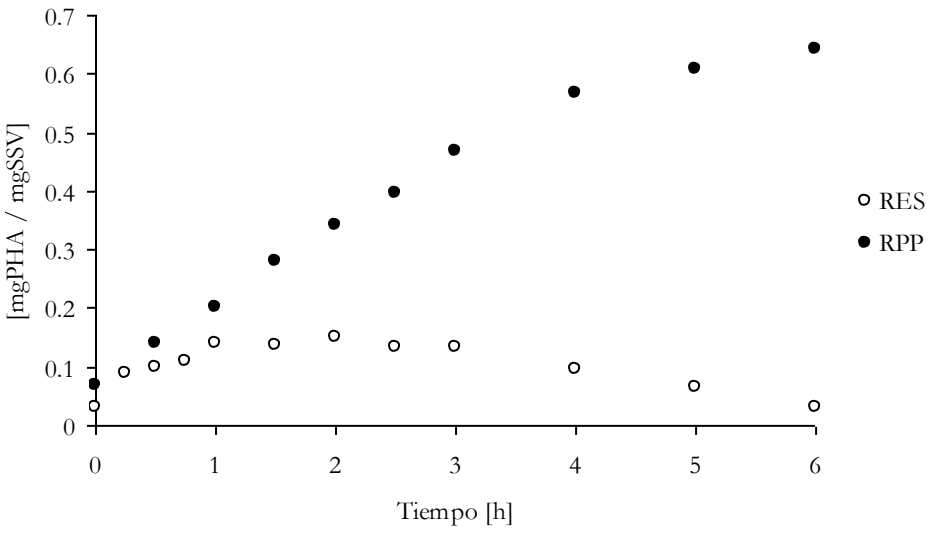


Figura 4.21. Comparación del peso seco celular del RES con el RPP

Es notable que se alcanza una producción de hasta el 64.09% de PHA como peso seco celular en el reactor de producción, indicando una muy buena acumulación del polímero al emplear esta estrategia. Se puede comparar este dato con el 15.04% obtenido sólo con el reactor de enriquecimiento. Estos resultados son alentadores en el sentido de que indican que la estrategia de control basada en una alimentación por pulsos automatizada es adecuada para lograr grandes acumulaciones de PHA. En este caso basta con seguir el perfil del oxígeno disuelto, lo cual no es difícil, pues se cuenta con sensores y transmisores de relativo bajo costo para ello.

Con respecto a los resultados del bloque I con respecto al bloque II podemos decir que el tiempo de retención celular depende de la acumulación del biopolímero (figura 4.22), siendo la carga orgánica diferente.

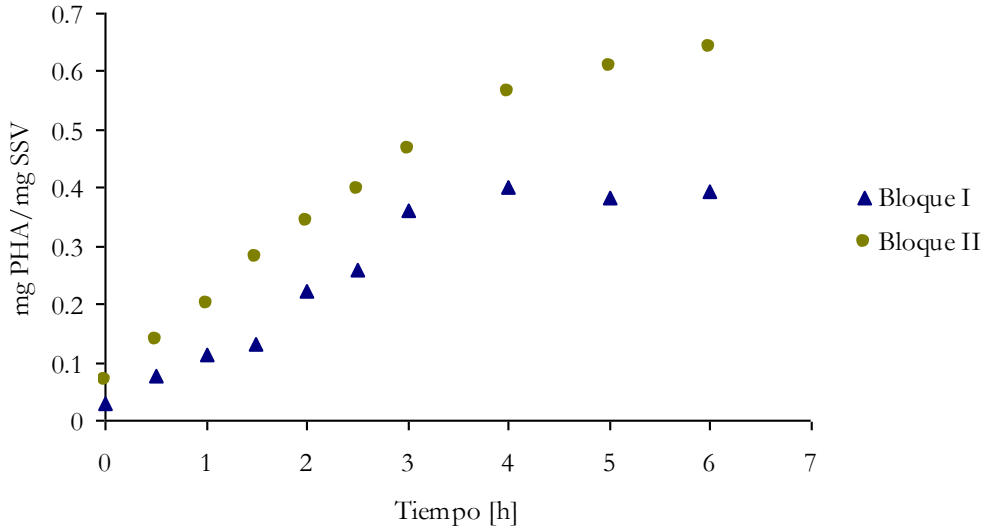


Figura 4.22. Comparación del peso seco celular del bloque I con respecto al bloque II

Con los resultados obtenidos de manera global del presente trabajo; el RES significativamente acumula PHA con condiciones de operación de temperatura de 25 °C, con una agitación mecánica de 500 r.p.m, un flujo de aire de 4 L/min, TRH de un día, con una concentración en el influente de 0.375 gDQO/L, con una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 4000 mgSSV/L, una relación optima alimento / microorganismos de 0.375 con una carga orgánica de 0.3 gDQO/ g SST·día y un flujo de purga de lodos de 1 litro.

En la tabla 4.1 se pueden observar los resultados obtenidos, comparados con otras investigaciones.

Tabla 4.1. Resultados obtenidos en investigaciones recientes

Referencia	Estrategia	% PHA
Arcos 2007	Pulsos	73
Dionisi et al. 2004	Lote	50
Serafim et al. 2004	Pulsos	78.5
Westerberg 2007	Pulsos	75
Este trabajo	Pulsos	64.1

Haciendo una valoración del trabajo realizado, podemos decir que no se rechazó la hipótesis planteada, resultó efectivo el resultado obtenido con las condiciones propuestas, mismo que será base para futuras investigaciones.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

- Con base en el estudio realizado en este proyecto se han determinado las condiciones de operación para un reactor de enriquecimiento selectivo de biomasa con capacidades de acumulación de PHA. Estas son: una concentración inicial de 0.375 gDQO/L, temperatura del reactor de 25 °C sin un control de pH y con una aeración de 4 L/min con una agitación de 500 r.p.m. y TRC en un rango de 17 – 21 días. Se concluye que el reactor de enriquecimiento selectivo funciona eficientemente produciendo biomasa con capacidad de acumulación de PHA con un rendimiento máximo, en peso seco celular, de 15.05 mgPHA/mgSSV.

- Bajo las condiciones con las que se operó el reactor de enriquecimiento (tanto en UNAM-DF como en UNAM-Juriquilla), se favoreció que la biomasa mostrara una acumulación significativa de PHA, con ciclos de operación de 6 horas en un reactor SBR, alternando etapas de abundancia y ayuno, enriqueciendo a los lodos. Las técnicas de respirometría son un buen indicador para determinar cuándo existe ya un lodo de mayor edad celular, con el que se puede obtener una mayor acumulación de PHA; el resultado se puede corroborar con observaciones cualitativas al microscopio óptico usando tinciones con negro de sudán y safranina.

- El uso de los lodos enriquecidos en un reactor de producción donde se dosifica la alimentación, permite obtener buenas acumulaciones intracelulares de PHA. Si la dosificación de alimentación se automatiza, es posible lograr una mayor eficiencia de conversión de PHA, obteniéndose acumulaciones de biopolímero de hasta 64.1% de peso seco celular.

- Estos estudios permiten ampliar el panorama ambiental, y que a partir de un producto de desecho se logra obtener un producto de valor agregado como es el biopolímero PHA al tiempo que se tratan desechos orgánicos disueltos. El trabajo realizado permitirá mejorar las condiciones experimentales de modo que se obtengan aún mejores rendimientos.

