



Universidad Nacional Autónoma de México



**INSTITUTO
DE INGENIERÍA
UNAM**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

“DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y PRODUCCIÓN
DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE
UN BIORREACTOR DISCONTINUO”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA

AMBIENTAL - AGUA

P R E S E N T A:

MÓNICA VANESSA ARCOS HERNÁNDEZ

TUTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO VARGAS CASILLAS

2007

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Mónica Meraz Rodríguez

Secretario: Dr. Alejandro Vargas Casillas

Vocal: Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

1er. Suplente: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

2do. Suplente: Dr. Simón González Martínez

Lugar o lugares donde se realizó la Tesis:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PROCESOS AVANZADOS DE
TRATAMIENTO DE AGUAS, UNIDAD ACADÉMICA DEL INSTITUTO DE
INGENIERÍA, UNAM, MÉXICO

ADVANCED WATER MANAGEMENT CENTRE, UNIVERSITY OF
QUEENSLAND, CAMPUS ST. LUCIA, QUEENSLAND, AUSTRALIA

TUTOR DE TESIS:

Dr. Alejandro Vargas Casillas



FIRMA

Agradecimientos

Mil Gracias a mi tutor, Alejandro, por su asesoría, consejos, paciencia, confianza y amistad. Por su apoyo constante en todos los aspectos.

Agradezco a CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría y el apoyo financiero número J-46097-Y, sin el cual el proyecto no podría haberse realizado.

Agradezco al Dr. Paul Lant de la Universidad de Queensland por su asesoría, calidez y apoyo durante mi estancia de investigación en el AWMC.

Agradezco a Nicholas Gurieff por su apoyo y asesoría en la Universidad de Queensland y por su paciencia, amistad, calidez, ayuda y consejos.

Agradezco a mi consejo tutorial durante la realización de la maestría: Dra. Mónica Meraz Ramírez, Dr. Simón González Martínez y Dr. Carlos Peña Malacara. Así como al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, miembro del comité ampliado.

Un agradecimiento especial al Dr. Simón González Martínez por su clase, filosofía y motivación.

Agradezco a la Dra. Beatrice Keller por su apoyo con el cromatógrafo, por las clases de alemán y su amistad.

Agradezco a la DGEP de la UNAM por el apoyo para realizar la estancia de investigación en la UQ, Australia.

Gracias al Dr. Alejandro Rodríguez Valdés y al Dr. José Luis Fernández Zayas por sus valiosos consejos y apoyo recibido desde que inicie el servicio social y hasta la culminación de mi maestría, por permitirme conocer el mundo de la investigación.

Agradezco a Ulises García Cruz de la UAM-Iztapalapa por su apoyo durante el proyecto, consejos y asesoría.

Agradezco al Dr. Steven Coombs y el Dr. Gordon Xu, Australian Institute for Bioengineering & Nanotechnology (AIBN), de la Universidad de Queensland por su asistencia y apoyo con el análisis de FTIR.

Otros Agradecimientos y dedicatorias

A mi hermano Pepe ("Luis") ☺ C.T.M.

A mis pa's José Luis y Magdalena por su apoyo, amor, amistad y sus becas ☺.

A mis hermanas Paola y Jenn-Jenn. A mi sobrina Samara. A mis Tolitos y Chifi. A todos mis tíos. A Serapio (Camilo).

A mis amigos Dianita, Bertha, Daff, Ro, Sören, Kadiya, Jaime P., Willverth, Gastón, Fabricio, Rodrigo A., Santiago, Paty y Oliva.

A mis compañeras de trabajo Nancy y Nadima.

To my new friends Kiera, Tina (Xuemin), Janani, Nick, Tamara, Connor, Dan, Karla, Tanja, Daryl, Li-Zhi, Leah, Ximena, Crystal (Yan), Stefano, Christiana, Diego, Albert, Ampon, Ursula, Yang Mu, Paritam, Jason, Romain, Lishan and Mucki.

To Andrew Sykes for his kindness and special friendship.

A mis amigos de la Torre: Samuel, Víctor, Daniel, Ángel, David y Marco.

A mis amigos de siempre Alex, Kev-Kev, Pau, Rejas, Jacobo, Amed, Dan, Yes, Ana Laura, Anita, Blue, Erre, Andros y Steph.

A mi clon Vale....

A mis A.I. Darren, Carlito y Jean Paul.

A Antonio.

To Rowan Ashley Brannan☺, for the crowded tour.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	1
<i>SUMMARY</i>	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1. PROBLEMÁTICA	3
1.2. JUSTIFICACIÓN	4
1.3. HIPÓTESIS	4
1.4. OBJETIVOS	5
2 ANTECEDENTES	5
2.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES MECÁNICAS	5
2.2 BIODEGRADABILIDAD DE LOS PHA	8
2.3 APLICACIONES Y VENTAJAS	10
2.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE PHA	11
2.5 MECANISMOS METABÓLICOS DE PRODUCCIÓN DE PHA	13
2.6 LIMITACIONES, COSTOS Y PRODUCCIÓN COMERCIAL DE PHA	15
2.7 PRODUCCIÓN DE PHA CON CULTIVOS PUROS BACTERIANOS	16
2.8 USO DE CULTIVOS MIXTOS	20
2.8.1 GENERALIDADES	20
2.8.2 VENTAJAS DE CULTIVOS MIXTOS	24
2.8.3 PRODUCCIÓN DE PHA CON PAOs/GAOs	24
2.8.4 PRODUCCIÓN DE PHA CON LODOS ACTIVADOS	26
2.8.5 ESTUDIOS CON AGUA RESIDUAL REAL	28
2.9 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PHA	31
2.9.1 AISLAMIENTO DEL POLÍMERO	31
2.9.2 DETECCIÓN CUALITATIVA	31
2.9.3 ANÁLISIS DE PROPIEDADES	32
2.9.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN	32
2.10 RELEVANCIA DEL CONTROL DE PROCESOS BIOLÓGICOS	33
2.11 SEGUIMIENTO DE PROCESOS EN LÍNEA	34
2.12 PAT (PROCESS ANALYTICAL TECHNOLOGY)	35
2.13 FTIR Y MEDICIÓN DE PHA EN LÍNEA	37
3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
3.1 INTRODUCCIÓN	40
3.2 FASE I	41
3.3 FASE II	44
3.4 FASE III	49

3.5	FASE IV	49
4	MÉTODOS ANALÍTICOS	51
4.1	TÉCNICAS ANALÍTICAS ESTÁNDAR	51
4.2	TINCIONES	52
4.3	CROMATOGRAFÍA DE GASES	53
4.4	ESTUDIOS DE CICLO Y PRUEBAS DE ACUMULACIÓN POR LOTES	55
4.5	CÁLCULOS	57
4.6	ESPECTROSCOPÍA CON INFRARROJO Y LA TRANSFORMADA DE FOURIER	60
4.7	CUANTIFICACIÓN RÁPIDA DE PHA CON FTIR	72
4.7.1	PREPARACIÓN DE MUESTRA	72
4.7.2	ADQUISICIÓN DE LOS ESPECTROS FTIR	72
4.7.3	APLICACIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS)	73
4.7.4	SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA CALIBRACIÓN	74
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
5.1	FASE I	75
5.2	FASE II	78
5.2.1	DESEMPEÑO DEL SISTEMA RW	78
5.2.2	EFFECTOS DEL CAMBIO DE COMPOSICIÓN EN EL SUSTRATO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE PHA	86
5.2.3	COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DEL POLÍMERO OBTENIDO	92
5.2.4	PRUEBAS DE ACUMULACIÓN POR LOTE	92
5.2.5	COMPARACIÓN CON CULTIVOS PUROS	97
5.3	FASE III	98
5.3.1	CUANTIFICACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS CON ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA (FTIR) Y PLS	98
5.3.2	BANDAS DE PHA	99
5.3.3	ASIGNACIÓN DE BANDAS	101
5.3.4	CRISTALIZACIÓN DE COPOLÍMERO	105
5.3.5	PRETRATAMIENTO DE DATOS	109
5.3.6	CÁLCULO DEL ERROR DEL ANÁLISIS CON CG	111
5.3.7	CALIBRACIÓN DEL MODELO	115
5.3.8	PREDICCIÓN DEL CONTENIDO DE PHA	117
5.4	FASE IV	122
5.4.1	MODIFICACIONES AL REACTOR DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO	122
5.4.2	TINCIONES	122
5.4.3	CROMATOGRAFÍA DE GASES	123
5.4.4	FTIR Y CUANTIFICACIÓN DE PHA	125
5.4.5	CONTROL DEL REACTOR	125
5.4.6	MUESTREO DE PHA	126
6	CONCLUSIONES	129

Índice de Figuras

Figura 2-1 Estructura Química de PHAs	6
Figura 2-2 Degradación de P(3HB) y P(3HB-co-3HV) en mangle tropical (Sridewi et al, 2006).	9
Figura 2-3 Ruta metabólica de Síntesis y degradación de P(3HB). PhaA, β -ketotiolasa; PhaB, Reductasa Acetoacetyl-CoA dependiente de NADPH ; PhAC, PHA sintasa; PhaZ, PHA depolimerasa; 1 dimero hidrolasa; 2, (R)-3-hidroxi butirato dehidrogenasa; 3, Acetoacetyl-CoA sintetasa; 4, Acetoacetyl-CoA dependiente de NADPH reductasa (Sudesh et al, 2000)	11
Figura 2-4 Alimentación Dinámica Aerobia (Serafim, 2006b)	21
Figura 2-5 Rutas de producción de PHA en condiciones de abundancia/ayuno	22
Figura 2-6 Esquema experimental de Dionisi et al (2004)	26
Figura 2-7 Gráfica de predicciones de concentración de PHB vs. el contenido determinado con CG (Lee et al, 1999).	38
Figura 2-8 Sistema experimental de seguimiento en semi-línea de acumulación de PHB en E. Coli. (Jarute et al , 2004).	39
Figura 3-1 Diseño experimental propuesto (UNAM)	42
Figura 3-2 Esquema del SBR productor de PHA con lodos activados	47
Figura 3-3 Esquema de la producción de PHA en un sistema de lodos activados anaerobio-aerobio	48
Figura 4-1 Transformada de Fourier aplicada en espectrofotometría	62
Figura 4-2 Ejemplo de un espectro en transmitancia de el compuesto CCl_4 y su interpretación en la teoría de espectrofotometría vibratoria (Reusch, 1999).	63
Figura 4-3 Enlaces moleculares vistos como un sistema de oscilador armónico simple	64
Figura 4-4 Modos normales de vibración de la molécula de CO_2 (Nakamoto, 1986).	64
Figura 4-5 Regiones del espectro de infrarrojo (Reusch, 1999).	66
Figura 4-6 Corrección de línea de base (Nakamoto, 1986).	70
Figura 4-7 Compensación atmosférica (Nakamoto, 1986)	71
Figura 5-1 SST-SSV 21 ciclos después de inoculación; lavado de reactor	75
Figura 5-2 Intervalos de acumulación y degradación de PHA	78
Figura 5-3 Estudio de Ciclo en SBR	79
Figura 5-4 (A) Perfil de AGVs [$mgDQO L^{-1}$]; (B) Perfil de PHB y PHV [$mgDQO L^{-1}$]; (C) Perfil de OD [$mg L^{-1}$]	80
Figura 5-5 Tasas máximas de acumulación y degradación	83
Figura 5-6 Ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo al adicionar mezcla sintética de AGVs para enriquecer el agua residual baja en AGVs.	88
Figura 5-7 Uso de la señal de OD [$mg L^{-1}$] para determinar la adición de pulsos de alimentación. Término de la reacción al no obtener baja del valor de OD al agregar pulso.	94
Figura 5-8 Prueba batch para biomasa del reactor de enriquecimiento selectivo, estrategia de alimentación por pulsos con control de OD, punto de referencia 4.2 [$mg L^{-1}$].	95
Figura 5-9 Prueba batch con agua residual real. OD [$mg L^{-1}$], pH en eje principal; AGVtdqo [$mgDQO L^{-1}$], PHAdqo [$mgDQO L^{-1}$] en eje auxiliar.	96
Figura 5-10 Comparación de acumulación de PHA en reactor de enriquecimiento selectivo y reactor batch.	97
Figura 5-11 Espectro típico para cultivos mixtos con PHA (espectro A) y sin PHA (espectro B). Los picos de PHA se ven en A y faltan en B en las $w_n = 1735cm^{-1}$ y $1280cm^{-1}$. Bandas amida I y II en $\sim 1637cm^{-1}$ y $\sim 1536cm^{-1}$ utilizadas para normalizar el espectro. A.U.- Unidades Arbitrarias.	100

Figura 5-12 Espectros de estándares de PHB puro y copolímeros de PHB:PHV. Obsérvese los picos distintivos para todos. Los estándares en 1735cm^{-1} y alrededor de 1240cm^{-1} . Espectros sin pretratamiento (A). Espectro de PHB puro con pretratamiento (B)	101
Figura 5-13 Estructura molecular del copolímero PHB:PHV	102
Figura 5-14 Espectro característico de muestra de biomasa conteniendo PHB:PHV, espectro después de pretratamiento. A.U. Unidades Arbitrarias	103
Figura 5-15 Variación de la banda en $1720-1740\text{cm}^{-1}$. C=O (Xu et al, 2002).	106
Figura 5-16 6 Réplicas del espectro de una muestra tomada de una prueba batch en $t=4\text{ h}$. La varianza entre espectros es mínima a través del rango de longitudes de onda de interés. El promedio de estos espectros replicados fue utilizado en el modelo PLS. A.U. Unidades Arbitrarias	109
Figura 5-17 Datos sin pretratamiento A; datos con pretratamiento B	110
Figura 5-18 Espectros pretratados para varias muestras de pruebas de acumulación batch; A=2%, B=24% y C=58%. A.U. unidades arbitrarias.	111
Figura 5-19 Determinación del número de componentes para usarse en el modelo PLS. (A) El SEP (expresado como %PHA) para cada r probado, con un mínimo en $r=13$. (B) El AIC para cada r . (C) El coeficiente de regresión graficado contra r , $R^2=0.96$. (D) Una gráfica de validación cruzada.	116
Figura 5-20 Modelo de predicción optimizado para contenido de PHA en biomasa de cultivos mixtos. La gráfica es para $r=13$ y esto resulta con un SEP=2.66% y una $R^2 = 0.96$.	117
Figura 5-21 Prueba para el modelo con 4 predicciones de espectros dejados fuera al modelar: * valores predichos para los espectros dejados fuera, · predicciones para los espectros incluidos. Y- PHA medido; Ye-PHA predicho.	119
Figura 5-22 Pruebas para el modelo con 13 nuevos espectros. * Valores predichos para los datos nuevos. · Predicciones para los espectros incluidos. Y- PHA medido; Ye-PHA predicho.	120
Figura 5-23 Pantallas de software de control	126
Figura 5-24 Ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo	127
Figura 5-25 Acercamiento a curva observada durante el control de la aireación en el SBR	128

Índice de Tablas

Tabla 2-1 Propiedades físicas y térmicas para algunos polímeros comunes y P(3HB) (Sudesh et al, 2000)	7
Tabla 2-2 Propiedades mecánicas y térmicas de copolímeros P(3HB-co-3HV) (Doi, 1990)	8
Tabla 2-3 Costos de producción para distintos materiales poliméricos (Serafim, 2006b)	16
Tabla 2-4 Varios tipos de bacterias y sus acumulaciones de PHA	19
Tabla 2-5 Resumen de producción de PHA con cultivos mixtos	30
Tabla 4-1 Intervalos de muestreo	56
Tabla 4-2 Asignación de bandas de grupos comunes (Rusch, 1999; Kansiz et al, 2004; Jarute et al, 2004)	67
Tabla 5-1 Tasas máximas calculadas para el ciclo de la figura 5-3	82
Tabla 5-2 Comportamiento de SSV en el SBR	84
Tabla 5-3 Tasas máximas promedio por ciclo	85
Tabla 5-4 Composición del polímero obtenido	92
Tabla 5-5 Asignación de bandas de espectros (Kansiz et al, 200; Jarute et al, 2004; Xu et al, 2002; Kansiz et al, 2007)	104
Tabla 5-6 Análisis de cambios de longitudes de onda de bandas encontradas	106
Tabla 5-7 Composición de copolímero obtenido por cada muestra	107
Tabla 5-8 Estudio de error involucrado en la cromatografía de gases	112

Tabla 5-9 Análisis de error de determinación de SST y SSV para muestras de determinación de error de CG	113
Tabla 5-10 Cálculo del error involucrado en la cromatografía de gases	113
Tabla 5-11 Resultados de prueba de Bartlett para probar varianzas	114
Tabla 5-12 Resultados comparando el valor real y el valor predicho con el modelo para el contenido de PHA en muestras seleccionadas que se dejaron fuera del modelo.	118
Tabla 5-13 Contenidos de PHA predichos para muestras no usadas en la calibración del modelo.	120