Capítulo 6

RECOMENDACIONES

Capítulo 6

RECOMENDACIONES

- A raíz de los resultados obtenidos, en trabajos futuros se puede optimizar aún más la fase de producción y probar las estrategias de operación propuestas con aguas residuales sintéticas más próximas a las que se esperarían de un fermentador acidogénico alimentado con aguas residuales con alta carga orgánica.

- Lo recomendable para futuros trabajos en lo que se refiere al RES, sería ver minuciosamente la aclimatación del reactor para tener una biomasa enriquecida mediante un análisis de biología molecular, tomando muestras de manera periódica.

- Para determinar la viabilidad de un sistema de producción de PHA y tratamiento de aguas residuales, sería conveniente también operar un fermentador que genere el agua rica en AGVs a partir de aguas residuales reales con alto contenido de carbohidratos.

- Sería pertinente observar la influencia de factores como el nitrógeno, que es un elemento que influye en la producción del biopolímero, debido a que se encuentra en una molécula de alta energía (NADPH) en la vía metabólica.

- A partir de los resultados obtenidos el siguiente trabajo se enfocaría en las variables para obtener un modelo matemático y que a partir de eso se mejorar la estrategia de control automático con el fin de maximizar la producción del bioplástico.

ANEXOS

Anexo A: Metabolismo bioquímico en la producción de PHAs

Enzimología

Los pasos para la biosíntesis del PHB han sido estudiados a detalle en pocas bacterias, y mas allá de su búsqueda, particularmente se relata la síntesis y control de la formación del PHB a partir de carbohidratos, el cual es requerido como fuente de carbono. (Alistair J. et al 1990).

- Cetotiolasa

La 3-cetotiolasa ha sido purificada de varias bacterias sintetizadoras incluyendo *Azotobacter beijerinckii*, *Hydrogenomonas eutropha* (ahora *A. eutrophus*) y *Z. ramigera*. (Alistair J. et al 1990)

La 3-cetotiolasa es la enzima que controla la biosíntesis del PHB en *A. eutrophus*, la coenzima A (CoA) es la llave de los efectos metabólicos. Oeding y Schlegel hicieron extensos estudios utilizando variaciones de glucosa en los organismos y también demostraron la presencia de dos procesos enzimáticos distintos (existen 2 tipos de cetiolasas) utilizando diferentes sustratos específicos. Una de las enzimas se activa solamente con C4 y C5 de 3-cetoacil-CoAs, pero la otra es activada en el rango de la cadena (C4 a C1O) del sustrato. Es incierto si una o ambas 3-cetotiolasas participan en la acumulación del PHA en los organismos; estudios *in vitro* a enzimas puras demostraron que funcionan en la síntesis del PHB y solamente en el C4 y el C5 de 3-hidroxiácidos que pueden ser incorporados al PHA por *A. eutrophus* (Holmes et al, 1985). No obstante, es probable que la 3-cetotiolasa sea activa en sustratos de cadena larga, ya que es una enzima asimiladora en el metabolismo de los ácidos grasos (Alistair J. et al 1990).

La 3-cetotiolasa biosintética de *Z. ramigera* es una enzima que ha sido purificada homogéneamente por Tomita et al. (1983) y está sujeta a investigación para analizar la secuencia del rompimiento de enlaces C-C por Davis et al (1987).

- Acetoacetil-CoA reductasa

La acetoacetil-CoA reductasa ha sido detectada en un particular número de bacterias sintetizadoras del PHB incluyendo *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodomicrobium vannielii*, y *Streptomyces coelicolor*, no se reporta la presencia de isoenzimas en estos organismos.

Dos acetoacil-CoA reductasas procesan diferentes sustratos con la ayuda de coenzimas especificas, se encuentran en *Z. ramigera* y *A. eutrophus*. La NADH reductasa de *Z. ramigera* se activa con compuestos L-(+)-3-hidroxiacil- CoAs, y solamente con C4 y C5 para formar D-(-)-3-hidroxiacil-CoAs.

Experimentos con enzimas purificadas especifican que en estos organismos, la acetoacetil-CoA es reducida a D-(-)-3-hidroxiacil-CoA, catalizada por la NADPH reductasa durante la síntesis del PHB (Alistair J. et al 1990).

La NADPH reductasa de *A. eutrophus* se activa con C4 a C6 D-(-)-3-hidroxiacil-CoAs y no se activa con sustratos L-(+); en suma, la reducción de acetoacetil-CoA es solamente a D-(-)-3-hidroxibutiril-CoA. En contraste, la NADH reductasa de *A. eutrophus* sintetiza solamente L-(+)-3-hidroxibutiril-CoA de acetoacetil-CoA y se activa con ambos D-(-) y L-(+) sustratos. Solamente la NADPH reductasa se encontró participando en la síntesis del PHB con la acetil-CoA en sistemas reconstituidos que contenían 3-cetiolasa purificado, acetoacetil-CoA reductasa y PHB sintetasa; esto es porque la PHB sintetasa de *A. eutrophus* es específica para sustratos D-(-).

Es concebible que L-(+)-3-hidroxiacil-CoAs producida durante 3 oxidaciones de ácidos grasos pudieran ser convertidas a D-(-)-3-hidroxiacil-CoAs (via acetoacetil-CoA) por una secuencia de reacciones catalizadas por el NADH y el NADPH reductasas, así habilitando su uso en la biosíntesis del PHB. El microorganismo *Rhodospirillum rubrum*, presenta ambas D-(-)- y L-(+)-enoil-CoA hidratasas, produciendo L-(+)-3-hidroxiacil-CoA por la vía de acetoacetil-CoA reductasa usando ácido acético para síntesis del PHB. Con *A. eutrophus*, la racemización de 3-hidroxiacil-CoAs no es posible porque es estereoespecífica, ya que la [L-(+)] enoil-CoA hidratasa esta presente (Alistair J. et al 1990).

- *La PHA sintetasa*

La enzima PHA sintetasa ha sido encontrada en *R. rubrum*, *B. megaterium*, *Azotobacter beijerinckii*, y *Z. ramigera*. La actividad de la enzima PHB sintetasa de *Z. ramigera* ha sido observada en 2 formas. Se atribuyó a la localización de la proteína (soluble o gránulo-limite) que depende en las condiciones de crecimiento. Los organismos que tienen alto contenido de polímeros poseen actividad del gránulo-limite, y los que tiene poca cantidad poseen una actividad soluble de la enzima; ambas formas de la enzima han sido parcialmente purificadas.

Biosíntesis en R. eutropha

La mayoría de los organismos usan este esquema para sintetizar PHAs. El esquema de biosíntesis de *R. eutropha*, *Zoogloea ramigera*, y *Azotobacter beijerinckii* ya fueron encontrados (Doi et al 1990).

Primero, el sustrato es condensado a acetil-coenzima A (acetil-CoA). Dos moles de acetil-CoA son utilizados para sintetizar una mol de PHB. La acetil-CoA está sujeta a una secuencia de tres reacciones enzimáticas para la síntesis de PHB. La figura A.1 muestra el esquema de biosíntesis de PHB para estos organismos (Doi et al 1990).

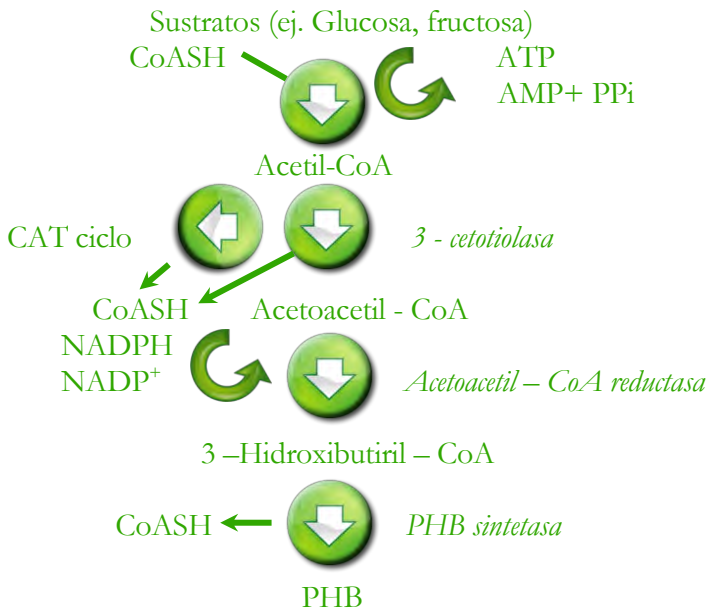


Figura A.1 Esquema de biosíntesis *R. eutropha, Zoogloea ramigera*, y *A. beijerinckii* (Doi et al 1990).

Cuando el ácido propiónico es usado únicamente como sustrato, es formado un copolímero de PHB-PHV. La acetil-CoA es formada por la eliminación de un carbonil de la propinil-CoA. Dos moles de acetil-CoA son usados para formar la unidad de HB del copolímero, mientras la unidad de hidroxivalerato (HV) es formada por la reacción de acetil-CoA. La figura A.2 muestra el esquema de biosíntesis del copolímero PHB/PHV por *R. eutropha* (Doi et al 1990).

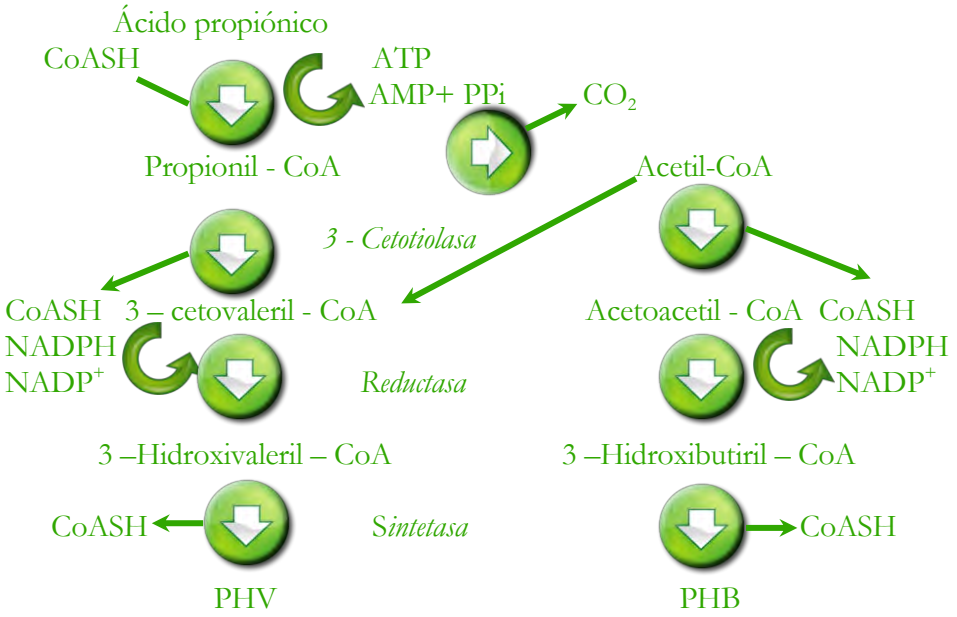


Figura A.2. Esquema de biosíntesis del copolímero PHB-PHV por *R. eutropha* (Doi et al 1990)

De acuerdo con Doi (1990), la degradación de PHA por *R. eutropha* puede ocurrir simultáneamente con la biosíntesis bajo la limitación de nitrógeno. Esta observación es llamada "metabolismo cíclico natural del PHA".El autor reporta la composición de polímero que fue cambiado del homopolímero del PHB al copolímero PHB-49% PHV cuando el sustrato fue transformado de ácido butírico a ácido pentanóico. Después de 96 horas de un periodo de limitación de nitrógeno, se había remplazado de PHB a PHB-PHV. Igualmente, cuando *R. eutropha* con fracción de 56% del PHB del contenido de PHA cuando fue alimentado con ácido butírico como único sustrato bajo limitación de nitrógeno, la composición del PHA cambió notablemente. El metabolismo cíclico natural del PHA se muestra en la figura A.3 (Doi et al 1990).

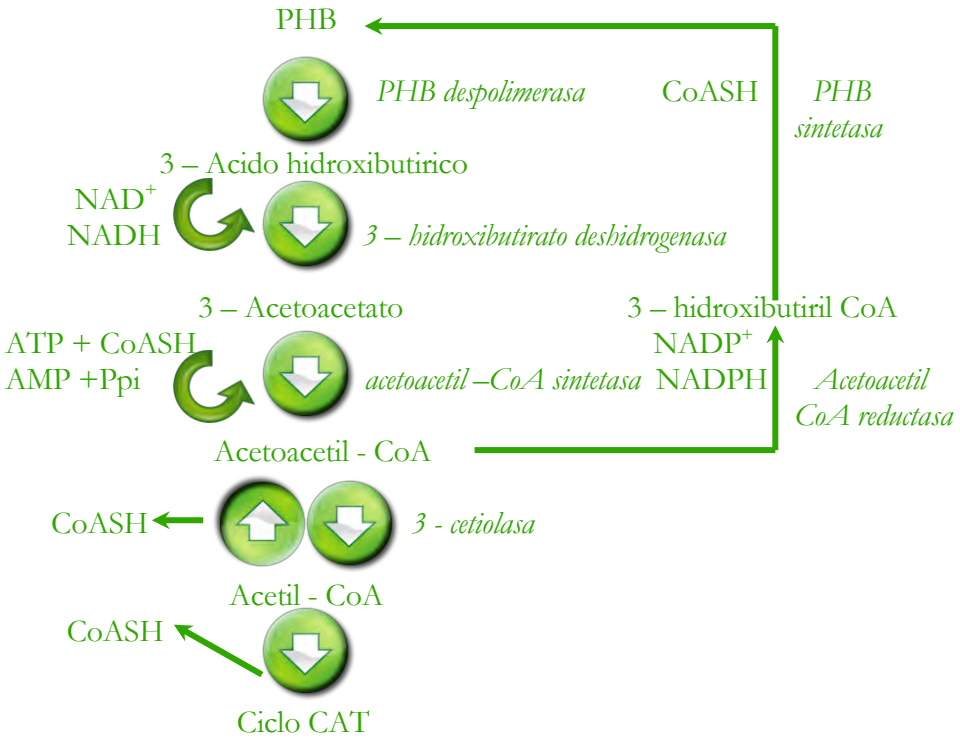
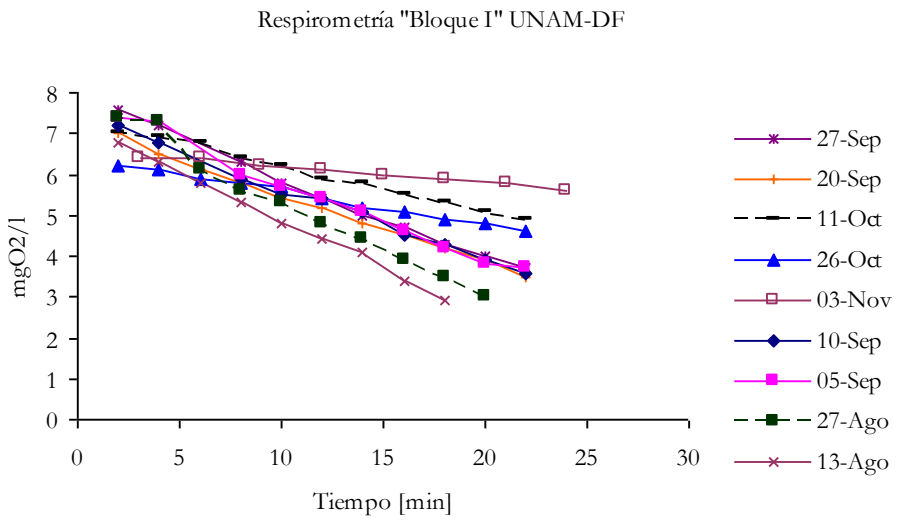