Índice de Fotografías

Fotografía 5-1 Vista de gránulos de PHB en contraste de fase para muestra de reactor de enriquecimiento selectivo después de estabilización (contraste de fase)	76
Fotografía 5-2 Vista de gránulos de PHB en microscopio de fluorescencia 460 nm para muestra de reactor de enriquecimiento selectivo después de estabilización	76
Fotografía 5-3 Presencia de gránulos de PHB después de una semana de reinoculación parcial	76
Fotografía 5-4 Presencia de gránulos de PHB después de tercera semana de reinoculaciones parciales	76
Fotografía 5-5 Tinciones con negro de Súdán B y safranina. PHA en negro, pared celular en magenta. Abundancia de organismos filamentosos que almacenan PHA en toda su estructura	87
Fotografía 5-6 Muestra de biomasa después de adición de mezcla de AGVs sintética para intentar revertir condiciones. Se observó una mejoría en el reactor.	90
Fotografía 5-7 Persistencia de organismos filamentosos en el reactor aún después de aparente recuperación con la adición de mezcla de AGVs sintética. Reinoculación.	90
Fotografía 5-8 Muestra después de 2 días de reinoculación. Aparición de PHA, lo que indica un enriquecimiento selectivo rápido en los lodos activados	90
Fotografía 5-9 Muestra después de 1 semana de reinoculación del reactor. Aumento de proporción de bacterias con PHA sobre toda la comunidad.	90
Fotografía 5-10 Tinción con negro de Sudán, a 1 semanas de arranque de reactor con nuevas condiciones	123
Fotografía 5-11 Tinción con negro de Sudán, a 2 semanas de arranque de reactor con nuevas condiciones	123
Fotografía 5-12 Tinción con negro de Sudán, a 3 semana de arranque de reactor con nuevas condiciones	123
Fotografía 5-13 Cúmulo de gránulos de PHA; se observan formas de cocos y bacilos acumulando, pocos filamentos presentes	123

Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxicanoatos mediante un biorreactor discontinuo

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) son termoplásticos sintetizados por bacterias; son reservas de carbono y de energía de los microorganismos. Los microorganismos que los acumulan pertenecen a dos grupos: aquellos que los acumulan por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso, y aquellos que los acumulan durante su crecimiento. Los PHA son considerados como un posible reemplazo de los poliésteres de origen petroquímico debido a que presentan características similares a éstos. Hasta ahora la limitación para producir este tipo de plásticos en gran escala es su alto precio, el cual depende del costo del sustrato, el rendimiento de producción de PHA y el proceso utilizado para su extracción y cuantificación. Sin embargo, el lodo activado de procesos de tratamiento de aguas contiene bacterias que en condiciones adecuadas han demostrado ser capaces de producir PHA. En este trabajo de investigación se estudió esta capacidad, para posteriormente buscar los valores óptimos de los parámetros de control que maximicen la producción de PHA, haciendo uso de bacterias de lodos activados de una planta de tratamiento de agua (sustrato de bajo costo). Así mismo, se analizaron diferentes técnicas de cuantificación de PHA para encontrar una alternativa al método tradicional que requiere de mucho tiempo y genera residuos peligrosos, incrementando el tiempo total del proceso y no permitiendo llevar un control en línea del mecanismo de acumulación-degradación de PHA, lo cual dificulta el proceso de optimización de parámetros de control y repercute indirectamente sobre el costo. Una máxima acumulación de PHA del 73% de peso seco celular fue observada en cultivos mixtos utilizando agua residual real como fuente de carbono. Se obtuvo un error estándar de predicción del 2.6% para el método alternativo propuesto de cuantificación con infrarrojo de PHA, lo cual es comparable con el obtenido con el método tradicional. Las ventajas del método propuesto son, por una parte, reducir el tiempo de obtención de resultados de 8-24 horas a 30-40 minutos generando información casi inmediata respecto del proceso, lo que permite una toma de decisiones rápida encaminada a la optimización de parámetros; y por otra parte se evita la generación de residuos peligrosos (solventes).

Summary

The polyhydroxyalkanoates are thermoplastics synthesised by bacteria; they are carbon and energy storage compounds for the microorganisms.

The microorganisms able to accumulate them belong to two groups: those which carry out the accumulation due to a limitation of an essential nutrient during the presence of a carbon source excess; and those which accumulate the compound during their growth. PHA are considered as an alternative material to the petroleum originated polyesters, due to their similar physical characteristics.

Until now, the limitation for the massive production of these plastics is their high production costs, which depends on the substrate cost, the production yield of the PHA and the process used for their extraction and quantification. However, the activated sludge from wastewater treatment plants is composed by bacteria, which, under certain controlled conditions, have shown to be able to produce the PHA.

In this research project, this capacity was studied in order to search for optimal values for the control parameter, such that maximization of the PHA produced using activated sludge from a conventional wastewater treatment plant (cheap substrate can be achieved). Besides, different analytical techniques for PHA quantification are analysed to find an alternative to the traditional quantification procedure, which requires long times and generates hazardous wastes as well, increasing the process total time and not allowing on-line process monitoring of the mechanisms of PHA accumulation-degradation, which in turn increases the difficulty to optimize the control parameters thus creating indirect effects over the process cost.

A maximum PHA accumulation of 73% of dry cell weight was observed in mixed cultures using real wastewater as carbon. A standard prediction error of 2.6%, for the alternative method for quantification of PHA, was achieved; which makes it comparable with the traditional method. The advantages of the proposed method are, in one hand, the reduction of the time needed to obtain results from 8-24 hours to 30-40 minutes, thus, generating almost immediate information about process, which allows to take rapid decisions in order to optimize parameters; and, in the other hand, the generation of hazardous wastes (solvents) is avoided.

I Introducción

I.1. Problemática

Actualmente el campo de estudio de las disciplinas ambientales ha tomado fuerza debido a los efectos sobre el planeta del cambio climático global generado por contaminación producida por el hombre. Es esto lo que ha originado la necesidad de buscar nuevos métodos y materiales encaminados a disminuir o aliviar el problema de la generación de desechos sólidos que son una fuente grande de contaminación; ya que, a pesar de que muchos de ellos son biodegradables, una gran cantidad de ellos se considera como no biodegradable debido al largo tiempo que toma su degradación en el medio. Tal es el caso de los plásticos de origen petroquímico. Como consecuencia, ha surgido un creciente interés por la producción de materiales biodegradables cuya materia prima sea renovable.

En México en el año 2004 se generaron 2.11×10^6 de toneladas de residuos plásticos. De esta cantidad sólo 4.75×10^3 de toneladas fueron recuperadas para reciclaje, lo cual representa menos del 0.3% del total. El resto en su mayoría es depositado en rellenos sanitarios donde pasan a formar un problema grave de contaminación debido a su baja tasa de degradabilidad, permaneciendo en el medio ambiente por un largo período de tiempo (SEMARNAT¹, 2007).

A pesar de este problema, los materiales plásticos son una parte esencial de casi todas las industrias y han ido reemplazado a los empaques de vidrio y papel debido a algunas de sus propiedades como la elasticidad y flexibilidad, así como por su bajo costo. La acumulación de plásticos recalcitrantes en el medio ambiente se ha convertido en un problema mundial, por lo que se han propuesto algunas soluciones para el manejo de desechos plásticos, tales como la reducción de la fuente por incineración, el reciclaje y la bio- y foto-degradación.

Sin embargo, la mayor parte de estas soluciones presentan problemas asociados (Khanna y Srivastava, 2005). Por ello es necesario buscar una alternativa amigable con el medio ambiente y económicamente justificable para producirlos. A pesar de que los PHA son reconocidos como candidatos para producir plásticos biodegradables, aún tienen como limitación para su producción a gran escala su alto precio en comparación con los plásticos convencionales (Lee, 1996).

¹ SEMARNAT – Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México

Durante la década de los 70, una compañía británica llamada ICI (Imperial Chemical Industries) invirtió fuertemente en el desarrollo de métodos para obtener plásticos biodegradables. Eventualmente desarrolló un biopolímero nombrado Biopol. Biopol mostró algunas desventajas como la tendencia a ser frágil. ICI quebró hacia la década de los 90 y Biopol fue vendido a Monsanto y después a Metabolix (Cambridge). ICI estimó un costo en el mercado de Biopol de 23 USD/Kg hacia 1990, pero se planeaba que en los años venideros este precio bajará hasta 7-9 USD/Kg; sin embargo con estos precios es difícil ver al Biopol como un polímero que pueda reemplazar a los plásticos de origen petroquímico.

Esto se debe a que las acumulaciones máximas de este tipo de materiales se han obtenido en cultivos puros bacterianos son aún bajas; cabe mencionar que los plásticos biodegradables se han fabricado a gran escala pero con un alto costo que no permite difundir su uso .

1.2. Justificación

El desarrollo de materia prima para producir plásticos biodegradables representa un camino para reducir el problema de disposición y/o estabilización de los residuos sólidos y como alternativa para el tratamiento de efluentes industriales. Además de que los lodos generados por una planta de tratamiento de agua residual podrían generar biomasa capaz de producir los PHA, los efluentes industriales altos en contenido de AGVs pueden utilizarse como la fuente de carbono del proceso. El uso de una técnica alternativa para cuantificación de PHA puede incrementar la viabilidad de llevar a cabo el proceso de producción de PHA a nivel industrial debido a la reducción en el tiempo y costo involucrado con la técnica cromatográfica usual, que reduciría tiempos experimentales y por lo tanto facilitaría el estudio de valores óptimos de las variables de control.

1.3. Hipótesis

“Los lodos generados por una planta de tratamiento de agua residual podrían usarse como inóculo para generar biomasa capaz de producir polihidroxicanoatos. Es posible desarrollar un método alternativo a la cromatografía de gases (CG) para cuantificación de PHA que produzca resultados en menor tiempo y sin producir residuos peligrosos y con un error de predicción comparable al de la CG”

I.4. Objetivos

General

Diseñar y estudiar un sistema integral de producción de polihidroxialcanoatos (PHA) y tratamiento de aguas residuales con lodos activados para obtener cultivos capaces de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) mediante la estrategia de enriquecimiento selectivo utilizando una fuente de carbono de bajo costo y proponer una técnica de cuantificación de PHA en cultivos mixtos como alternativa a la cromatografía de gases.

Particulares

- Estudiar el proceso de acumulación y degradación de PHA en cultivos mixtos con sustrato sintético y con agua residual como fuente de carbono.
- Proponer, probar y validar una técnica de cuantificación rápida de PHA en cultivos mixtos alternativa a la cromatografía de gases
- Identificar condiciones de funcionamiento que favorezcan la acumulación de PHA en un reactor de enriquecimiento selectivo para posteriormente proponer estrategias de control encaminadas a maximizar la producción de PHA.

2 Antecedentes

2.1 Estructura química y propiedades mecánicas

Los polihidroxicanoatos se encuentran presentes en un variado número de bacterias, ya que actualmente es claro que este tipo de compuestos no son solo sintetizadas por bacterias Gram-negativas sino también un gran número de Gram-positivas, aerobias (cianobacterias), anaerobias fotosintéticas así como en algunas arqueobacterias (Scherer et al, 1999). Estas bacterias sintetizan los PHAs como compuestos de almacenamiento de fuentes de carbono y energía (Lenz y Marchessault, 2005), y probablemente tienen otras funciones en la célula bacteriana. En estos compuestos, los monómeros de ácidos hidroxicanoicos forman unidades repetitivas que están unidas por enlaces de tipo oxoéster para formar los polioxoésteres. Debido a que los PHA tienen propiedades termoplásticas y elastoméricas deseables, además de ser biodegradables, han sido considerados como sustitutos para los plásticos de origen petroquímico, que son recalcitrantes, como el polietileno y el polipropileno, entre otros (Steinbüchel, 2005). Los PHA tienen la forma estructural general mostrada en la Figura 2-1 (Khanna y Srivastava, 2005).

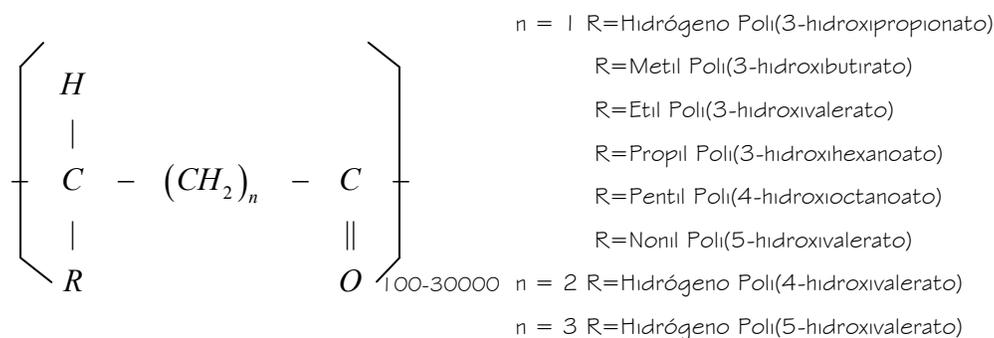


Figura 2-1 Estructura Química de PHAs

Los PHA son una familia de poliésteres biológicos que contienen la unidad monomérica (R)-3HA. Los ácidos 3-hidroxicanoicos están en la posición R debido a la estereoespecificidad de la enzima polimerizante, la PHA sintetasa. El miembro más estudiado de esta familia es el P(3HB), que contiene unidades repetitivas de (R)-3HB. Los pesos moleculares de estos polímeros se encuentran en un intervalo de entre 2×10^5 hasta 3×10^6 daltons (Da), en función de los microorganismos y las condiciones de crecimiento a las que se someten.

La apariencia del polímero es granular y puede haber de 8 a 13 gránulos por célula, cuyo diámetro varía entre 0.2 y 0.5 μm (observado en *Alcaligenes eutrophus* [Khanna y Srivastava, 2005]).

Se ha encontrado que el estado físico del PHA es el de un polímero amorfo móvil. Es por ello que métodos para separación del polímero de la biomasa, como la centrifugación llevan a la pérdida irreversible de la degradabilidad a través de la enzima intracelular depolimerasa; esto se debe a que al someter a centrifugado los gránulos, se acelera la cristalización del polímero ya que los gránulos coalescen y forman masas más grandes, lo cual lleva a la aceleración de la cristalinización.

Las propiedades físicas y térmicas de los polímeros pueden ser reguladas variando su estructura molecular y la composición. El homopolímero P(3HB) es un material relativamente quebradizo y frágil, pero se ha observado que al incorporar copolímeros a la familia de los PHA se pueden obtener productos con un amplio intervalo de valores de dureza y flexibilidad y con mejores propiedades para ser utilizados en sustitución de algunos plásticos de origen petroquímico (Sudesh et al, 2000).

A pesar de que el peso molecular es una propiedad que puede determinar el uso que se le puede dar al polímero obtenido, no se ha hecho mucha investigación al respecto. Esto quizá es que para algunas técnicas utilizadas comúnmente para hacer este tipo de estudios, como NMR y permeación en gel, se necesitan purificar cantidades considerables de polímero bacteriano para hacerlo. Sin embargo existen otras técnicas que utilizan cantidades pequeñas de muestra y que pueden ser exploradas más a fondo como es el HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño). Se ha obtenido una variedad de pesos moleculares dependiendo del tipo de microorganismo y también en diferentes etapas y condiciones de cultivo. Otros parámetros que pueden afectar el peso molecular son el pH y la cantidad y composición de la fuente de carbono utilizada (Anderson et al, 1992).

El P(3HB) es un termoplástico altamente cristalino con una temperatura de fusión alrededor de 180°C. Las propiedades físicas de este polímero son comparables con las del polipropileno isotáctico debido a su parecido en cristalinidad y punto de fusión. Sin embargo, la extensión necesaria para la ruptura del P(3HB) es solamente del 6%, mientras que la del polipropileno es de 400% (Sudesh et al, 2000). En la tabla 2-1 se muestra un cuadro comparativo del P(3HB) contra algunos polímeros de origen petroquímico.

Tabla 2-1 Propiedades físicas y térmicas para algunos polímeros comunes y P(3HB) (Sudesh et al, 2000)

Propiedades	P(3HB)	Polipropileno	Poli (etileno tereftalato)	Nylon-6,6
Temperatura de fusión (°C)	180	176	267	265
Temperatura de transición a cristal (°C)	4	-10	69	50
Cristalinidad (%)	60-80	50-70	30-50	40-60
Densidad (g/cm ³)	1.250	0.905	1.385	1.14
Módulo de Young (GPa)	3.5	1.7	2.9	2.8
Esfuerzo a tensión (MPa)	40	38	70	83
Extensión necesaria para rompimiento (%)	6	400	100	60

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.