Figura A.3. Metabolismo cíclico natural del PHA (Doi et al 1990)

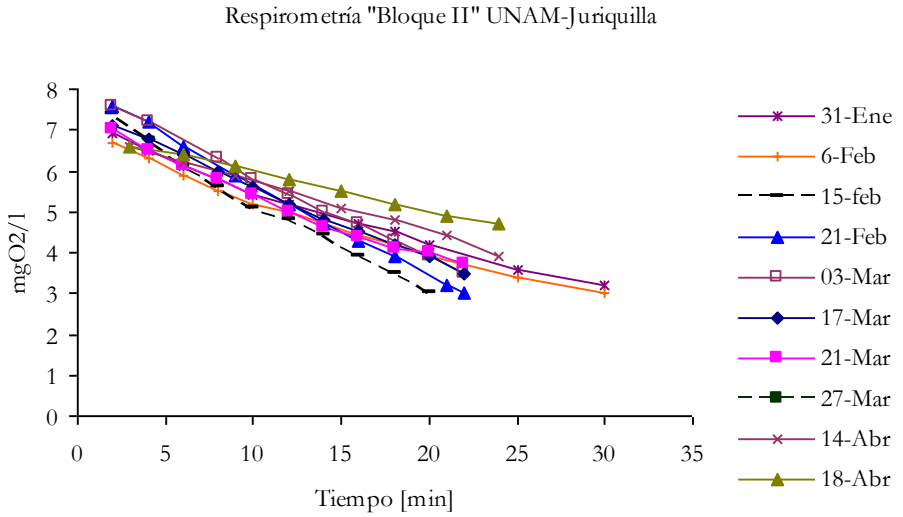
Anexo B: Respirometria "Bloque I" UNAM-DF



Anexo C: Análisis de Sólidos Suspendidos Volátiles "Bloque II" UNAM-Juriquilla

Días	[mgSSV/l]	Días	[mgSSV/ l]
31-Ene	2246.6667	05-Mar	3826.6667
04-Feb	920.6667	09-Mar	4600.0000
05-Feb	1793.3333	11-Mar	3800.3333
06-Feb	1693.3333	13-Mar	5760.3333
09-Feb	1946.6667	15-Mar	5630.0000
13-Feb	1013.33333	17-Mar	5550.0000
15-Feb	1506.6667	19-Mar	5730.0000
17-Feb	2613.3333	21-Mar	5420.3333
19-Feb	2560.3333	24-Mar	5370.3333
21-Feb	2066.6667	26-Mar	5340.6667
23-Feb	2506.6667	29-Mar	5560.6667
25-Feb	2306.6667	07-Abr	4673.33333
27-Feb	2473.3333	14-Abr	4060.0000
29-Feb	2440.6667	16-Abr	3313.33333
03-Mar	3640.6667	18-Abr	2440.0000

Anexo D: Respirometría "Bloque II" UNAM-Juriquilla



Anexo E: Tabla de datos de productividad de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque I" UNAM-DF

Muestra	Tiempo [h]	X [mg]	X [mgDQO]	PHA /X [mgPHA/mg X]	Acum. [mg]	Acum. [mgDQO]	Vel. especifica de producción (qp)	Productividad [mgPHA/l/h]
1	0	2522.4608	3581.8943	0.0307	0.0307	0.0362	0.0362	-
2	0.25	2141.3641	3040.7370	0.0461	0.0461	0.0542	0.1448	141.0948
3	0.5	2291.6036	3254.0771	0.0386	0.0386	0.0454	0.1085	-68.4816
4	0.75	2657.6147	3773.8128	0.0310	0.0310	0.0365	0.0606	-40.2021
5	1	1995.5788	2833.7219	0.0423	0.0423	0.0498	0.0365	13.6158
6	1.5	2224.2130	3158.3824	0.0341	0.0341	0.0401	0.0332	-28.8727
7	2	1830.6403	2599.5092	0.0379	0.0379	0.0446	0.0201	-21.4930
8	2.5	1984.4071	2817.8581	0.0280	0.0280	0.0330	0.0178	-46.0363
9	3	2525.8245	3586.6708	0.0214	0.0214	0.0253	0.0110	-4.7397
10	4	2546.2501	3615.6752	0.0211	0.0211	0.0249	0.0063	-0.7116
11	5	2407.9506	3419.2898	0.0216	0.0216	0.0255	0.0050	-2.8432
12	6	2387.9321	3390.8636	0.0218	0.0218	0.0257	0.0042	0.0309

Anexo F: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque I" UNAM-DF

No	Tiempo	Peso seco	%Peso seco
1	0	0.065618511	6.561851138
2	0.25	0.083471858	8.347185838
3	0.5	0.074806572	7.480657245
4	0.75	0.069719616	6.971961594
5	1	0.07144248	7.144248038
6	1.5	0.064135708	6.413570769
7	2	0.05869649	5.869649032
8	2.5	0.047046138	4.704613769
9	3	0.045846661	4.584666136
10	4	0.045486502	4.548650238
11	5	0.044047468	4.404746816
12	6	0.044063095	4.406309456

Anexo G: Tabla de datos de productividad de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque II" UNAM-Juriquilla

Muestra	Tiempo [h]	X [mg]	X [mgDQO]	PHA /X [mgPHA/mg X]	Acum. [mg]	Acum. [mgDQO]	Vel. especifica de producción (qp)	Productividad [mgPHA/l/h]
1	0	3261.7667	4631.7087	0.0157	0.0157	0.0185	0.0185	
2	0.25	3164.9747	4494.2640	0.0468	0.0468	0.0551	0.0740	647.3452
3	0.5	3084.6643	4380.2233	0.0740	0.0740	0.0872	0.1101	537.1158
4	0.75	3063.8094	4350.6094	0.0813	0.0813	0.0958	0.1162	139.4772
5	1	3119.0373	4429.0329	0.0622	0.0622	0.0732	0.0958	-369.3638
6	1.5	3184.6643	4522.2233	0.0403	0.0403	0.0474	0.0488	-219.4567
7	2	3233.8094	4592.0094	0.0245	0.0245	0.0288	0.0237	-164.3414
8	2.5	3254.8005	4621.8166	0.0179	0.0179	0.0211	0.0115	-70.1940
9	3	3271.5404	4645.5874	0.0127	0.0127	0.0149	0.0070	-55.9784
10	4	3271.9392	4646.1537	0.0125	0.0125	0.0148	0.0037	-0.6668
11	5	3271.9399	4646.1547	0.0125	0.0125	0.0148	0.0030	-0.0012
12	6	3272.9488	4647.5872	0.0122	0.0122	0.0144	0.0025	-1.6868