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 tensión disminuye y la elongación requerida para la ruptura aumenta. En la tabla 2-2 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 2-2 Propiedades mecánicas y térmicas de copolímeros P(3HB-co-3HV) (Doi, 1990)

Composición (mol%)		Temperatura de Fusión (°C)	Transición de Cristal (°C)	Temperatura de Distorsión al calor (°C)	Módulo de Young ¹ (GPa)	Esfuerzo a Tensión (MPa)	Esfuerzo A Impacto Izod (J/m)
3HB	3HV						
100	0	179	10	157	3.5	40	50
97	3	170	8	140	2.9	38	60
91	9	162	6	125	1.9	37	95
86	14	150	4	112	1.5	35	120
80	20	145	-1	99	1.2	32	200
75	25	137	-6	92	0.7	30	400

¹ El módulo de Young es la medida de la elasticidad de un material

2.2 Biodegradabilidad de los PHA

Una de las características más importantes de los poliésteres bacterianos es que pueden ser degradados en el medio ambiente. Sus productos, tales como películas y fibras, pueden ser degradados en el suelo, lodo o agua de mar. Bajo condiciones óptimas la tasa de degradación es extremadamente rápida. Se han reportado tiempos de degradación para un copolímero P(3HB)-P(3HV) de dos semanas en lodos activados (Doi, 1990). Algunos microorganismos como bacterias (*Pseudomonas lemoignei*, *Comamonas testosteroni*, *Comamonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Streptomyces sp.* y *Pseudomonas picketti* (Scherer et al, 1999) y hongos (*Aspergillus fumigatus*, *Penicillium funiculosum* (Scherer et al, 1999), *Paecilomyces lilacinus* D218 (Oda et al, 1999) producen enzimas depolimerizantes extracelulares para el P(3HB) y sus copolímeros.

Estas enzimas hidrolizan el polímero o copolímero a dímeros y monómeros y los productos resultantes de esta hidrólisis son absorbidos por las bacterias u hongos que producen las enzimas depolimerizantes y utilizados como nutrientes. También existe hidrólisis, aunque con una tasa muy lenta, en el agua sin la presencia de enzimas (Doi, 1990).

En la figura 2-2 se presenta una gráfica de la degradación del homopolímero P(3HB) y otros dos copolímeros P(3HB-co-3HV) (Sridewi et al, 2006). En este estudio se expusieron películas del polímero en un ecosistema tropical de mangle. Se vió que la tasa de degradación de polímero no solo dependía de la degradación enzimática por hongos y bacterias que excretan enzimas depolimerasas, sino también de la acción del agua salada. En general, el homopolímero tarda más en degradarse que los copolímeros debido principalmente a su cristalinidad y morfología superficial. Además se probó la biodegradabilidad del plástico en mangle; el primero fue puesto en la superficie y el otro fue enterrado en los sedimentos. Al cabo de 8 semanas de observación los polímeros expuestos en la superficie alcanzaron en promedio un 80% de degradación mientras que aquellos en los sedimentos alcanzaron una degradación del 100%, representado como peso molecular recuperado del polímero.

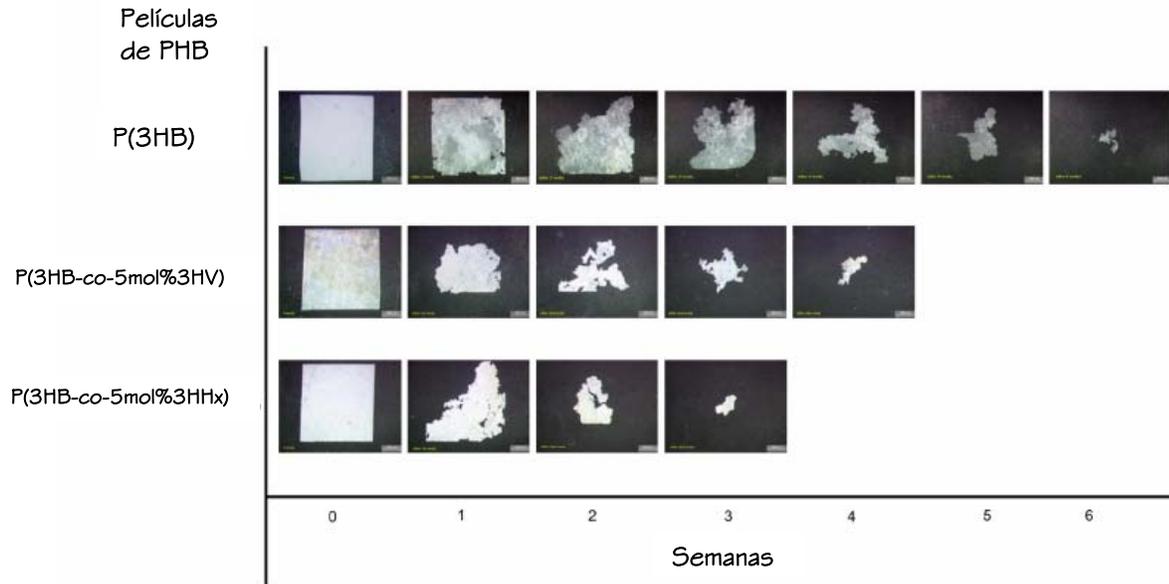


Figura 2-2 Degradación de P(3HB) y P(3HB-co-3HV) en mangle tropical (Sridewi et al, 2006).

Según Doi (1990) se ha encontrado que *Alcaligenes faecalis*, excreta una enzima depolimerasa extracelular para degradación del P(3HB). Sin embargo, esta enzima sólo ha mostrado ser capaz de hidrolizar gránulos de P(3HB) con una estructura altamente cristalina, pero no ataca gránulos con estructura amorfa (Doi, 1990).

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

2.3 Aplicaciones y ventajas

Se producen miles de toneladas de plásticos de origen petroquímico al año a nivel mundial y gran parte de ellos terminan siendo una amenaza ecológica, debido a que terminan depositados en ambientes marinos, así como en otras regiones y ecosistemas, donde son difícilmente degradados. Esta es una razón importante para optimizar la producción de polímeros que puedan ser rápidamente hidrolizados y degradados en el ambiente.

Entre las aplicaciones que tiene se han encontrado aplicaciones en el campo de la medicina; esto incluye suturas quirúrgicas y placas de hueso, entre otras, al demostrar biocompatibilidad y lenta reabsorción de los poliésteres microbianos en ambientes biológicos *in vivo*. Además presentan una toxicidad al consumo oral nula.

Se ha demostrado también que los materiales basados en PHB producen una respuesta de adaptación al tejido óseo favorable y consistente sin presencia de inflamación indeseada o rechazo (Doyle et al, 1991). Además se ha visto que compuestos de PHB y PHV tienen un esfuerzo mecánico a compresión de 62MPa, el cual es casi igual que el de los huesos, y por lo tanto es considerado como un biomaterial interesante para ser usado como fijación en fracturas de huesos (Ni y Wang, 2002). También se ha visto su posible uso para reparación de conductos nerviosos. En un estudio, Chen y Wua (2005) muestran un resumen de otras aplicaciones como materiales para tejidos.

Estas aplicaciones se llevan a cabo obteniendo el biopolímero con cultivos puros y sustratos estériles. Sin embargo, al observar las propiedades térmicas y mecánicas de los plásticos bacterianos analizados se pueden encontrar aplicaciones más tradicionales como es: la formación de películas plásticas, materiales de empaque y formación de envases, ya que cuentan con propiedades parecidas al poliestireno y al polietileno. Una propiedad del PHB en particular, que lo hace adecuado para el empaque de alimentos, es su baja difusividad al oxígeno.

Dentro de la agricultura, al ser biodegradables en el suelo, pueden ser utilizados como material para transporte de insecticidas, herbicidas o fertilizantes, contenedores de semillas, o también como liberación de medicamentos en la medicina veterinaria, y como tubería para irrigación de cultivos (Punrattanasin, 2001).

2.4 Producción biológica de PHA

La síntesis del P(3HB) ha sido ampliamente estudiada en cultivos puros de diversos tipos de bacterias; en la figura 2-3 se encuentra la ruta metabólica abreviada de síntesis-degradación de P(3HB) estudiada en *Ralstonia eutropha*.

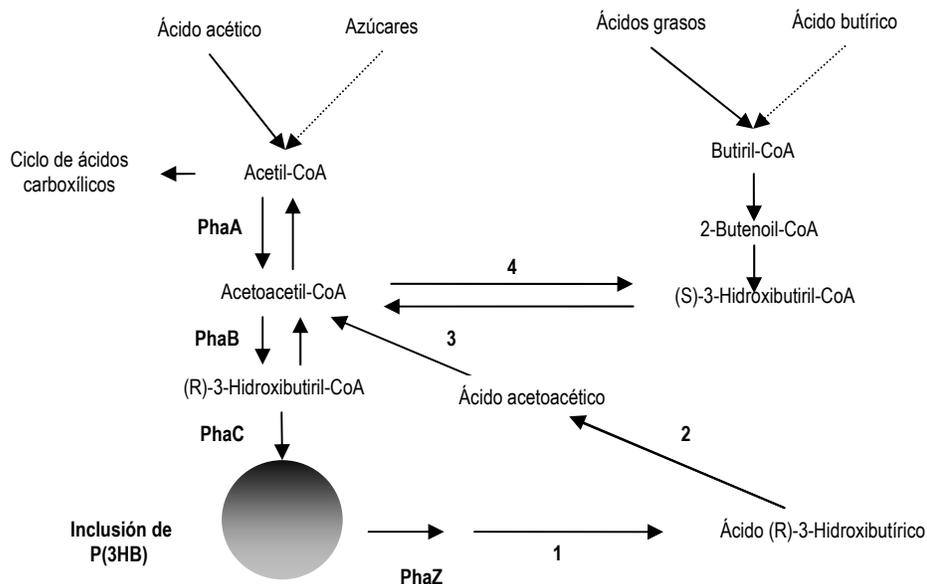


Figura 2-3 Ruta metabólica de Síntesis y degradación de P(3HB). PhaA, β -ketotiolasa; PhaB, Reductasa Acetoacetyl-CoA dependiente de NADPH; PhaC, PHA sintasa; PhaZ, PHA depolimerasa; 1, dimerohidrolasa; 2, (R)-3-hidroxiacetyl-CoA dehidrogenasa; 3, Acetoacetyl-CoA sintetasa; 4, Acetoacetyl-CoA dependiente de NADPH reductasa (Sudesh et al, 2000)

Se sabe que la composición de los copolímeros que se tengan depende fuertemente de los sustratos utilizados de carbono. En la figura 2-3 se puede ver un esquema general para el metabolismo cíclico del P(3HB). El P(3HB) es sintetizado a partir de la acetyl-CoA por la secuencia de tres reacciones enzimáticas, después de las cuales el P(3HB) es producido por la polimerización de D(-)-3-hidroxiacetyl-CoA por la acción de la PHA sintasa.

En estas reacciones la acetyl-CoA, derivada de una serie de sustratos de carbono, es la unidad base de construcción para la síntesis del P(3HB). La enzima β -cetotiolasa es la clave de este proceso, pero también se han encontrado rutas metabólicas donde no es necesaria y se ha utilizado ácido butírico como fuente de carbono (Doi, 1990; Lee, 1996).

Ya que el PHA es un compuesto de almacén para un exceso de carbono, es natural que los microorganismos cuenten con una enzima para degradarlo y así recuperar el carbono almacenado. En *Ralstonia eutropha*, se ha observado que la tasa de degradación del polímero acumulado es aproximadamente 10 veces más lenta que la tasa de síntesis. Sin embargo el mecanismo de degradación de PHA no se ha investigado tan extensamente como la síntesis (Doi et al, 1992).

De acuerdo a Doi (1990), cuando los microorganismos son expuestos a condiciones de crecimiento desbalanceadas (identificadas como favorecedoras de acumulación de PHA), la enzima acetil-CoA no puede entrar al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para poder obtener energía para las células debido a una alta concentración de NADH. La alta concentración de NADH es consecuencia del cese de síntesis de proteínas, este proceso se encuentra estrechamente ligado a la generación de ATP por la cadena de transporte de electrones, que ocurre durante la limitación de algún nutriente necesario para las funciones celulares. Las altas concentraciones de NADH inhiben a la enzima citrato sintetasa, la cual es una de las enzimas clave del ciclo TCA; esto lleva a un incremento en el nivel de acetil-CoA. Entonces, la acetil-CoA es utilizada como sustrato para la biosíntesis del PHA mediante la secuencia de tres reacciones enzimáticas. Además, cuando se tienen altas concentraciones de CoA intracelular la enzima β -cetotiolasa se inhibe, esta enzima es una de las tres responsables de la síntesis de PHA. Cuando no existe ninguna restricción para la entrada de la acetil-CoA al ciclo TCA, entonces CoA es liberado mientras la parte de acetil proveniente de la actividad de la enzima citrato sintetasa (la acetil-CoA) es utilizada, de este modo la concentración de CoA se incrementa, y la síntesis de PHA es inhibida. Los PHA pueden servir como un fuente de carbono o de energía para los microorganismos durante un período de ayuno (Punrattanasin, 2001).

Steinbüchel y Fuchtenbusch (1998) explican que la enzima clave de la biosíntesis es la PHA sintetasa como se ha mencionado antes. *Ralstonia eutropha* y otros microorganismos sintetizan P(3HB) a partir de acetil-CoA vía R(-)-3-hidroxi-butiril-CoA, empleando una ruta de tres pasos con β -cetotiolasa, una reductasa acetoacetil-CoA dependiente de NADH dando como producto R(-)-3-hidroxi-butiril-CoA. La acetil-CoA es un intermediario central para el metabolismo de cualquier organismo y es, por lo tanto, formado no solo a partir de carbohidratos y ácidos grasos si no de cualquier fuente de carbono. Las fuentes de carbono que son degradadas vía acetoacetil-CoA o R(-)-3-hidroxi-butiril-CoA agilizan las rutas para la formación de PHAs (Steinbüchel y Fuchtenbusch, 1998).

2.5 Mecanismos metabólicos de producción de PHA

La respuesta de los cultivos bacterianos ante la presencia de condiciones dinámicas en el medio es variada, en particular se encuentra el crecimiento y el almacenamiento.

Crecimiento

Cuando un cultivo crece bajo ciertas condiciones particulares, los microorganismos adaptarán sus características fisiológicas a ese medio particular (adaptación fisiológica). Cuando el medio alcanza condiciones de estado relativamente estable la adaptación fisiológica llegará a una adaptación final, donde los microorganismos son capaces de crecer en ese medio y no ocurre más adaptación (crecimiento balanceado) (Majone et al, 1999).

Existen principalmente cinco mecanismos para la adaptación fisiológica al medio; enriquecimiento selectivo, regulación enzimática, intercambio de información genética, cambio genético hereditario y alteración del medio ambiente. En el enriquecimiento selectivo, los microorganismos capaces de adaptarse al estrés crecen selectivamente sobre otros, lo cual produce una mayor proporción de la biomasa total de estos microorganismos ya adaptados al medio. Es este mecanismo la base de la mayor parte de los experimentos de producción de PHA bacteriano.

Almacenamiento

Como un mecanismo alternativo y/o adicional, la presencia de condiciones dinámicas (sustrato, tiempo de retención celular, pH, aireación, etcétera) en el medio puede ocasionar como respuesta el almacenamiento intracelular de compuestos, principalmente polisacáridos y lípidos (glucógeno y polihidroxialcanoatos). Esta respuesta puede ocurrir incluso bajo condiciones sin limitación de algún nutriente esencial para el crecimiento celular. En este tipo de mecanismo la tasa de consumo de sustrato aumenta rápidamente y hay formación de biomasa determinada como sólidos volátiles. Sin embargo estos sólidos no sólo se reflejarán en forma de material celular, sino también de polímeros de reserva. Como consecuencia de esto, las cinéticas de crecimiento y acumulación de componentes así como los rendimientos asociados serán distintos a cuando sólo hay crecimiento.

Debido a que la síntesis de los polímeros almacenados es más simple que la de nuevo material celular, se requiere menos tiempo de adaptación fisiológica al medio, por lo que la respuesta como almacenamiento se puede considerar más rápida que la 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. Otras respuestas que puede haber ante las condiciones dinámicas y que deben tomarse en cuenta si se quiere llegar a modelar el proceso de acumulación de PHA se explican a continuación.

Acumulación y liberación

Puede ocurrir que la célula tome el sustrato y lo vaya almacenado casi sin ninguna modificación en el interior o transformándolo en compuestos de bajo peso molecular. Por razones termodinámicas, la tasa de acumulación que se alcanza de este modo es mucho menor que la acumulación de polímeros, ya que en el segundo caso las concentraciones molares se reducen mediante la polimerización. Esto quiere decir que la acumulación también puede ser un mecanismo para evitar la acumulación de compuestos tóxicos para la célula. Como un mecanismo adicional se ha observado también la liberación de metabolitos solubles o polímeros extracelulares (Majone et al, 1999).

Sorción

Puede ocurrir que la remoción de sustrato se de únicamente 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 más probable que ocurra bajo condiciones dinámicas de alimentación de un sustrato disponible 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 o en un umbral de concentración demasiado bajo para ser asimilado. Las bacterias que tienen la capacidad de consumir sus reservas acumuladas tendrán una ventaja competitiva sobre el resto, y esto es importante al tratar de seleccionar un tipo de bacterias de un cultivo mixto.

La observación de estas respuestas ante condiciones dinámicas del medio ha permitido desarrollar sistemas con lodos activados (cultivos mixtos) como medio de producción de PHA. Lo que se busca es maximizar la productividad y el rendimiento en peso seco celular del polímero en el cultivo mixto y aumentar la productividad con lodos activados lo cual tiene la ventaja de poder producir los PHA aún en sistemas de tratamiento, valorizando el desecho. Este proceso se detalla más adelante y es el objeto de estudio de este trabajo.

2.6 Limitaciones, costos y producción comercial de PHA

La tecnología que prevalece para la producción de PHA es con el uso de cultivos puros de bacterias utilizando un sustrato concentrado puro como la glucosa. A pesar de que el polímero es producido comercialmente, el precio es sustancialmente mayor que aquellos de origen petroquímico, lo que limita la generalización de su uso y por lo tanto de su producción. Se ha hecho gran cantidad de trabajo de investigación para optimizar el proceso de producción del polímero con cultivos puros (Lee et al, 2005; Sánchez et al, 2003; Choi y Lee, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos son variados y dependen de condiciones particulares (Gurieff y Lant, 2007).

Ante el problema que representa bajar los costos de producción se ha incrementado el interés en investigar la posibilidad de producir PHA utilizando cultivo mixtos, que tendría las ventajas de eliminar los costos de mantener el equipo estéril, y los relacionados con el mantenimiento del cultivo puro sin contaminantes y transformaciones genéticas que disminuyan o varíen su productividad; así como el poder utilizar desechos como sustratos sin costo, entre los que se encuentran desechos de la agricultura e industriales (aguas residuales) (Gurieff y Lant, 1997) en lugar de utilizar fuentes de carbono costosas como las azúcares (Serafim, 2006b). Por supuesto el paso de extracción del polímero contribuye en gran parte al alto costo de la producción de PHA (Serafim, 2006b).

De acuerdo a Serafim (2006b) el uso de cultivos mixtos puede reducir los costos operacionales hasta un 50%; por otro lado el uso de sustratos sin costo puede reducir los costos de sustrato hasta en un 85%. Todo esto se logrará al utilizar desechos como fuentes de carbono y cultivos mixtos junto con la obtención de cultivos más productivos y teniendo procesos de fermentación y recuperación de polímero más eficientes.

Como referencia se tienen algunos cálculos de costos de producción de PHA. Algunos están basados en estudios hechos con cultivos puros, pero pueden servir como referencia. Se estima que cerca del 50% del costo de producción de PHA es debido al costo de recuperación del polímero y que el costo de producción para uso comercial aproximado hacia el año 2000 era de 16 USD/kgPHA (Rhu et al, 2003). En cuanto a otro tipo de biopolímeros, se tienen aquellos producidos a partir de almidones de algunos cultivos como el maíz, que se pueden convertir en poliláctidos (PLA), con un costo de entre 3 a 6 USD/kgPLA.

Otro ejemplo de biopolímero comercializado es BioPol® con un costo en el año 2000 que iba de los 8 a 12 USD/kgBioPol (Biby, s.r.²). Las aplicaciones de estos materiales es en nichos específicos y en regiones específicas del mundo. Por ejemplo BioPol sólo se produce en Europa y tiene un modesto alcance en Japón.

Hacia el año 2006 se estimó un costo de producción de PHA mayor a 7 USD/Kg (ver tabla 2-3). Actualmente se producen cuatro polímeros degradables: Nodax® (Procter & Gamble), Biopol® (MetaboliX), Biomer® (Biomer) y Biocycle® (PHB Industrial) cuyas aplicaciones han sido limitadas y se realiza investigación para bajar sus costos (Serafim, 2006b).

La tabla 2-3 muestra un estudio de costos estimados para los distintos tipos de materiales poliméricos utilizados en la actualidad.

Tabla 2-3 Costos de producción para distintos materiales poliméricos (Serafim, 2006b)

Material	USD/kg
Plásticos sintéticos	< 1.5
Ácido poliláctico	4.5 - 6
Compuestos de almidón	3 - 6
PHAs	> 7

2.7 Producción de PHA con cultivos puros bacterianos

La síntesis de PHA en microorganismos se ha identificado en muchas especies de bacterias³. En cuanto a cultivos puros la mayor parte pertenece a la familia *Halobacteriaceae* del orden Halobacteriales en el dominio *Archaea*. La lista de microorganismos identificados como capaces de producir PHA es de aproximadamente 300 especies, pero sigue creciendo (Doi, 1990).

Muchas de las bacterias que han sido identificadas como productoras de PHA tienen una baja tasa de crecimiento y una temperatura de crecimiento óptimo relativamente baja. Esto presenta dificultades para la lisis celular la cual, es deseable para disminuir el costo de purificación de los gránulos de PHA. Se ha investigado el uso de otro tipo de bacterias con tasas de crecimiento altas y con mayor facilidad para realizar la lisis celular como *Escherichia coli*, la cual naturalmente no es capaz de almacenar PHA, pero puede modificarse genéticamente con un plásmido de alguna otra especie que pueda hacerlo como *Alcaligenes eutrophus*.

² s.r. – Sin referencia (disponible en línea)

³ Aunque se encuentra fuera del alcance de este estudio se tiene también como antecedente la producción de PHA con plantas genéticamente modificadas. Algunas plantas son capaces de producir grandes cantidades de algunos químicos útiles a bajo costo comparado con aquellos rendimientos obtenidos en bacterias. La comercialización de PHA derivado de plantas requiere la creación de plantas transgénicas que además de tener altos rendimientos del producto tengan fenotipos normales y transgenes que sean estables a lo largo de varias generaciones (Reddy et al, 2003).

Así, la ingeniería metabólica ha permitido el uso de *Escherichia coli* para producir PHA, con la ventaja adicional de que puede utilizar varias fuentes de carbono, incluyendo la glucosa, sacarosa, lactosa, y xilosa, permitiendo bajar costos por el uso de sustratos baratos como las melazas o lactosuero (Reddy et al, 2003).

Esta estrategia se puede extender virtualmente a cualquier tipo de bacteria si ésta posee alguna ventaja genética ausente en las que se utilizan. Se identifican entonces dos formas de utilizar la ingeniería metabólica para mejorar la producción de PHA y bajar costos. La primera consiste en introducir los genes de utilización de sustrato en los productores de PHA. La segunda es que los genes de síntesis de PHA se introduzcan en organismos no productores, los cuales son capaces de utilizar sustratos baratos (Reddy et al, 2003).

De las más de 300 especies de bacterias capaces de sintetizar PHA sólo algunas de ellas almacenan cantidades significativas de PHA con alta productividad, como *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algunos tipos de metilótrofos y una recombinante de *Escherichia coli* (Choi y Lee, 1999). Se han clasificado en dos grandes grupos. El primer grupo de bacterias requiere de limitación de un nutriente esencial como es nitrógeno, fósforo, magnesio o sulfuro para la síntesis de PHA con la presencia 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* y *Escherichia coli*., no requieren de la limitación de un nutriente para la síntesis de PHA y pueden acumular polímero durante su crecimiento (Lee, 1996).

Para realizar el cultivo en fed-batch⁴ o por alimentación en lote para las bacterias del grupo uno, se utiliza un sistema de dos pasos. En el primer paso se logra obtener una concentración deseada de células sin limitación de nutrientes. Después de este paso, se limita uno de los nutrientes esenciales para favorecer la síntesis del polímero; esto es debido a que cuando las células se ven limitadas para seguir creciendo por la falta de un nutriente comienzan a sintetizar el PHA (Lee, 1996).

En la tabla 2-4 se presenta una relación de algunas bacterias productoras de PHA con la estrategia de alimentación en lote de dos pasos, así como su productividad y porcentaje de peso celular seco que alcanza el contenido de PHA.

⁴ Un proceso *fed-batch* o por lote alimentado se caracteriza por realizar no todo el aporte del sustrato desde el inicio de la reacción, sino que se realizan adiciones periódicas durante el tiempo de reacción.

Tabla 2-4 Varios tipos de bacterias y sus acumulaciones de PHA

Especie	PHA	Estrategia de Fermentación	Sustrato	Tiempo (h)	Concentración Celular (g L ⁻¹)	Concentración PHA (g L ⁻¹)	Contenido de PHA (%)	Productividad (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referencia
	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa	50	164	121	76	2.42	Kim et al. 1994
<i>Ralstonia Eutropha</i>	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa	74	281	232	82	3.14	Ryu et al. 1997
	P(3HB)	Fed-batch	Hidrolisato de tapioca	59	106	61	58	1.03	Kim y Chang 1995
	P(3HB/3HV)	Fed-batch	Glucosa + ácido propiónico	46	158	117	74	2.55	Kim et al. 1994
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)	Fed-batch	Sacarosa	18	143	71.4	50	3.97	Yamane et al. 1996
	P(3HB)	Fed-batch	Sacarosa	20	111.7	98.7	88	4.94	Wang y Lee 1997
<i>Azotobacter Vinelandii</i>	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa + peptona de pescado	47	40.1	32	79.8	0.68	Page y Comish 1993
<i>Azotobacter Chroococcum</i>	P(3HB)	Fed-batch	Almidón	70	54	25	46	0.35	Kim y Chang 1998
<i>Methylobacterium Organophilum</i>	P(3HB)	Fed-batch	Methanol	70	250	130	52	1.86	Kim et al. 1996
	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa	42	117	89	76	2.11	Lee et al. 1994
<i>Escherichia coli recombinantei</i>	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa + Extracto de levadura + licor de maíz saturado + hidrosilato de caseína	41	112	81	72.3	1.98	Lee y Chang 1994
	P(3HB)	Fed-batch	Glucosa	49	204.3	157.1	77	3.2	Wang y Lee 1997
	P(3HB)	Fed-batch	Sacarosa	48	124.6	34.3	27.5	0.71	Lee y Chang 1993
	P(3HB)	Fed-batch	Suero	49	87	69	80	1.4	Wong y Lee 1998
<i>Klebsiella aerogenes recombinante</i>	P(3HB)	Fed-batch	Molasses	32	37	24	65	0.75	Zhang et al. 1994

La productividad se define como la cantidad de PHA producida por unidad de volumen por unidad de tiempo. Se ha reportado como máxima productividad para cultivos puros un valor de $4.94 \text{ g P(3HB) L}^{-1}\text{h}^{-1}$, obtenido con una estrategia de alimentación por lote para *A. latus*, y es, hasta ahora la productividad más alta reportada (Wang y Lee, 1997). El costo de producción baja a medida que la productividad aumenta, pero también un alto contenido de PHA contribuye a bajar el costo (Lee y Choi, 1998).

2.8 Uso de cultivos mixtos

2.8.1 Generalidades

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 (Dai et al, 2007).

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 un tipo específico de bacterias llamadas PAO y GAO⁵. 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, cuando hay presencia en exceso de la fuente de carbono la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para crecimiento y para acumulación de polímero, y cuando el sustrato es agotado pueden utilizar el polímero acumulado como fuente de energía y fuente de carbono.

⁵ GAO- Glycogen Accumulating Organisms, es decir, microorganismos acumuladores de glucógeno;

PAO- Polyphosphate Accumulating Organisms, es decir, microorganismos acumuladores de polifosfatos Se utilizarán las abreviaciones en inglés.

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, limitando la cantidad disponible de un nutriente esencial para favorecer la acumulación del polímero intracelular (Reis et al, 2003).

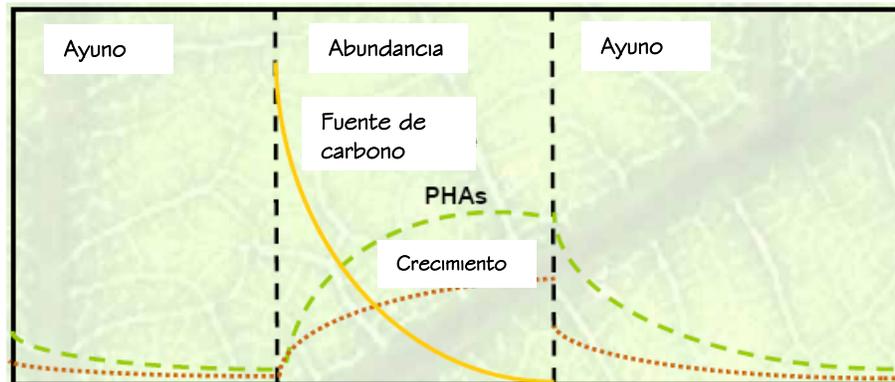


Figura 2-4 Alimentación Dinámica Aerobia (Serafim, 2006b)

Como se ha mencionado, 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.

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 en las fases de abundancia y ayuno son similares, pero el crecimiento es mayor en la fase de abundancia en relación a la de ayuno (figura 2-5). De acuerdo a esto, la acumulación de PHA en cultivos mixtos se realiza sin limitación de un nutriente y por lo tanto no hay condiciones que limiten el crecimiento. Las tasas de acumulación son más altas que las de crecimiento, pero bajo condiciones en las que el sustrato está presente de modo continuo por un largo tiempo, ocurre una adaptación fisiológica, y el crecimiento se vuelve predominante (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

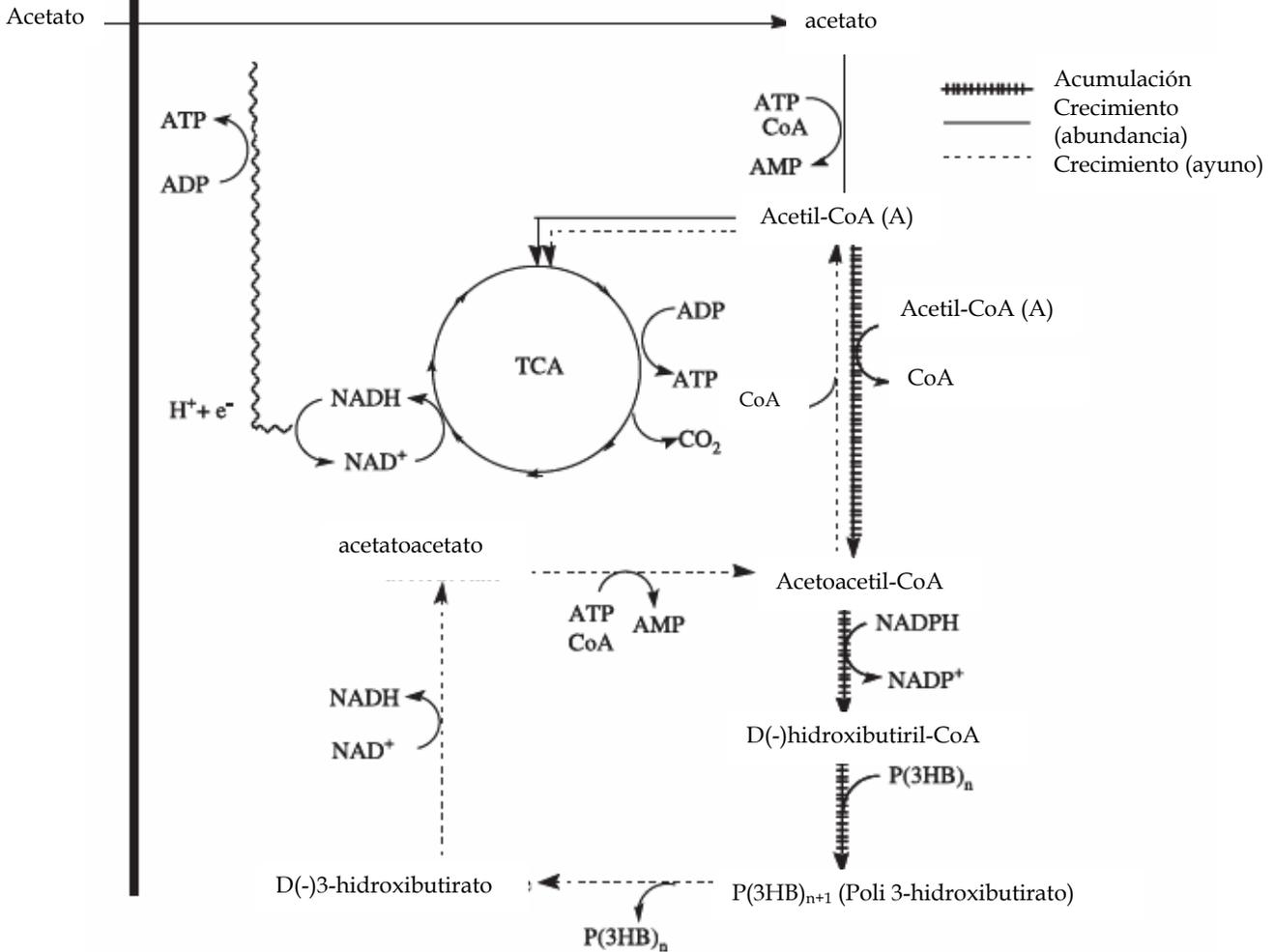


Figura 2-5 Rutas de producción de PHA en condiciones de abundancia/ayuno

Se han utilizado diversos sistemas con reactores secuenciales en lote (SBR⁶) para la producción de PHA con cultivos mixtos. Los SBR han sido operados con variadas condiciones y etapas: microaerófilicos/aerobios (Sato et al, 1998), anaerobio/aerobio (Sato 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).