Anexo H: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Enriquecimiento Selectivo "Bloque II" UNAM-Juriquilla

No	Tiempo	Peso seco	%Peso seco
1	0	0.030925531	3.092553078
2	0.25	0.089351313	8.93513131
3	0.5	0.137828405	13.7828405
4	0.75	0.150416839	15.04168389
5	1	0.117080112	11.70801121
6	1.5	0.077466232	7.746623198
7	2	0.047801145	4.780114476
8	2.5	0.035130509	3.513050943
9	3	0.025025911	2.502591134
10	4	0.024785181	2.478518062
11	5	0.024784756	2.47847561
12	6	0.024175795	2.417579475

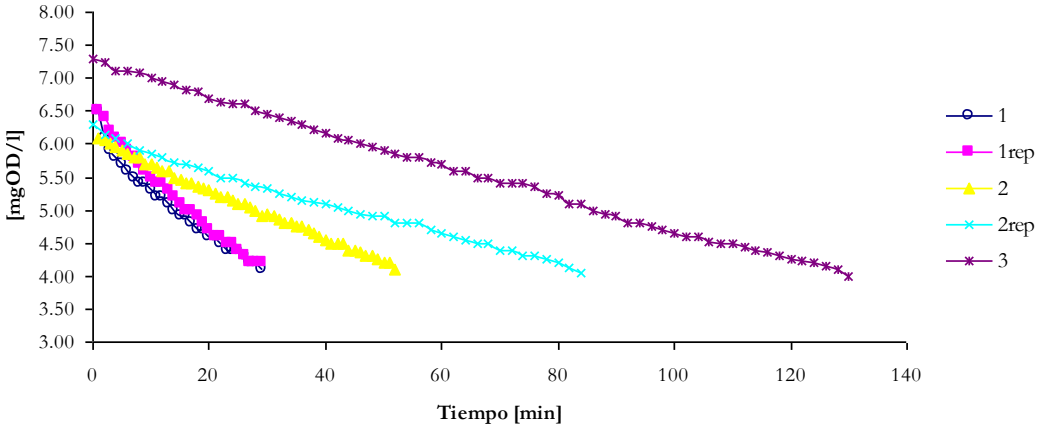
Anexo I: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por Lote "Bloque I" UNAM-DF

No	Tiempo	Peso seco	%Peso seco
1	0	0.03607979	3.607978592
2	0.5	0.11387082	11.38708232
3	1	0.11539075	11.53907461
4	1.5	0.18571454	18.5714544
5	2	0.19526214	19.52621372
6	2.5	0.24569584	24.56958387
7	3	0.2738778	27.38777995
8	4	0.24499873	24.49987332
9	5	0.25369408	25.36940756
10	6	0.27365546	27.36554568

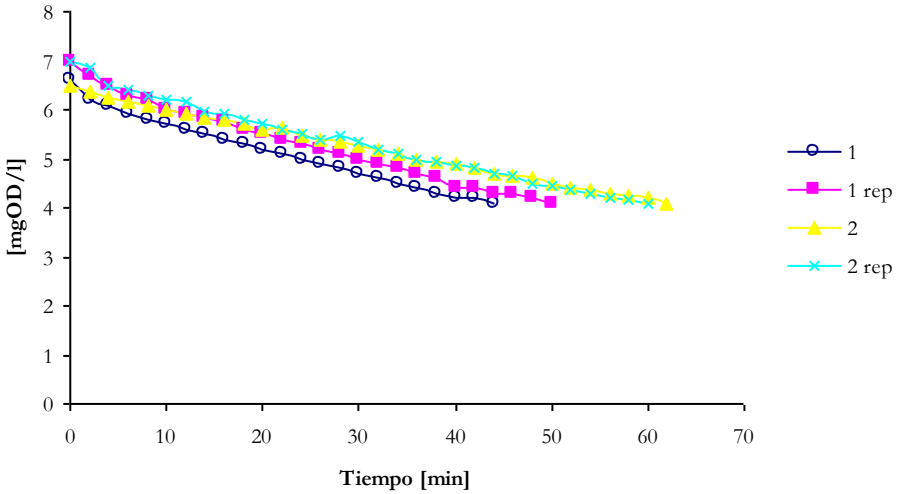
Anexo J: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por pulsos "Bloque I" UNAM-DF

No	Tiempo	Peso seco	%Peso seco
1	0	0.030967829	3.09678288
2	0.5	0.075703624	7.570362444
3	1	0.111670638	11.16706381
4	1.5	0.1319935	13.19934996
5	2	0.222399768	22.23997679
6	2.5	0.258117954	25.81179542
7	3	0.360554258	36.05542576
8	4	0.40257142	40.25714203
9	5	0.382072966	38.20729665
10	6	0.394972726	39.49727259