⁶ SBR: siglas en inglés para Sequencing Batch Reactor.

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* y posteriormente otro llamado de *cultivo*. 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, 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 (Gurieff, *en prensa*). Entonces se suspende la reacción para cuantificar y extraer el polímero. Los dos sistemas pueden trabajar en paralelo.

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; Gurieff, *en prensa*) 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 si 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, se han utilizado mezclas de otros ácidos grasos volátiles (AGV) 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). Otro tipo de sustratos que se han utilizado son el lactato, succinato, piruvato y malato así como etanol, aspartato, glutamato y glucosa (Lemos et al, 2005).

2.8.2 Ventajas de cultivos mixtos

La acumulación de PHA en cultivos mixtos puede alcanzar más del 60% de peso celular seco (calculado como PHA/SSV; donde los SSV incluyen la biomasa activa X más el PHA acumulado). Al ser comparados 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. Este porcentaje 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 de comparación de costos para producción de PHB y PHV con cultivos puros y utilizando cultivos mixtos y sustrato 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). Este estudio es muy detallado y utiliza un enfoque de diseño conceptual de proceso (Meesters et al, 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 llegó a concluir 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 las propiedades de bicompatibilidad y biodegradabilidad características de los PHAs que son una clara ventaja sobre los de origen petroquímico (Serafim, 2006b).

2.8.3 Producción de PHA con PAOs/GAOs

La producción de PHA con cultivos mixtos requiere de un suministro de fuentes de carbono variable. Dado que es preferible producir copolímeros de PHA en vez de homopolímeros como el P(3HB), se requiere agregar diferentes fuentes de carbono secundarias que estén relacionadas con la unidad monomérica deseada. Para lograrlo es necesario que una misma bacteria tome varias fuentes de sustrato al mismo tiempo. Esto es difícil de percibir en cultivos mixtos, ya que al haber una gran cantidad de especies presentes no se puede saber la preferencia que tenga cada especie por cierta fuente de carbono. Por lo tanto es más probable que se obtenga una mezcla de homopolímeros en lugar de verdaderos copolímeros.

Una forma de solucionar esto es el uso de un solo tipo de bacterias de los lodos activados. Éstas se conocen como organismos acumuladores de glucógeno (GAO, por sus siglas en inglés) y los organismos acumuladores de polifosfatos (PAO, por sus siglas en inglés) y se encuentran por lo general en plantas de tratamiento para remoción mejorada de fósforo (EBPR por sus siglas en inglés para Enhanced Biological Phosphorus Removal) (Dai et al, 2007). Se ha demostrado que el lodo desarrollado en procesos anaerobio-aerobios EBPR produce PHAs con altas eficiencias, y que bajo condiciones óptimas es posible obtener más del 30% de peso seco del lodo (Choi and Lee, 2000).

Los PAO 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 GAO dependen de sustratos que pueden ser fermentados y almacenan los productos de la fermentación en vez de excretarlos. Los GAO 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. 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).

En un estudio reportado se obtuvo contenido de PHA en célula seca de 14-41%, que se encuentra aún por debajo del contenido alcanzado con cultivos puros (Dai et al, 2007).

2.8.4 Producción de PHA con lodos activados

Un proceso de tres etapas se desarrolló para la producción de PHA con cultivos mixtos (Majone et al, 1999) y se ilustra en la figura 2-6.

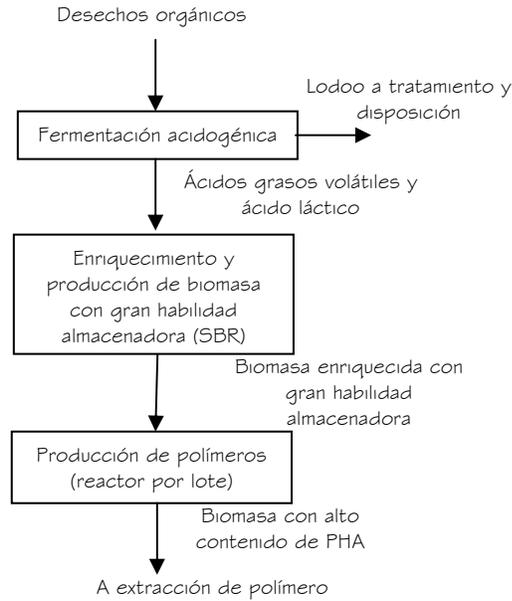


Figura 2-6 Esquema experimental de *Dionisi et al* (2004)

Un sistema integral para producción de PHA utilizando desechos se propuso basado en un sistema de producción del homopolímero PHB propuesto por Majone y colaboradores (1999). En el sistema existe una combinación de etapas: una anaerobia (para la fermentación acidogénica) y otra aerobia (enriquecimiento selectivo de biomasa acumuladora de PHA). En la etapa anaerobia se transforman los desechos de alta concentración biodegradables con una alta tasa de conversión a una combinación de acetato y otros ácidos grasos volátiles, que son el mejor sustrato para PHA. En la etapa aerobia un sistema de lodos activados se opera con una carga orgánica media-alta utilizando una dinámica de suministro de sustrato alternando períodos de ayuno-abundancia de sustrato, para favorecer el crecimiento de las bacterias capaces de almacenar PHA. Esta etapa debe ser operada a la más alta tasa posible para mantener la presión selectiva sobre el cultivo. En el tercer paso, el exceso de biomasa producido en la segunda y que ya está enriquecido es sometido a un proceso por lote donde la carga orgánica es mucho más alta que en la segunda etapa. Esto se hace con la finalidad de llevar a su punto de saturación de PHA a la biomasa. Esta biomasa pasa a extracción y cuantificación del polímero.

El sistema propuesto por Dionisi y colaboradores (2004) utiliza el diseño del sistema de Majone et al (1999), pero a diferencia de éste que sólo utiliza ácido acético, se utiliza un sustrato con ácido acético, propiónico y láctico, así como combinaciones de éstos, con el fin de obtener copolímeros de mejores propiedades que el PHB de Majone et al (1999). Se realizaron pruebas con un solo sustrato, con sustratos alimentados individualmente y mezclas de los mismos.

En cuanto a las pruebas de acumulación por lote se hicieron pruebas de corta y larga duración (Dionisi et al, 2004). En las pruebas por lote de corta duración se obtuvo una tasa de almacenamiento de 0.45 mg de PHA (DQO) por cada gramo de sustrato utilizado (DQO) y una tasa de crecimiento de 0.24 mg de biomasa (DQO) por cada gramo de sustrato utilizado (DQO). En cuanto a las pruebas de larga duración se pudo concluir que se alcanza un punto de saturación de PHA en las primeras 2 horas y se alcanzó una acumulación de 50% de fracción de PHA.

Una de las conclusiones que se obtuvieron en este trabajo es que la etapa de enriquecimiento selectivo es necesaria para tener altas tasas de acumulación de PHA. La productividad estimada de este proceso se calculó en 0.14 (gPHA L⁻¹h⁻¹); 2.88 (gP(HB/HV) L⁻¹h⁻¹) para un cultivo puro de *Escherichia coli* (Choi and Lee, 2000).

En otro trabajo con lodos activados (Serafim et al, 2004) sometidos a condiciones dinámicas de suministro de sustrato se demostró que los lodos activados tienen una capacidad estable para almacenar P(3HB). El sistema mencionado trabajó durante 2 años y se utilizaron dos reactores SBR; uno fue operado en un modo estándar⁷ y en el otro se controló el suministro del sustrato observando las variaciones en la concentración de oxígeno disuelto.

El reactor con operación estándar fue inoculado con biomasa de una planta de tratamiento de tipo EBPR, el suministro del sustrato se realizó en un solo pulso corto de alimentación alternado con un largo período de ausencia de sustrato. El reactor SBR fue operado bajo limitación de amoníaco. Posteriormente se inoculó el segundo reactor SBR con control de oxígeno disuelto con lodo del primer SBR, y se siguieron ciclos con períodos de ayuno de 10 horas y períodos de abundancia de sustrato variables (3-5 horas). La estrategia de alimentación en este segundo reactor fue distinta al primero, ya que se suministró en tres pulsos: el primero a los 15 minutos de iniciada la reacción y los otros dos al agotarse el sustrato suministrado por el pulso anterior. Esto se hizo observando la concentración de oxígeno disuelto en línea; cuando la fuente de carbono es agotada se observa un incremento repentino en esta concentración.

⁷ El ciclo típico de un SBR consiste en un tiempo dividido en etapas, etapa de llenado (donde se suministra el sustrato), etapa de reacción (con aeración y agitación tiene por objetivo la degradación del compuesto de interés), sedimentación (separar la biomasa del líquido tratado), vaciado (retirar el efluente) y tiempo muerto.

Se realizaron pruebas de acumulación por lote con lodos del reactor con operación estándar y la reacción se hizo durante 9-12 horas, suministrando pulsos de sustrato conteniendo acetato, amoníaco y fósforo. También se determinaron parámetros cinéticos y estequiométricos.

En el reactor SBR operado de manera estándar se obtuvieron acumulaciones de PHB de entre 30-40%, que son bajos en comparación con otros trabajos (Serafim et al, 2004; Beun et al, 2002). Otro tipo de pruebas se hicieron para probar el efecto del pH sobre la acumulación de PHB y se concluyó que el control de pH hace que el PHB acumulado sea menor. Como resultados se obtuvo un 67.5% de PHA al aumentar la concentración del sustrato, y cuando el sustrato se agregó por pulsos se obtuvo un 78.5% de PHA en peso celular seco.

Punrattanasin (2001) llevó a cabo diferentes configuraciones para maximizar el contenido de PHA en un reactor. Se probaron varias condiciones de operación: ausencia de oxígeno (anaerobio), con limitación de oxígeno (microaerofílico) y sin limitación de oxígeno (aerobio). Para cada experimento se probaron condiciones de limitación de nutrientes: limitación solamente de N, limitación solo de P, y limitación de ambos. Se concluyó que la mejor configuración es un sistema de dos pasos como los antes descritos y que la máxima acumulación de PHA fue alcanzada para condiciones aerobias y que una combinación de limitaciones de N y P estimulaba la máxima producción de PHA en lugar de limitar uno solo de ellos. Obtuvieron un máximo de 70% de peso seco celular de PHA. Además se vio que era mejor elegir inóculo de una planta convencional y no una para remoción de fósforo, ya que las bacterias de estas últimas tienden a transformar los compuestos orgánicos en carbohidratos intracelulares en lugar de PHA.

2.8.5 Estudios con agua residual real

Aún cuando la mayor parte de los estudios ha trabajado con agua residual sintética preparada con AGV's en abundancia, pocos estudios se han hecho utilizando como sustrato agua residual industrial con alto contenido de AGV's para la producción de PHA. En un estudio se realizó la producción de PHA con SBRs y desechos de la industria alimenticia, con cultivos de una planta para remoción de nutrientes (EBPR). Se utilizó una estrategia de limitación de oxígeno y nutrientes, alcanzando un contenido máximo de 51% PHA con un ciclo anaerobio/aerobio con limitación de fósforo (Rhu et al, 2003).

En otro estudio reciente, utilizó agua residual de una planta de enlatado de jugos de frutas y conservas; esta agua residual mostró una alta proporción de AGV's en su composición (Gurieff, *en prensa*). El proceso de producción de PHA está basado en un reactor aerobio de enriquecimiento selectivo, seguido de un reactor de acumulación del polímero (Serafim et al, 2004; Dionisi et al, 2004). Se utilizan bacterias de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales como inóculo y se han alcanzado acumulaciones de hasta 73% en peso seco celular. La experimentación incluye, en el diseño experimental, prefermentadores con lodos primarios de un sedimentador que producen un efluente concentrado en AGV's y es alimentado a otro reactor de enriquecimiento selectivo de bacterias productoras de PHA. Este proyecto aún está en estudio.

Bengtsson y colaboradores (2007) llevaron a cabo la producción de PHA con lodos activados utilizando como sustrato el efluente de un molino de papel. Se llevó a cabo en tres etapas: una fermentación acidogénica para convertir la materia orgánica del agua residual a AGV's, después un sistema de lodos activados operando en condiciones dinámicas de ayuno/abundancia para enriquecer a las bacterias capaces de acumular PHA y finalmente una etapa de acumulación en pruebas por lote. El máximo contenido obtenido de PHA fue de 48% en peso seco.

En la tabla 2-5 se presentan algunos resultados obtenidos de producción de PHA con cultivos mixtos.

Tabla 2-5 Resumen de producción de PHA con cultivos mixtos

Referencia	PHA	Sustrato	Estrategia De alimentación	Tipo de Estudio	Origen de Inóculo	%PHA	Productividad (mgPHAL ⁻¹ d ⁻¹)	Comentarios
(Chinwetkitvanich et al, 2004)	PHB/PHV	Acetato de sodio Propionato de sodio	Fed-batch	Aerobio	Planta EBPR	45-52	1.46-8.21	Fase de crecimiento seguida de fase de Reacción con limitación de fósforo Sistema de tratamiento de agua residual seguido de reactor de producción de PHA
(Chua et al, 2003)	PHB/PHV	Agua residual con adición de acetato de sodio	Fed-Batch	Aerobio	Planta experimental con ciclos Anaerobio-anóxico-óxico	30	N.D.	Enriquecimiento selectivo seguido de aislamiento de especies acumuladoras
(Kumar et al, 2004)	PHB	Acetato	Fed-Batch		Planta de tratamiento de agua residual de la industria alimenticia	33	N.D.	Proceso de crecimiento celular seguido de limitación de nutrientes
(Punrattanasin, 2001)	PHB/PHV	Acetato y propionato con limitación de N y P	Fed-Batch	Aerobio	Planta de tratamiento de agua residual convencional y otra EBPR	57	2.04	

2.9 Aislamiento, caracterización, detección y cuantificación de los PHA

2.9.1 Aislamiento del polímero

Como ya se mencionó, la parte de extracción del polímero implica cerca del 50% de los costos asociados. Para el aislamiento del polímero se utilizan diversas técnicas como la extracción con solvente y el tratamiento con hipoclorito de sodio. A continuación se detallan algunas de estas técnicas:

- a. **Extracción con solvente.** Los polímeros son extraídos de las células liofilizadas con cloroformo caliente en un aparato Soxhlet; varios otros lípidos son extraídos junto con el polímero. Para remover los lípidos, los poliésteres son precipitados con la adición lenta de un solvente orgánico (Punrattanasin, 2001).
- b. **Tratamiento con hipoclorito alcalino.** En esta técnica la biomasa es digerida con hipoclorito de sodio para disolver las células y liberar los gránulos que se purifican de otros lípidos. En este procedimiento se ha reportado una severa degradación de los polímeros durante la digestión (Punrattanasin, 2001).
- c. **Tratamiento enzimático.** Los gránulos de PHB pueden ser aislados tratando las células con enzimas que solubilicen todos los componentes celulares excepto el polímero. Las enzimas utilizadas son lisosomas, fosfolipasas, lecitinasa, proteinasa y alcalasa entre otras (Punrattanasin, 2001).

2.9.2 Detección cualitativa

Existen algunos métodos sencillos y rápidos de realizar para la detección de los gránulos de PHA dentro de las bacterias. Únicamente sirven para detectar si están o no presentes. La presencia de PHB se utilizó como un criterio taxonómico para la clasificación de bacterias, ya que esta característica parece permanecer estable.

- a. **Tinción con azul de nilo A.** El azul de Nilo A (sulfato de azul de Nilo, Azul Básico 12) es un colorante que produce fluorescencia naranja intensa de los gránulos de PHB al ser observados en el microscopio de fluorescencia (Ostle y Holt, 1982).
- b. **Tinción con negro de Sudán y safranina.** El colorante negro de Sudán B ($C_{26}H_{24}N_4O$) tiñe los gránulos de PHA de negro para hacerlos fácilmente identificables al ser vistos al microscopio, la safranina tiñe las paredes celulares para generar contraste con los gránulos (Burdon, 1946).

En el apartado de Métodos analíticos se describen las técnicas a fondo.

2.9.3 Análisis de propiedades

Para el análisis de las propiedades de los polímeros existen muchas metodologías. La homogeneidad de las nanopartículas en la matriz polimérica se puede validar por la observación en microscopio de escaneo de campo de electrones (FE-SEM, por sus siglas en inglés *Field Emission Scanning Electron Microscope*). Las propiedades mecánicas dinámicas, propiedades térmicas, y la bioactividad del compuesto se pueden analizar por una gran variedad de técnicas, incluyendo: un analizador dinámico mecánico (DMA, *Dynamic Mechanical Analyser*), un calorímetro de escaneo diferencial (DSC, *Differential Scanning Calorimeter*), un analizador termogravimétrico (TGA, *Thermogravimeter Analyzer*), un microscopio de escaneo de electrones acoplado con un detector de energía dispersa de análisis de rayos X (SEM+EDXA, *Scanning electron microscope coupled with energy dispersive X-ray Analysis Detector*), mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y con difractómetros de película fina de rayos X (TF-XRD, *Thin Film X-ray Diffractometer*) (Chen et al, 2007).