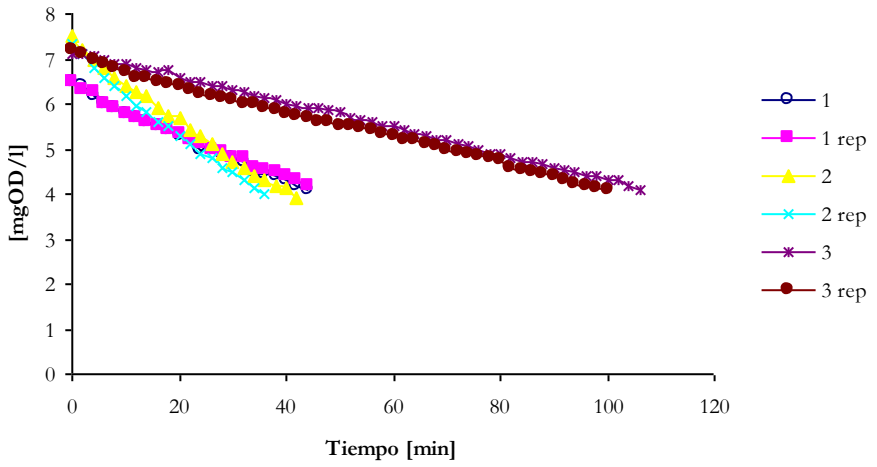
100 gDQO/l



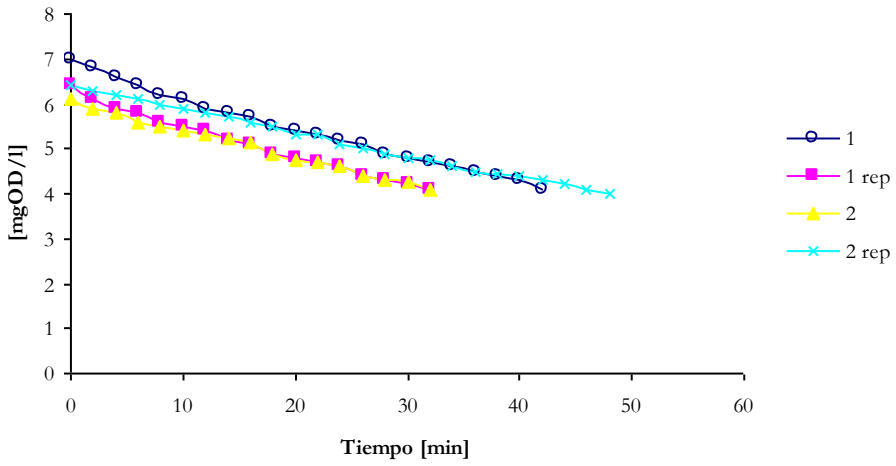
80 gDQO/l



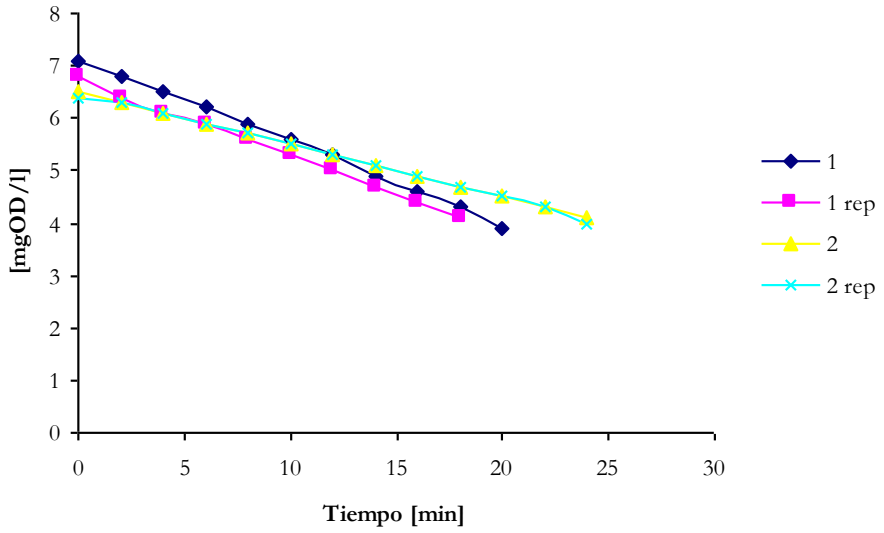
60 gDQO/l



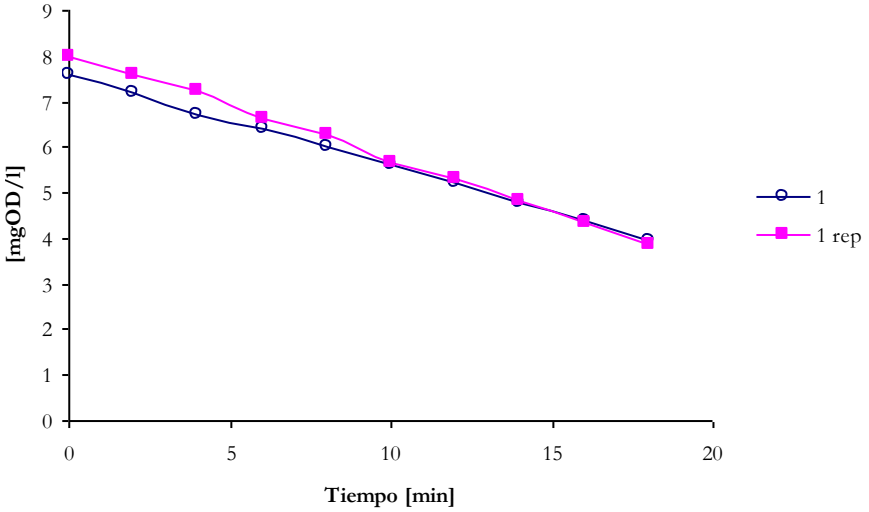
45 gDQO/l



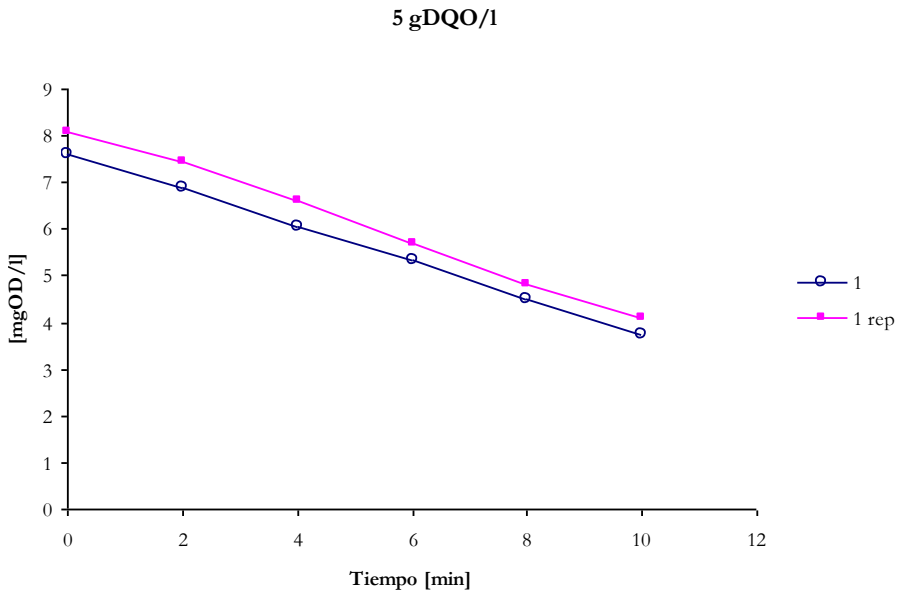
25 gDQO/l



10 gDQO/l



M



Anexo L: Tabla con las pendientes de las respirometrías con diferente concentración "Bloque II" UNAM-Juriquilla

	100 gDQO/1			80 gDQO/1		60 gDQO/1			45 gDQO/1		25 gDQO/1		10 gDQO/1		5 gDQO/1	
Pendiente	0.077	0.0309	0.0247	0.0529	0.0414	0.0514	0.0872	0.0285	0.067	0.0558	0.1525	0.1	0.20	0.2327	0.4121	0.3879
Promedio	0.0278			0.0472		0.0557			0.0614		0.1263		0.2165		0.4	
Desviación	0.0			0.0082		0.0296			0.0079		0.0371		0..0230		0.017	

Anexo M: Tabla de las respirometrías con diferente concentración "Bloque II" UNAM-Juriquilla

Concentración	Pendiente (mgO_2/min)	SSV (mgSSV/l)	Factor	SSV	Q (mgO_2/mgSSV-min)
100'	0.0309	3827	0.053	202.831	0.000152344
100"	0.0247	3800	0.053	201.4	0.000122642
80'	0.0530	3640	0.053	192.92	0.000274466
80"	0.0414	3827	0.053	202.831	0.000204111
60'	0.0515	3640	0.053	192.92	0.000266691
60"	0.0872	3827	0.053	202.831	0.000429915
60"'	0.02855	4600	0.053	243.8	0.000117104
45'	0.0670	3640	0.053	192.92	0.000347294
45"	0.05585	3827	0.053	202.831	0.000275352
25'	0.1525	3640	0.053	192.92	0.000790483
25"	0.1	3827	0.053	202.831	0.000493021
10	0.2165	4600	0.053	243.8	0.000888023
5	0.4	4600	0.053	243.8	0.001640689

Anexo N: Peso Seco Celular de cinética del Reactor de Producción régimen por pulsos "Bloque II" UNAM-Juriquilla

No	Tiempo	Peso seco	%Peso seco
1	0	0.068565774	6.856577424
2	0.5	0.140160922	14.01609218
3	1	0.201483882	20.14838822
4	1.5	0.281115203	28.11152026
5	2	0.342740084	34.27400837
6	2.5	0.396113975	39.61139752
7	3	0.467629072	46.76290723
8	4	0.566919171	56.69191712
9	5	0.608286936	60.82869358
10	6	0.640960217	64.09602171

Anexo Ñ: Análisis de la técnica de cuantificación de PHA

De un estudio de ciclo del reactor de enriquecimiento se tomaron dos muestras para cuantificar PHA y los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Área 1	Benzoato 1	Área 2	Benzoato 2	Área 1/ Benzoato 1	Área 2/ Benzoato2	Desv. Estándar
M1	531104	17820	795260	37393	29.8038	21.2676	6.0360
M2	643771	32894	628080	37711	19.5711	16.6551	2.0619
M3	613252	36793	162412	57660	16.6676	12.8184	2.7218
M4	562755	28133	649816	34421	20.0034	18.8785	0.7954
M5	666109	42995	909257	65746	15.4927	13.8298	1.1758
M6	1193249	77347	791414	39191	15.4272	20.1938	3.3705
M7	431316	35580	486288	38596	12.1224	12.5994	0.3373
M8	638353	46079	737699	56228	13.8534	13.1198	0.5188
M9	566334	36484	990572	70210	15.5228	14.1087	0.9999
M10	925414	51261	328499	17253	18.0530	19.0401	0.6980
						PROMEDIO	1.8715

Los datos obtenidos son el reflejo de varios factores (la pureza del reactivo, el manejo del operador, etc…). Teniéndose como resultado una desviación promedio de 1.875, siendo un valor tolerable y demostrando que la técnica de cuantificación de PHA es admisible en los estudios de ciclo realizados en esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

Alleman, J., Irvine, R., (1980) "Storage-induced denitrification using sequencing batch reactor operation" *Water Research* **14**:1483–1488.

Alistair J., Edwin A. (1990). "Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates". *American Society for Microbiology* .**54**:4: 450 – 472.

American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF) (1992). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* , ed. E.U.A.

ANIPAC (Asociación Nacional de Industrias del Plástico A.C.). "La industria del plástico en Latinoamérica" [en línea]. Boletín informativo.
< http://www.anipac.com.mx/anipac06/mail208.html>.

Arcos M., (2007) "Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un biorreactor discontinuo" Tesis de maestría, Instituto de Ingeniería, UNAM, México.

Beccari, M., Majone, M., Massanisso, P., Ramadori, R, (1998) "A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding" *Water Research* **32**:3403–3414.

Beccari, M., Dionisi, D., Giuliani, A., Majone, M., Ramadori, R. (2002). "Effect of different carbon sources on aerobic storage by activated sludge". *Water Science and Technology* **45**:6:157–168.

Beun J. (2001) "PHB metabolism and N-removal in sequencing batch granular sludge reactors" PhD thesis. Delft, The Netherlands: Delft Technical University.

Beun, J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2002). "Polyhydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures". *Water Research* **36**:1167–1180.

Braunegg, G., Sonnleitner B., Lafferty, R. (1979). "A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in bacterial biomass". *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. **6**: 29-37.

Buitrón,G. (2007) "Apuntes de nuevas tecnologías para el tratamiento biológico de efluentes industriales". Posgrado de Ingeniería UNAM.

Carta, F., Beun, J., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2001) "Simultaneous storage and degradation of PHB and glycogen in activated sludge cultures" *Water Research* **35**:2693–2701.

Chen, G., Wua, Q. (2005). "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials". *Biomaterials.* **26**:6565–6578.

Chinwetkitvanich, S., Randall, C., Panswad, T. (2004). "Effects of phosphorus limitation and temperature on PHA production in activated sludge". *Water Science and Technology.* **50**:135–143.

Choi, J., Lee, S. (1997). "Process analysis and economic evaluation for poly(3 - hydroxybutyrate) production by fermentation ". *Bioprocess and Biosystems Engineering.* **17**: 335-342.

Choi, J., Lee, S. (1999). "Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation". *Applied Microbiology and Biotechnology.* **51**: 13-21.

Choi, J., Lee S. Y. (2000). "Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation". *Applied Microbiology and Biotechnology.* **53**: 646-649.

Chua, A., Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent". *Water Research* **37**:3602–3611.

Comeau, Y., Hall, K., 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.

Dai, Y., Yuan, Z., Jack, K., Keller, J. (2007). "Production of targeted poly(3 - hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source". *Journal of Biotechnology.* **129**:489–497.

Dawes, A., Senior, J. (1973). "The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms", *Advanced Microbial Physiology* **10**:135–266.

Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., Beccari, M. (2004). "Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding", *Biotechnology and bioengineering* **85**:569-579.

Dircks, K., Pind, P., Mosbæk, H.., Henze, M. (1999) "Yield determination by respirometry - The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge" *Water Science and Technology* **25**:1: 69-74

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., Soga, K. (1988) "Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids", *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**: 330–334

Doi, Y., Segawa, A., Kawaguchi, Y., Kunioka, M. (1990). "Cyclic nature of poly(3 - hydroxyalkanoate) metabolism in Alcaligenes eutrophus", *FEMS Microbiology Letters* **67**: 165–170.

Doi, Y., Kawaguchi, Y., Koyama, N., Nakamura, S., Hiramitsu, M., Kimura, H. (1992). "Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in Alcaligenes eutrophus ". *FEMS Microbiology Reviews* **103**:103-108.

Eckenfelder, W. (1980). *Principies of water quality management.* CBI Publishing Company, Inc. Boston, Massachusetts.

Filipe, M., Daigger, G., Grady, C., (2001). "A metabolic model for acetate uptake under anaerobic condition by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH" *Biotechnology and Bioengineering*, **76**: 17–31 933–942

Galindez, J., Ruiz, N., (1994). *Bioingeniería. Fundamentos biocinéticos para el diseño de procesos fermentativos*. Ediciones Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN.

Gómez, J. , Rodrigues, M., Alli, R.,Torres, B., Bueno, C., Oliveira, M., da Silva, L. (1996). "Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid". *Applied Microbiology and Biotechnology* **45** :785-791.

Gurieff, N., Lant, P. (2007) "Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production". *Bioresource Technology* **98**: 3393–3403 .

Gurieff, N. (2008) "Production of biodegradable polyhydroxyalkanoate polymer using advanced biological wastewater treatment process technology". PhD Thesis. Advanced Wastewater Management Centre, University of Queensland, St. Lucia, Brisbane, Australia.

Irvine, R., (1992) "Technology assessment of sequencing batch reactors". Prepared for U.S. EPA. U.S. EPA Contract No. 68-03-3055.

Jenkins, D., Richard, M., Daigger, G. (1993). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Lewis publishers.

Jianyu, Y., (2001). "A dynamic study and modeling of the formation of Polyhydroxyalkanoates combined with treatment of high strength wastewater". *Environmental Science and Technology.* **35**:3584-3588

Jones, W., Schroeder, E., Wilderer, P. (1990a) "Denitrification in a batch wastewater treatment system using sequestered organic substances" *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* **62**:259–267.

Jones, W, Wilderer, P., Schroeder, E. (1990b) "Operation of a three-stage SBR system for nitrogen removal from wastewater" *Research Journal of the Water Pollution Control Federation* **62**:268–274.

Katoh, T., Yuguchi, D., Yoshii, H., Shi, H., Shimizu, K (1999) "Dynamics and modeling on fermentative production of poly(β-hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of Lactobacillus delbrueckii and Alcaligenes eutrophus", *Journal Biotechnology* **67**: 113–134.