- a. **Difracción con rayos X.** Los difractogramas sirven para identificar las fases cristalinas de los poliésteres (Oliveira et al, 2007).
- b. **Calorimetría de escaneo diferencial.** Con este método se pueden obtener la temperatura de transición a vidrio, la temperatura de fusión y la temperatura de cristalización; también se puede obtener la temperatura de cristalización (Oliveira et al, 2007).
- c. **Espectroscopia nuclear de resonancia magnética (NMR) y Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).** El análisis de la espectroscopia NMR y FTIR de los biopolímeros producidos permite hacer una evaluación cualitativa de la composición estructural del polímero.
- d. **Cromatografía de permeación de gel.** Esta técnica se utiliza para medir la masa molar de muestras de células (Oliveira et al, 2007) así como la masa molar del PHB.

2.9.4 Métodos analíticos para la cuantificación

- a. **Cromatografía de gases.** La técnica más utilizada para cuantificación de PHA dentro de las bacterias es reportada por diferentes autores y consiste en un análisis de muestras por medio de la cromatografía de gases (Braunegg et al, 1979). Esta técnica implica la hidrólisis y la propanólisis o metanólisis subsecuente de los PHA en las células en presencia de ácido sulfúrico y cloroformo. El método se caracteriza por las grandes cantidades de solvente que se necesitan y porque requiere de mucho tiempo para realizarla.

b. Espectroscopía infrarroja. Se ha utilizado en combinación con métodos de análisis estadístico de datos, como mínimos cuadrados parciales, para relacionar el espectro obtenido con concentraciones ya conocidas de compuestos medidos con técnicas analíticas establecidas que sirven como referencia, lo cual permite desarrollar modelos de predicción de nuevos datos. Más adelante se detallará sobre la técnica al igual que la cromatografía de gases.

c. Espectroscopía UV. Su aplicación ha sido similar a la de la espectroscopía infrarroja.

d. Cromatografía de líquidos (HPLC). Con aplicación parecida a la de cromatografía de gases.

2.10 Relevancia del control de procesos biológicos

La producción de PHA ha sido extensamente estudiada, especialmente en cultivos puros. Los procesos de extracción y cuantificación no han sido suficientemente estudiados para su optimización, aún cuando la extracción representa aproximadamente el 50% del costo de producción del PHA. La mayor parte de los trabajos sobre PHA están encaminados a la optimización del proceso de enriquecimiento selectivo y cosecha; estrategias de aportación de sustrato, concentraciones y proporciones del mismo; y la configuración de los reactores (aerobio, anaerobio, anóxico, microaerófilico y sus combinaciones).

Los últimos trabajos se han encaminado al uso de aguas residuales de la industria para su fermentación y obtención de cantidades significativas de PHA. Algo que aún no se ha estudiado extensivamente es el modelado del proceso de acumulación y degradación del polímero intracelular. Como ya se dijo antes, lo que ha limitado el uso del PHA y sus copolímeros es su alto costo relativo comparado con el del polipropileno, por ejemplo. En el proceso de fermentación, los sustratos y la recuperación del producto son lo que representa la mayor parte de los costos. Varios estudios han lidiado con este tipo de problemas a través de la reducción de costos optimizando la fermentación.

La optimización de procesos, supervisión y control de los mismos ha cobrado mucha importancia recientemente. La aceptación de las metodologías basadas en modelos aún se encuentra limitada, principalmente debido a que muchas veces la razón costo/beneficio no es suficientemente atractiva para este tipo de desarrollos (Oliveira, 1998).

Varios enfoques se han utilizado dentro del campo de los procesos biológicos para optimizar procesos de interés o entenderlos. La mayor parte de las veces se sigue un enfoque sistematizado que se caracteriza por el uso de información que se tiene del proceso *a priori*. Una de las cosas más importantes de un modelo es que se espera que éste permita representar las propiedades relevantes del proceso cuantitativamente de modo que se hagan accesibles para un análisis computacional eficiente y el uso de técnicas de optimización.

Para lograr la optimización del proceso, es indispensable definir de antemano la forma en la que se medirá el progreso. Lo que se necesita es un criterio cuantitativo formulado con una función objetivo. Esta función objetivo no es del todo sencilla ya que no solamente debe considerar el objetivo principal, por ejemplo aumentar la producción de PHA, sino que también debe considerar las condiciones prácticas de frontera que deben cumplirse durante la producción (Oliveira, 1998).

El objetivo de los sistemas de control es el de regular o rastrear una respuesta del sistema mediante el ajuste de su entrada sujeta a limitaciones físicas. Un sistema dinámico es un sistema causal, en el cual sus respuestas dependen de sus entradas previas y sus valores iniciales. El objetivo de un sistema de control es el de influenciar el comportamiento del sistema. El problema del control es el de determinar las entradas de control al proceso usando todos los datos disponibles.

Recientemente han surgido metodologías que sugieren al seguimiento en línea de procesos biológicos como la mejor herramienta encaminada hacia la optimización del proceso objetivo.

2.1.1 Seguimiento de procesos en línea

El seguimiento de procesos en línea es un enfoque orientado hacia la calidad final del producto obtenido así como la cantidad del mismo. Se refiere al diseño, análisis, y control del proceso mediante mediciones en tiempo real de atributos críticos de desempeño y calidad tanto de los materia prima como de los productos obtenidos; esto se hace con la finalidad de asegurar que el producto sea lo esperado, o que los parámetros de desempeño, como el rendimiento, puedan ser observados e ir modificando las variables que lo definen en tiempo real para su optimización.

Para llevar a cabo el seguimiento de procesos en línea se requieren herramientas que puedan dar medios efectivos y eficientes que permitan la adquisición de información para facilitar el entendimiento, desarrollo de estrategias de optimización, y mejora continua del proceso. Entre estas herramientas se pueden considerar:

- La adquisición multivariada de datos y herramientas de análisis
- Analizadores modernos de procesos o herramientas de química analítica
- Herramientas de control y monitoreo
- Herramientas de mejora continua y manejo de datos

Una combinación de una o varias herramientas pueden aplicarse a una sola operación o a todo un proceso. La forma de optimizar un proceso en términos de calidad del producto o maximización de rendimientos de un producto esperado, ya sea químico, físico, microbiológico o matemático; a través del seguimiento en línea es:

- Reduciendo los tiempos de ciclo utilizando controles de medición en línea, o combinación de en/fuera de línea;
- Previendo el uso de volúmenes mayores de materia prima de los realmente requeridos;
- Incrementando la automatización;
- Facilitando el procesado de materia prima y de datos continuo para mejorar la eficiencia, utilizar equipos de menores tamaños y mejorar el uso de materiales y energía.

2.12 PAT (Process Analytical Technology)

Recientemente se ha desarrollado la metodología llamada *Process Analytical Technology* (PAT) (Tecnología Analítica de Proceso), que, si bien es aplicada esencialmente en procesos de manufactura en la industria farmacéutica y alimenticia, presenta algunos aspectos relevantes para el seguimiento en línea de procesos. Esta metodología ha nacido en respuesta a la necesidad de control de calidad.

Un ejemplo de esta metodología es el uso de la espectroscopía en infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés: *Near Infrared Spectroscopy*) para la identificación de materia prima, análisis de uniformidad de mezcla y la uniformidad en medicamentos. Las ventajas de este método es que la NIRS es una técnica analítica no destructiva y permite el control de un lote completo de medicamentos (Paris et al, 2006).

PAT ha demostrado ser una metodología efectiva para la mejora de procesos industriales de alto costo, al permitir el seguimiento en línea de parámetros determinantes en la calidad final del producto final; ha permitido optimizar los procesos y bajar costos relacionados con el reproceso y rechazo de productos finales.

A pesar de que el PAT no es susceptible de ser aplicado comercialmente a los procesos de producción de PHA, ya que PAT requiere de equipo altamente costoso y técnicas de control muy avanzadas, el seguimiento en línea de la acumulación y degradación de los gránulos poliméricos permitiría obtener datos precisos y conocer el proceso mucho mejor, lo que al final se utilizaría para identificar los factores clave para la optimización de rendimientos de PHA, permitiendo un proceso de modelado inverso. Es decir, un modelado deductivo, donde se pudieran presuponer hipótesis sobre el proceso y verificar su validez durante el mismo, permitiendo cambiar variables y de este modo disminuir la cantidad de datos necesarios para un modelado tradicional.

Al ser un proceso poco entendido y con poco desarrollo de modelos, el seguimiento en línea del proceso acumulador y degradador de PHA representa una gran ventaja para mejorar el rendimiento del polímero y por lo tanto bajar costos de proceso, lo que eventualmente implica una mejora en la calidad del producto final. Obviamente los sistemas de control en línea requieren de sofisticadas técnicas de control y equipo de alto costo, que sólo puede ser justificado con la obtención de altos rendimientos del proceso.

Debido a que los procesos actuales de producción de PHA requieren bajar sus costos se han propuesto metodologías para lograr un seguimiento semi-en-línea del proceso, el cual es suficiente para mejorar el entendimiento del proceso, y por lo tanto optimizar el rendimiento y finalmente bajar costos y llevar hacia estrategias de control automático, mejora de características del producto y modelado generalizado.

El seguimiento en línea de procesos biológicos representa grandes ventajas sobre todo para aquellos donde las técnicas de cuantificación, detección o seguimiento de formación de componentes requieren de metodologías muy elaboradas, y por lo tanto el tiempo transcurrido entre el procesado de las muestras y la obtención de resultados es considerablemente largo. Esto no permite tomar decisiones inmediatas sobre las condiciones de proceso, lo cual hace que el diseño experimental se prolongue y por lo tanto el uso de materiales se incremente, y por lo tanto los costos también. Además, si las técnicas analíticas tradicionales requieren del uso de sustancias peligrosas para el medio ambiente en contraste con técnicas alternativas, la búsqueda de éstas es definitivamente una necesidad más que una ventaja.

2.13 FTIR y medición de PHA en línea

La aplicación de la espectroscopía vibratoria (FTIR, NIR) es una herramienta muy utilizada para procesos PAT. Se requiere un sistema (o conjunto de sistemas) lo suficientemente robusto para ser utilizado a través de un proceso, y que pueda tener como salida datos relevantes, rápidos y confiables, tanto en muestras dinámicas como estacionarias. Por estas razones la espectroscopía con infrarrojo ha recibido mucha atención recientemente.

Dadas las ventajas que representa poder seguir el proceso de acumulación y degradación de PHA en línea, es decir poder contar con determinación de porcentajes de acumulación de PHA rápidamente, y además obtener técnicas de cuantificación que no generen desechos peligrosos como es la cromatografía de gases para cuantificar PHA. Ésta, además, de tomar mucho tiempo para realizar y producir desechos peligrosos no permite la toma rápida de decisiones haciendo necesario extender mucho más los tiempos de experimentación y variación de condiciones para optimización del proceso.

Respecto a la espectroscopía con infrarrojo y su uso con los PHA se encuentran varios trabajos. Principalmente se ha utilizado para la caracterización del PHA obtenido. La fusión y cristalización de dos tipos de PHA se estudió con FTIR. El FTIR es sensible ante el ambiente molecular local; consecuentemente ha sido utilizado para revelar los cambios en la conformación de las macromoléculas durante la fusión y cristalización (Xu et al, 2002; Bayarı y Severcan, 2005).

En cuanto a la cuantificación de PHA utilizando FTIR en combinación con la técnica estadística de mínimos cuadrados parciales (PLS), se utilizó (Kansız et al, 2000) para el análisis cuantitativo del contenido de PHB, una cepa de *Escherichia coli* DH5a recombinante conteniendo el locus de PHA de *Acinetobacter sp.* en el plásmido pJKD1425. De modo que *E. coli* (pJKD1425) contiene todos los genes requeridos para la síntesis de PHB. Los espectros de varias muestras obtenidos en un espectrofotómetro ATR, en combinación con PLS y utilizando como valores de referencia datos obtenidos con cromatografía de gases (CG) de las mismas muestras, se utilizaron para obtener un modelo para predicción de datos de contenido de PHA en muestras nuevas sin tener que realizar la CG.

Al graficar las concentraciones obtenidas usando el modelo contra los valores

medidos con GC y realizar una regresión lineal de ambos datos se obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.998 (Figura 2-7), esto implica que la predicción del contenido de PHA en una muestra es altamente parecido al obtenido con cromatografía de gases y esto se refleja en el cálculo de un error estándar de predicción (SEP) que fue del 1.49%. En este estudio se vio que el uso de FTIR para cuantificar PHA puede ser una herramienta aplicable para dar un seguimiento en línea. Sin embargo, solo se realizó para cultivos puros, ya que la aplicación para cultivos mixtos resulta muy compleja por la cantidad de compuestos desconocidos presentes en una muestra de esta naturaleza.

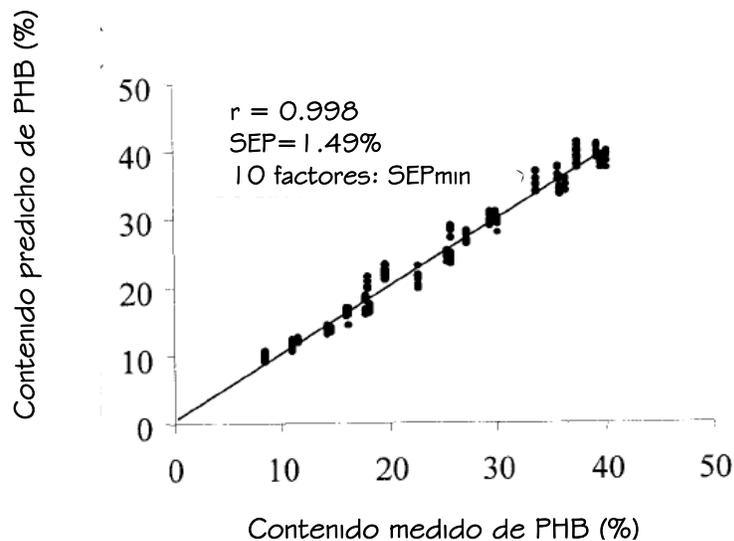


Figura 2-7 Gráfica de predicciones de concentración de PHB vs. el contenido determinado con CG (Lee et al, 1999).

En cuanto al seguimiento en línea del proceso, existe un único estudio como antecedente de Jarute et al (2004). Jarute y colaboradores desarrollaron un sistema (Figura 2-8) para seguir en línea con FTIR la acumulación de PHB y la toma de sustrato (glucosa) en un reactor fermentativo de 27 horas con cultivo de *E. coli*. Los espectros infrarrojo se tomaron en línea utilizando la celda de un espectrofotómetro de diamante de reflexión total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflection*) inmersa en el cultivo de fermentación mediante un sistema de control de flujo. Se utilizaron datos de CG para la calibración y PLS para obtener el modelo de predicción de nuevos datos.

El proceso realmente consiste en un proceso en semi-línea ya que el flujo de cultivo se dejaba pasar por la celda del FTIR y se dejaba sedimentar por 15 minutos antes de adquirir el espectro.

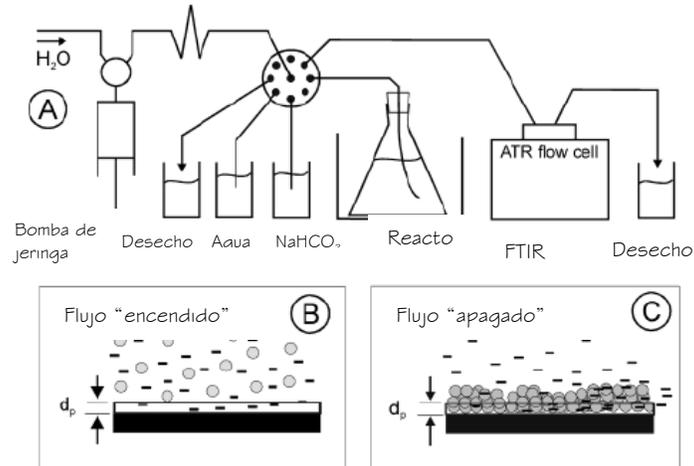


Figura 2–8 Sistema experimental de seguimiento en semi-línea de acumulación de PHB en *E. Coli*.
 (Jarute et al , 2004).

Estos antecedentes experimentales mostraron buenos resultados, pero se aplicaron únicamente para cuantificar PHB y en cultivos puros, donde la estructura y composición de los compuestos se conoce. Sin embargo al compararse con la CG, esta técnica requiere de mucho menos tiempo de proceso y no produce desechos peligrosos.

Además, la espectroscopía con infrarrojo se ha utilizado en otras aplicaciones como la determinación y monitoreo del grado de cristalinidad de los polihidroxialcanoatos en cultivos puros. Debido a su origen biológico, los PHA son altamente estereoregulares, lo que les permite cristalizar fácilmente. Su estado en las células vivas se ha discutido mucho. De acuerdo a Xu et al (2002), los cambios más evidentes en espectros tomados a un copolímero PHB-co-14%PHV se encontraron en la banda carbonilo $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$, se notaron cambios tanto en el intensidad como en la posición de la banda. La banda de carbonilo cambia de una banda relativamente amplia centrada en 1738 cm^{-1} a una ligeramente más fuerte y mucho más pronunciada en 1722 cm^{-1} ; estas bandas son asignadas a dos distintas fases de PHA, la amorfa y la cristalina respectivamente. Otras diferencias espectrales entre la fase cristalina y la amorfa son las bandas en $\sim 1186\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1133\text{ cm}^{-1}$ (Xu et al, 2002).

3 Desarrollo experimental

3.1 Introducción

El desarrollo experimental consistió de cuatro etapas. La primera etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) del Instituto de Ingeniería (II) de la UNAM. Consistió en el montaje de un reactor de enriquecimiento selectivo con cultivos mixtos, donde se realizaron pruebas exploratorias para determinar si los cultivos mixtos producen PHA con el régimen seleccionado, así como se observó la aclimatación y se vio el desarrollo del reactor a través de varios ciclos. Durante esta etapa se logró detectar presencia de PHB en los cultivos mixtos estudiados cualitativamente, las técnicas estándares se pusieron en marcha así como las primeras pruebas con cromatografía de gases.

La segunda y tercera etapas fueron realizadas en el Advanced Water Management Centre (AWMC) de la Universidad de Queensland (UQ) en Brisbane, Australia a través de una estancia de investigación de 6 meses. La segunda etapa consistió en la investigación del sistema de producción de PHA con agua residual como sustrato que se tiene en el AWMC. En esta etapa se realizaron estudios de ciclo en el reactor de enriquecimiento selectivo y estudios de pruebas por lote de acumulación de PHA. La tercera etapa experimental consistió en la investigación de la posibilidad de utilizar la espectroscopía con infrarrojo en conjunto con la técnica estadística de mínimos cuadrados parciales (PLS, Partial Least Squares; por sus siglas en inglés) para realizar una cuantificación rápida del contenido de PHA en las células. Esta etapa resultó en una innovación como técnica de cuantificación de PHA en cultivos mixtos ya que presenta la posibilidad del seguimiento en línea de la acumulación y degradación de PHA intracelular.

La última etapa se realizó en la UNAM, en el LIPATA. Consistió en realizar pruebas similares a las hechas en el AWMC de la UQ, para ajustar parámetros de los ciclos SBR y pruebas de acumulación por lote. Únicamente se siguieron perfiles de OD variando algunas condiciones para ver qué efectos podrían tener sobre la acumulación de PHA. Esto se realizó controlando la aireación en función del valor de OD. También se puso en marcha la técnica de cromatografía de gases. Se ajustaron valores de concentración de alimentación y otros parámetros para evitar la inestabilidad en el reactor observada durante la primera etapa.

Nota Aclaratoria

El sistema de producción de polihidroxicanoatos en el Advanced Water Management Centre de la Universidad de Queensland (AWMC) es un proyecto de tesis doctoral llevado a cabo por Nicholas Gurieff bajo la tutoría del Dr. Paul Lant (Gurieff y Lant, 2007; Gurieff, *en prensa*). El sistema de producción utilizado está basado en el sistema propuesto por Serafim y colaboradores (2004). La experimentación realizada en el sistema se realizó para conocer el proceso, realizar estudios de ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo, realizar pruebas de acumulación por lote del PHA, adquirir experiencia en la técnica de cromatografía de gases para cuantificación de PHA, y conocer el sistema de control aplicado a los sistemas ajustando la experimentación a un esquema de trabajo ya establecida. El sistema está funcionando desde septiembre de 2005, por lo que ningún montaje fue necesario. Los datos aquí presentados se reportan como resultado de la experimentación personal sobre un sistema de un centro de investigación (AWMC) distinto al centro de trabajo en México (LIPATA), el cual, tiene el mismo principio de funcionamiento que el sistema propuesto en LIPATA-UNAM pero utiliza agua residual real y no sintética.

Los resultados de la segunda etapa sirvieron como antecedente para el trabajo original experimental de la tercera etapa que se realizó en el AWMC en cooperación con el BPA y del cual se obtuvo un artículo científico.

3.2 Fase I

Los objetivos de esta fase, como se ha mencionado anteriormente, son el de diseñar y estudiar un sistema integral de producción significativa de polihidroxicanoatos (PHA) y tratamiento de aguas residuales con lodos activados para obtener cultivos capaces de acumular polihidroxicanoatos (PHA) mediante la estrategia de enriquecimiento selectivo.

Un sistema de producción integral de PHA y degradación de aguas residuales se diseñó de acuerdo a Dionisi y colaboradores (2004) con ligeras modificaciones tomadas de Serafim y colaboradores (2004). Se esquematiza en la figura 3-1.

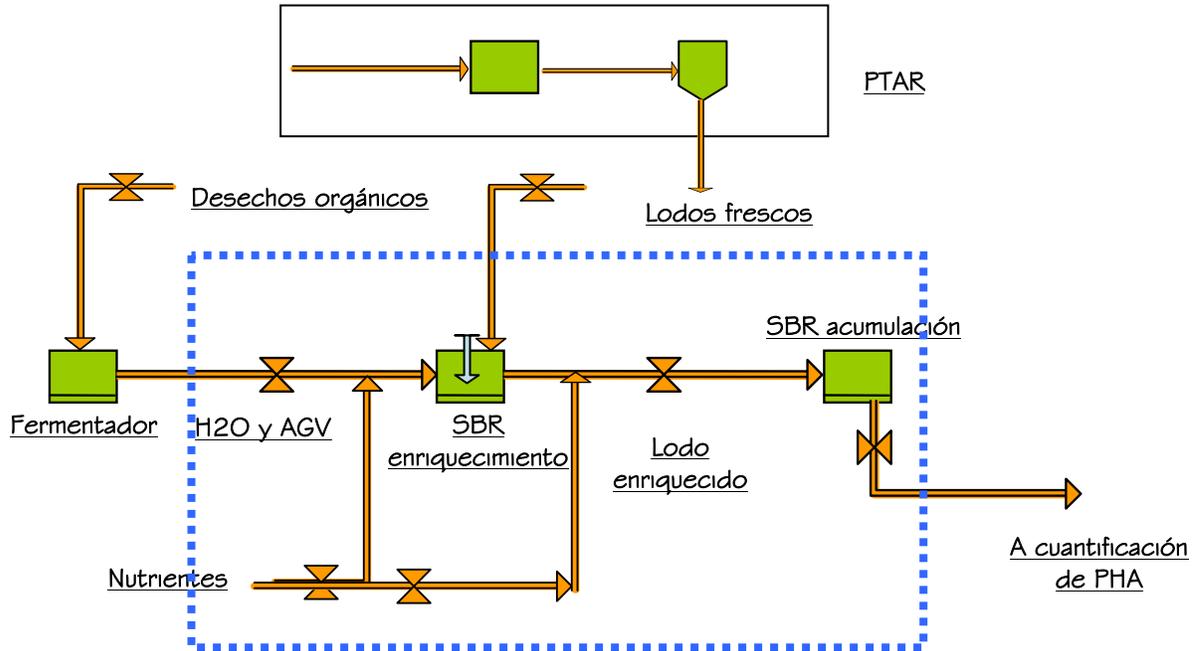


Figura 3-1 Diseño experimental propuesto (UNAM)

El sistema propuesto es similar al descrito por Dionisi y colaboradores (2004). Los desechos orgánicos son sometidos a una etapa anaerobia donde se lleva a cabo una fermentación acidogénica, dando como resultado un efluente rico en AGV's (Dionisi et al, 2004). El efluente de esta fermentación es utilizado como influente de un reactor de enriquecimiento selectivo donde se busca obtener la comunidad bacteriana capaz de almacenar PHA. El reactor de enriquecimiento selectivo es un SBR aerobio con condiciones dinámicas de aporte de sustrato para fomentar la selección; en cada ciclo cierta cantidad de licor mezclado de este reactor se retira y se transfiere a un reactor SBR con ciclos fed-batch o alimentación por lote para acumulación de PHA. En este reactor la biomasa enriquecida se somete a aportes de sustrato con alta concentración de AGV para fomentar la saturación de la célula de PHA; al final de ciclo el licor mezclado es retirado para extracción y cuantificación del PHA, así como para su caracterización. El reactor de enriquecimiento selectivo es parcialmente reinoculado cada ciclo cuando se retira biomasa enriquecida para mantener la concentración de lodos y crear un sistema de producción continuo.

Un reactor de 4 litros de volumen de trabajo fue utilizado para el cultivo de lodo activado bajo condiciones dinámicas de alimentación (Dionisi et al, 2004). El SBR fue inoculado con lodo activado proveniente de la recirculación de lodos del tanque de sedimentación al tanque de lodos activados, de la planta de tratamiento de agua residual de Ciudad Universitaria, UNAM. Un ciclo SBR consistió, en esta primera etapa experimental, de 10 minutos de llenado con influente, 98 minutos de reacción con aeración y agitación, tiempo de vaciado del licor mezclado durante 2 minutos, tiempo de sedimentación de 10 minutos, y tiempo de vaciado de efluente de 2 minutos. A diferencia del reactor de Dionisi y colaboradores (2004) se permitió un tiempo de sedimentación de 10 minutos.

La aireación del reactor se logra mediante un controlador de flujo másico y un difusor es colocado en uno de los puertos de entrada del reactor (1 vvm). La agitación se mantuvo en 300 rpm mediante un eje con dos propelas de forma de hélice.

La alimentación del reactor fue preparada sintéticamente simulando la composición de un agua residual rica en AGV's. El SBR es alimentado con una mezcla de ácido acético, láctico y propiónico con concentraciones en conjunto de 8.5 gDQO L⁻¹ (Dionisi et al, 2004). Los porcentajes relativos de cada ácido fueron 40%, 40% y 20%, respectivamente en base DQO. La mezcla de ácidos grasos se disuelve en un medio mineral con la siguiente composición: 255 mg L⁻¹ KH₂PO₄, 326 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 754 mg L⁻¹ Na₂HPO₄·7H₂O, 75 mg L⁻¹ NH₄Cl; 104 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 54 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 1.75 mg L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, MnCl₂·4H₂O, H₃BO₄, ZnCl₂, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, EDTA, FeCl₃·6H₂O.

Los ciclos SBR se caracterizaron por la medición de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) al inicio y final de cada ciclo, así como medición de pH durante todo el ciclo. La detección cualitativa de presencia de PHB fue realizada de acuerdo a Ostle y Holt (1982) con tinciones de azul de Nilo A, en diferentes ciclos del reactor para comprobar la producción de PHB.

Al principio de la experimentación se retiró un volumen de 0.3 L de licor mezclado antes de la sedimentación y un volumen de intercambio de efluente de 0.7 L. Como no se reemplazaba la biomasa se comenzó a reinocular el reactor con 0.3 L de lodo nuevo después de retirar el licor mezclado, y esto se hacía una vez por semana. Un perfil de SST y SSV se siguió así como tinciones con azul de Nilo A.

3.3 Fase II

El objetivo general del proyecto en el AWMC es desarrollar un proceso sustentable (técnica, económica y ambientalmente viable) de producción de polihidroxiclcanoatos utilizando agua residual municipal e industrial de distintos orígenes. A través del uso de herramientas de análisis de ciclo de vida, tanto la sustentabilidad económica como ambiental de un proceso de esta naturaleza puede ser medida y comparada con otras tecnologías de producción de polímeros y de tratamiento de agua residual. Mediante el uso de hallazgos e innovaciones recientes en el campo del tratamiento de agua residual, la experimentación se lleva a cabo con miras hacia la optimización de sistemas de producción de PHA con cultivos mixtos, desde el enriquecimiento de cultivos hasta la acumulación del producto. Mediante el entendimiento más profundo de este proceso dinámico de producción, el objetivo es desarrollar técnicas de proceso y biotecnológicas que puedan permitir llevar a cabo el control de la síntesis del producto polimérico final buscando obtener ganancias monetarias a través de la producción de PHA como productos de valor agregado obtenidos durante el proceso de tratamiento de agua residual. La producción sustentable a gran escala de PHA biodegradables utilizando desechos orgánicos puede proporcionar múltiples beneficios al medio ambiente, a la industria y al desarrollo sustentable de la sociedad en un futuro (Gurieff, *en prensa*).

Los objetivos globales del proyecto del AWMC (Gurieff, *en prensa*).

- Identificar las condiciones óptimas (temperatura, pH, C/N) y parámetros clave de crecimiento (p.e. tasa de crecimiento) para la producción de PHA.
- Optimizar la configuración del proceso (ciclos anaerobios, aerobios y aerofilicos) así como las condiciones de operación (TRC y tasa de dilución/alimentación) para maximizar la acumulación de PHA.
- Probar la influencia de la composición de la alimentación (p.e. concentración de AGV) sobre la composición de los PHA (en términos de las concentraciones de los componentes PHB/PHV).

El montaje de reactores no se llevó a cabo, pues el sistema ya se encontraba en operación antes de iniciar la experimentación. La descripción de los componentes de los sistemas y su funcionamiento se presentan sin detallar a continuación.

Cultivos bacterianos

Cultivos bacterianos de una planta de tratamiento avanzado de agua residual del Condado de Brisbane, Queensland se utilizan. El inóculo fue expuesto a dos sistemas experimentales de producción de polihidroxicanoatos:

- **Sistema RW:** SBR de enriquecimiento Selectivo – Reactor SBR de acumulación por lote. Utiliza como sustrato agua residual de una planta enlatadora de jugos y conservas de frutas local basado en el sistema de Serafim y colaboradores (2004).
- **Sistema PW:** Sistema de Prefermentados – SBR de Enriquecimiento Selectivo – Reactor SBR de acumulación por lote. Utiliza como sustrato de los prefermentados lodos primarios de una planta de tratamiento residual y utiliza su efluente como sustrato del reactor de enriquecimiento selectivo (Gurieff, *en prensa*).

Sistema RW

La técnica de producción usada se basa en la combinación de dos fases; la fase de enriquecimiento y la de acumulación. La meta de la fase de enriquecimiento es la de aplicar presión de crecimiento sobre los cultivos mixtos de modo que esto favorezca a la población de microbios con propiedades deseables – en este caso la acumulación de PHA (Serafim et al, 2004; Dionisi et al, 2004). Esta fase es seguida de otra de acumulación donde la biomasa enriquecida es expuesta a un exceso de carbono lo cual dispara la acumulación de PHA a niveles que, en ocasiones, es mayor de 50% del peso seco celular (PSC).

El inóculo fue expuesto en el reactor de enriquecimiento, que es similar al propuesto por Serafim y colaboradores (2004). El SBR tiene un volumen de trabajo de 4 L, un TRC de 4 días y un TRH de 1 día. El ciclo de ayuno/abundancia fue de 6 horas (5 minutos de alimentación con aeración, 335 minutos de aireación, 15 minutos de sedimentación, 5 minutos de decantación). La tasa de carga orgánica en términos de DQO soluble fue de 2000 mgDQO L⁻¹ d⁻¹. El volumen de intercambio es de 0.25 L ciclo⁻¹ de licor mezclado, lo cual implica que se retira 1 L de licor mezclado del reactor al día. Éste es utilizado para las pruebas de acumulación por lote de PHA.

La fuente de carbono fue agua residual prefermentada de una enlatadora de un fabricante local. Al determinar el DQO soluble del agua residual se determinó

que la composición promedio del influente es de 80% de ácidos grasos volátiles (AGV's) y 20% de azúcares. Además se agrega una mezcla de nutrientes para evitar el decaimiento de la biomasa presente, el medio mineral con nutrientes está formado por 13.96 g de NH_4Cl , 3.49 g de K_2HPO_4 y 2.71 g de KH_2PO_4 disueltos en 500 ml de H_2O , y esta mezcla de nutrientes es alimentada a una tasa de $0.05 \text{ L ciclo}^{-1}$.

En cada ciclo SBR un volumen definido de licor mezclado era retirado para las pruebas de acumulación por lote de tal forma que, al final del día, después de 4 ciclos SBR un volumen total de 1 L de licor mezclado se obtenía para las pruebas por lote. La aireación se mantuvo mediante aireadores cerámicos espirales en el interior del reactor con una tasa de 1.0 vvm, con lo cual se mantenía el oxígeno disuelto (OD) cerca del 80% del valor de saturación. El control de las etapas del ciclo se realiza con un PLC (controlador lógico programable) y una PC acoplada con un programa que permite controlar el inicio, fin y duración de las etapas del reactor. El reactor también tuvo agitación con un agitador magnético. No se llevó a cabo ningún control de pH durante la operación y se mantuvo a temperatura ambiente sin control de la misma.

Para alcanzar los máximos niveles de acumulación intracelular, las bacterias enriquecidas fueron expuestas a una prueba de acumulación con alimentación por lote de 8 horas con control de OD. Durante estos experimentos por lote con aireación constante (1 vvm), un punto de referencia máximo de OD de 4.2 mg L^{-1} fue establecido, y cuando el OD alcanzaba este punto una acción de dosificación de carbono se activaba.