K2007 (2007), "Para 2010 trescientos millones de toneladas de plastico", *Plástico* **278**: 44-49.

Khanna, S., Srivastava, A. (2005). "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates". *Process Biochemistry*; **40**:607–619.

Kim, B., Lee, S., Lee, S., Chang, H., Chang, Y., Woo, S. (1994). "Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control". *Biotechnology and Bioengineering* **43**: 892-898.

Krishna, C., Van Loosdrecht, M. (1999) "Effect of temperature on storage polymers and settle ability of activated sludge" *Water Research* **33**: 2374–2382

Kumar, S., Mudliara, S., Reddy, K, Chakrabarti, T. (2004). "Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant". *Bioresource Technology* **95**:327–330.

Lee, K., Gilmore, D. (2005b). "Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design". *Process Biochemistry* **40**: 229–246.

Lee, S., Chang, H. (1993). "High cell density cultivation of Escherichia coli W using sucrose as a carbon source". *Biotechnology Letters* **15**: 971-974.

Lee, S., Chang, H. (1994). "Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant Escherichia coli in flask and fed-batch cultures". *Journal of Environmental Polymer Degradation* **2**: 169-176.

Lee, S. (1996). "Bacterial Polyhydroxyalkanoates". *Biotechnology and Bioengineering* **49**:1-14.

Lee, S., Choi, J., Wong, H. (1999). "Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review". *International Journal of Biological Macromolecules* **25**: 31-6.

Lefebvre, G., Rocher, M., Braunegg, G., (1997), "Effects of low dissolved-oxygen concentrations on poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Alcaligenes eutrophus" *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 827–833

Lemos, C., Viana, C., Sagüeiro, E., Reis, M. (1998). "Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates by a phosphate accumulating mixed culture". *Enzyme Microbiology Technology*, **22**: 662–671

Lemos, P., Serafim, L., Reis, M. (2004). "Polyhydroxyalkanoates production by activated sludge in a SBR using acetate and propionate as carbon sources". *Water Science and Technology* **50**:189-194.

Lemos, P., Serafim, L., Reis, M. (2006). "Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding". *Journal of Biotechnology* **122**:226–238.

Macrae, M., Wilkinson, F. (1958) "The influence of culture conditions on poly-β-hydroxybutyrate synthesis by Bacillus megaterium", *Royal Physical Society of Edinburgh* **27**: 73–78.

Majone, M., Dircks, K., Beun, J. (1999). "Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art". *Water Science and Technology* **39**:61-73.

Martins, J., Van Loosdrecht, M., (2003) "Effect of dissolved oxygen concentration on sludge settleability", *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**:586–593

Meesters, K (1998) "Production of Poly(3 hydroxyalkanoates) from Waste Streams" Report of Technical University of Delft, Delft

Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering, treatment and reuse*, McGraw-Hill, International Edition.

Misra, S., Valappil, S., Roy, I., Boccaccini, A. (2007). "Fabrication and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) composite containing bioglass", *Biomacromolecules* **7**:2249-2258.

Mulchandani, A.,(1989) Substrate inhibition kinetics for growth and production of PHB by Alcaligenes eutrophus. *Applied Microbiology and Biotechnology*;**30**:11–7.

Oehmen, A., Keller-Lehman, B., Zeng, R., Yuan, Z. (2004). "Optimization of poly-β-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems", *Journal of chromatography* **1070**: 131-136.

Oliveira, F., Dias, M., Castilho, L., Freire, D. (2007). "Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by Cupriavidus necator in solid-state fermentation", *Bioresource Technology* **98**:633–638.

Ostle, A., Holt, J. (1982). "Nile blue A as a fluorescent stain for poly-3 hydroxybutyrate". *Applied and Environmental Microbiology* **44**:238-241.

Patnaik, P., (2005). "Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures" *Critical Reviews in Biotechnology*.**25**: 153-171.

Pirt, S. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publications. Oxford-London.

Punrattanasin, W. (2001). "The utilization of activated sludge polyhydroxyalkanoates for the production of biodegradable plastics". PhD Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, E.U.A..

Reddy, C., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V. (2003). "Polyhydroxyalkanoates: an overview". *Bioresource Technology* **87**: 137–146.

Reis, M., Serafim, L., Lemos, P., Ramos, A., Aguiar, F., Van Loosdrecht M. (2003). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures". *Bioprocess and Biosystems Engineering* **25**:377–385.

Roselia, M., (2007) "Plásticos biodegradables" *¿Como ves?*, **3**:22-25.

Rhu, D., Lee, W., Kim, J., Choi, E. (2003). "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste". *Water Science and Technology* **48**:221–228.

Ryu, H., Hahn, S., Chang, 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.

Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M. (2004). "Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance". *Biotechnology Advances* **22**: 261-279.

Sánchez, R., Schripsema, J., da Silva, L., Taciro, M., Pradella, J., Gómez, J. (2003). "Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by Pseudomonas putida IPT 046 from renewable sources". *European Polymer Journal* **39**:385–1394.

Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. (1992) "Up take of organic substrate and accumulation of poly- hydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in biological excess phosphorus removal process" *Water Science and Technology* **26**:933–942

Satoh, H., Iwamoto, Y., Mino, T., Matsuo, T. (1998). "Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic". *Water Science and Technology* **38**:103-109.

Satoh, H., Mino, T. (2001) "Production of PHAs from activated sludge" *Biopolymer*s, **3**:337-352.

Satoh, H., Dybalb, J., Murakamia, R., Nodac, I., Ozakia, Y. (2005). "Infrared and Raman spectroscopy and quantum chemistry calculation studies of C–H/O hydrogen bondings and thermal behavior of biodegradable polyhydroxyalkanoates". *Journal of Molecular Structure* **744–747**:35–46.

Serafim, L., Lemos, P., Oliveira, R., Reis, M. (2004). "Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions". *Biotechnology and Bioengineering* **87**:145-160.

Serafim, L., Lemos, P., Rossetti, S., Levantesi, C., Tandoi, V., Reis, M. (2006a). "Microbial community analysis with a high pha storage capacity". *Water Science and Technology* **54**:183-188.

Serafim, L. (2006b). "Biodegradable polymers produced by mixed cultures from renewable sources*". European Conference on Biorefinery Research*. Helsinki, October 19th , 2006.

Shahrokh, S., (2004), "Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of Ralstonia eutropha", *Process Biochemistry* **39**; 963–969.

Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T. (2000). "Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process". *Water Science and Technology* **42**: 351-356.

Third, K.,Newlan, M., Cord-ruwisch, R. (2003) "The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures". *Biotechnology and Bioengineering*, **82**:2: 238-250

Van Loosdrecht, M., Pot, M., Heijnen, J. (1997) "Importance of bacterial storage polymers in bioprocess" *Water Science and Technology* **35**: 41–47

Westerberg, K., (2007) "Using the dissolved oxygen signal for automatic control in Fed-Batch production of PHA by a mixed culture", Reporte interno, Lund University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering.

Yamane, T., Fukunage, M., Lee, Y. (1996). "Increased PHB productivity by high- cell-density fed-batch culture of Alcaligenes latus, a growth-associated PHB producer". *Biotechnology and Bioengineering* **50**:197-202.

Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., Dennis, D. (1994). "Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant Escherichia coli and Klebsiella strains". *Applied and Environmental Microbiology* **60**:1198-1205.