La dosis de carbono fue de 2 mL por pulso y en ocasiones se variaba en función de la respuesta observada de los microorganismos. En estos experimentos, una mezcla sintética de AGVs fue utilizada (25 g-DQO L^{-1} ; 80% ácido acético, 20% ácido propiónico). Un muestreo regular de la biomasa se realizó durante la acumulación tanto para análisis con CG como para análisis con FTIR. Un esquema de este sistema se muestra en la figura 3-2.

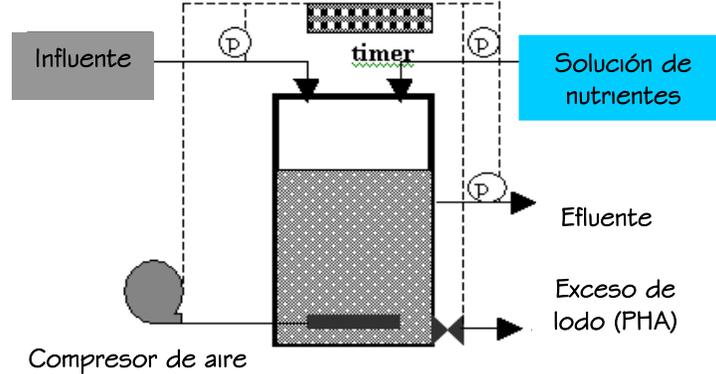


Figura 3-2 Esquema del SBR productor de PHA con lodos activados

Sistema PW

El esquema de este proceso anaerobio-aerobio de dos pasos se muestra en la figura 3-3. A grandes rasgos el sistema está compuesto de tres reactores: dos para la acidogénesis de los desechos orgánicos y otro para la síntesis del PHA. Los reactores anaerobios o prefermentadores llevan a cabo el cultivo de bacterias acidogénicas sobre el agua residual. El efluente acidificado de los prefermentadores es utilizado para la producción de PHA en el reactor aerobio cuyo funcionamiento es similar al de enriquecimiento selectivo del sistema RW. Este proceso es operado de modo continuo. Los dos tipos de bacterias involucradas, las acidogénicas y las sintetizadoras de polímero, tienen desempeños muy distintos por lo que el control del sistema es complicado. Esto es especialmente importante cuando la producción de PHA es combinada con el tratamiento de efluentes altos en DBO, de los cuales los ácidos orgánicos son liberados rápidamente.

Este proceso aún se encuentra en etapa de estabilización, por lo que todavía no se cuenta con estudios detallados del mismo. No se realizan estudios de ciclo como en el sistema PW y el seguimiento no es tan frecuente como en el primer reactor; esto hasta marzo de 2007.

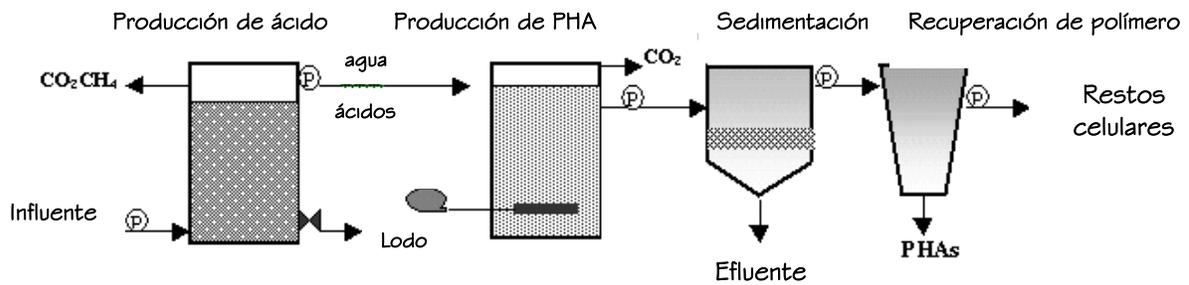


Figura 3–3 Esquema de la producción de PHA en un sistema de lodos activados anaerobio-aerobio

Reactor SBR de acumulación por lote

Se realizaron pruebas de acumulación por lote con control de oxígeno disuelto con un punto de referencia de 4.2 mg L^{-1} como se ha descrito antes. Durante las pruebas por lote se agregaba el sustrato en pulsos, lo cual ha demostrado ser la mejor estrategia para fomentar la maximización de acumulación de PHA de acuerdo a Serafim y colaboradores (2004). La curva de oxígeno disuelto se sigue durante todo el ciclo y cuando baja del punto de referencia seleccionado, el software de control lo detecta y envía otro pulso de alimentación. Cada vez, el pulso de una mezcla de AGVs sintética era agotado por la biomasa presente en el reactor. Tras cada adición de sustrato se alcanzan bajos valores de oxígeno disuelto, lo que representa consumo de oxígeno para acumulación de PHA. Al ir acumulando el PHA se observa un incremento en valores de oxígeno disuelto. El punto final de la reacción se determinó cuando al agregar un pulso de alimentación no se registraba una disminución de los valores de OD, lo cual se tomó como indicación de una saturación intracelular de PHA.

La concentración de alimentación es de 25 gDQO L^{-1} , ya que se debe someter a la biomasa a altos valores de concentración de AGVs para obtener una máxima acumulación. Esto se debe a que durante los estudios de ciclo se observó que la acumulación de PHA aumenta al aumentar la concentración de AGVs y el tiempo de toma de sustrato es aproximadamente constante.

3.4 Fase III

Esta fase fue realizada utilizando como antecedentes los resultados y observaciones de las fases anteriores. En este trabajo se estudia la cuantificación de PHA (PHB+PHB) intracelular en células intactas a través del uso de la espectroscopía con infrarrojo y análisis estadístico, demostrándose que esta combinación puede ser utilizada para desarrollar una alternativa robusta y exacta a métodos convencionales utilizados para cuantificación de PHA en cultivos mixtos.

Cultivos Celulares

La acumulación de PHA fue estudiada en cultivos mixtos obtenidos del sistema PW antes descrito; se utilizaron cultivos tanto del SBR de enriquecimiento selectivo como del SBR de acumulación por lote. Particularmente se prefirieron muestras del reactor SBR de acumulación por lotes donde se siguió un muestreo regular de la biomasa durante la acumulación tanto para análisis con CG como para análisis con FTIR.

Adquisición de los espectros FTIR

Los espectros FTIR fueron obtenidos con un espectrofotómetro Nicolet 6700 acoplado a una PC con el software OMNIC para análisis de espectros. Los espectros de absorbancia fueron colectados a una longitud de onda entre 4000cm^{-1} y 400cm^{-1} , con una resolución espectral de 4cm^{-1} . Se colectaron 32 escaneos por cada espectro y se obtuvieron 5 ó 6 espectros por muestra. Una corrección de línea base automática se realizó utilizando el software OMNIC en todos los espectros para evitar errores debidos a cambios en las líneas base. Aún más, las bandas de CO_2 fueron excluidas. Cada vez, la densidad de muestra fue cambiada para pre-filtrar el efecto en el modelo debido a las diferencias en el grosor de la muestra.

3.5 Fase IV

La fase IV se realizó en la UNAM en el LIPATA. Después de la estancia en Australia se retomó la experimentación en la UNAM. De los antecedentes de la Fase I y la Fase II y III se realizaron modificaciones en la configuración original del sistema propuesto en cuanto a la duración de ciclos y composición de la alimentación.

Un reactor de 4 litros de volumen de trabajo fue utilizado para cultivo de lodo activado bajo condiciones dinámicas de alimentación (Serafim et al, 2004; Gurieff, *en prensa*). El SBR fue inoculado con lodo activado proveniente de la recirculación de lodos del tanque de sedimentación al tanque de lodos activados, de la planta de tratamiento de agua residual de Ciudad Universitaria. Un ciclo SBR consistió de ciclos de 6 horas de acuerdo a Gurieff (*en prensa*). La aeración del reactor se logra mediante un controlador de flujo másico y un difusor es colocado en uno de los puertos de entrada del reactor. La agitación se mantiene en 300 rpm.

La alimentación del reactor fue preparada sintéticamente simulando la composición de un agua residual rica en AGV's. El SBR es alimentado con una mezcla de ácido acético y propiónico con concentraciones de 3gDQO L⁻¹. La mezcla de ácidos grasos se disuelve en un medio mineral con la siguiente composición 255 mg L⁻¹ KH₂PO₄, 326 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 754 mg L⁻¹ Na₂HPO₄·7H₂O, 75 mg L⁻¹ NH₄Cl; 104 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 54 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 1.75 mg L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, MnCl₂·4H₂O, H₃BO₄, ZnCl₂, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, EDTA, FeCl₃·6H₂O.

Los ciclos SBR se caracterizaron por la medición en línea del OD y pH. Determinaciones de SST, SSV, DQOs, DQOt, AGVs y PHA se llevaron a cabo en ciclos seleccionados. Se realizaron tinciones con negro de Sudán B de acuerdo a Burdon (1946) en muestras seleccionadas. Se retiraron 250 mL de licor mezclado antes de iniciar la sedimentación, para que al final del día se tuviera 1 L de licor mezclado para las pruebas de acumulación por lote. Se retira 1 L de efluente después de sedimentación y se reemplaza con medio nuevo.

Se realizaron pruebas de control de volumen de aireación en el reactor en función del OD para determinar el efecto que pudiera tener sobre la acumulación de PHA. Se siguió el perfil de OD en el reactor y el pH, cuando el valor de OD rebasaba un valor de referencia dado, la aireación se apagaba. Al llegar a un valor mínimo definido se volvía a encender. Se realizaron estudios de ciclos exploratorios de acuerdo a la experimentación de la Fase II y III. El OD y el pH se registraban mediante un programa desarrollado en LabView®.

Reactor de acumulación por lote

Pruebas por lote con lodos provenientes del reactor de enriquecimiento selectivo servían de inóculo para el reactor por lote cuyas características son de acuerdo a Serafim y colaboradores (2004). Se utilizó como punto de referencia del OD un valor de 4.2 mg L⁻¹ para agregar el siguiente pulso de alimentación. Los pulsos fueron variables hasta alcanzar la saturación de PHA intracelular acumulado, cuando se paraba la reacción. Las pruebas por lote realizadas tuvieron por objetivo determinar si la acumulación de PHA era mayor que en el reactor de enriquecimiento selectivo y probar tamaños de pulso de alimentación adecuados. La duración de los ciclos por lote se realizó durante 8 horas y se aplicaron pulsos de alimentación de distinto tamaño. La composición de la alimentación fue una mezcla de ácido acético y ácido propiónico en concentración global de 25 gDQO L⁻¹ que se adicionaban a parte de una mezcla de nutrientes.

En estos estudios se siguió el perfil de SSV, SST, AGVs y PHA, así como el registro de curvas de OD y pH durante todo el experimento.

Tinciones y cromatografía de gases

Se montó adecuadamente la técnica de cromatografía de gases el LIPATA de acuerdo a lo experimentado en la Fase II y Fase III, así como tinciones con negro de Sudán. La técnica se realizó de acuerdo a Braunegg y colaboradores (1979) con modificaciones propuestas por Oehemen y colaboradores (2004) y de Gurieff (*en prensa*). La metodología utilizada se detalla en el apartado 4.3.

4 Métodos Analíticos

En este capítulo se especifican las técnicas analíticas empleadas durante el desarrollo experimental de la tesis. Las técnicas analíticas estándar fueron las mismas en todas las pruebas con reactores tanto en el LIPATA como en el AWMC, así como también las tinciones. Por otra parte la cuantificación de PHA con cromatografía de gases tuvo diferencias entre ambos centros. Durante este capítulo se hace énfasis en la explicación de la técnica de FTIR con PLS que se propone para cuantificar el contenido de PHA en cultivos mixtos, ya que es la aportación principal de este trabajo.

4.1. Técnicas analíticas estándar

Sólidos Suspendidos Totales y Volátiles

Para determinar los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en todos los reactores se empleó el método estándar gravimétrico (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992). Se utilizaron muestras de 5 mL y filtros de 2.0 μm de tamaño de poro.

Demanda Química de Oxígeno (Soluble y Total)

Muestras de 3 mL de licor mezclado fueron tomadas de los reactores para la determinación de DQO total (DQOt). Muestras de 8 mL de licor mezclado se tomaron para determinar la DQO soluble (DQOs). Esta muestra se deja sedimentar para separar la biomasa del sobrenadante; el sobrenadante se pasa por filtros de 0.25 μm de espesor de poro y de este filtrado se toman 3 mL para la reacción de DQO. Las muestras se agregan a tubos de DQO y se dejan digerir durante 2 horas a 148°C. Para la DQO total se hicieron diluciones 1:30 del licor mezclado (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992).

Ácidos Grasos Volátiles

Para seguir el perfil de ácidos grasos volátiles, que son los que reflejan mejor la acumulación de PHA, se utiliza 1 mL de sobrenadante filtrado y mezclado con 100 μl de ácido fórmico al 7% w/v para conservación de la muestra, y se analizan por cromatografía de gases (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992). Por medio de una curva de calibración con estándares se realiza la cuantificación. Se determinaron los ácidos: acético, propiónico, valérico, iso-valérico, butírico, iso-butírico y hexanóico.

4.2. Tinciones

El uso de colorantes para detección cualitativa de diversos compuestos en cultivos celulares es un método muy utilizado. Dos colorantes específicos, para PHB el azul de Nilo A y para PHA el negro de Sudán B, se utilizaron como técnicas cualitativas para detectar la producción de PHA en los cultivos mixtos, y como técnicas auxiliares en los procesos seguidos.

Tinciones con Azul de Nilo A

El azul de Nilo A (sulfato de azul de Nilo, Azul Básico 12) es un polvo de oxazina básica que es soluble en agua y alcohol etílico. Una solución 1% de azul de Nilo A se prepara filtrándola antes de ser usada; después de obtener el preparado de colorante se hacen tinciones de muestras de células que presumiblemente contienen PHB se dejan en el horno a 55°C por diez minutos, posteriormente se hacen enjuagues para retirar el exceso de colorante, con agua destilada y con soluciones acuosa de ácido acético al 8%.

La muestra teñida se seca y se pone al microscopio de fluorescencia agregando aceite de inmersión. Se ha visto que los gránulos de PHB muestran una fuerte fluorescencia naranja al ser teñidos con azul de Nilo A, a una longitud de onda de 460 nm. Este es un colorante específico de PHB, a diferencia del Negro de Sudán B. (Ostle y Holt, 1982).

Las observaciones se hicieron en un microscopio Nikon con un aditamento de fluorescencia episcópico.

Tinciones con Negro de Sudán B

El colorante negro de Sudán B ($C_{26}H_{24}N_4O$) es un lisocromo (tinte soluble en lípido) que es usado para la tinción de triglicéridos neutrales y lípidos. Cuando se aplica a células tiñe los gránulos de PHA presentes en la célula. La safranina es un colorante biológico rosa usado en histología y citología. La safranina es usada como un tinte de contraste para la coloración de células, ya que tiñe las paredes celulares de rosa dejando cualquier otro compuesto sin teñir. Burdon (1946) investigó la tinción de bacterias con negro de Sudán B y safranina para detectar presencia de PHB en ellas. Los gránulos de PHA se tiñen de negro y las paredes celulares de rosa, así se puede detectar la presencia de este compuesto al ser visto al microscopio óptico.

4.3. Cromatografía de gases

La técnica más utilizada para la cuantificación de PHA dentro de las bacterias es reportada por diferentes autores y consiste en un análisis de muestras por medio de la cromatografía de gases (Braunegg et al, 1979). El método de extracción involucra la hidrólisis del polímero y la conversión de la fracción monomérica a un metil-éster. Una solución acidificada de alcohol (como ácido sulfúrico o metanol) se agrega a la muestra, la cual posteriormente es digerida a 100°C, enfriada y mezclada con agua para lograr la separación. Este método se caracteriza por las grandes cantidades de solvente que se necesitan y porque requiere de mucho tiempo para realizarla. La técnica desarrollada por Braunegg y colaboradores (1979) requiere de la liofilización de la muestra antes de la digestión.

Los PHA fueron determinados de acuerdo a Braunegg y colaboradores (1979) con modificaciones propuestas por Oehmen y colaboradores (2004) y por GuriEFF (*en prensa*).

La modificación de GuriEFF (*en prensa*) es importante ya que ahorra tiempo a la técnica de CG, en lugar de realizar la liofilización de la muestra (que implica un tiempo aproximado de 20 Horas), se observó que se obtienen los mismos resultados si solamente se deja secar al horno a 120°C durante una noche anterior a la digestión de la muestra.

Por otro lado Oehmen y colaboradores (2004) concluyen que la extracción de PHB y PHV al utilizar varias concentraciones de ácido sulfúrico en la mezcla de metanol acidificado influye claramente a la extracción de PHB, las pruebas demostraron que con una concentración de 3% de ácido sulfúrico se obtiene la extracción óptima del PHB, mientras que 10% de ácido sulfúrico con un tiempo de digestión de 20 horas mostró tener la mejor extracción del copolímero PH2MV.

En este mismo estudio, la extracción de PHB y PHV no demostraron variar en función del tiempo de digestión de las muestras. Por ello se recomienda el uso de 3% de ácido sulfúrico en la mezcla de metanol acidificado y tiempos de digestión de entre 2-20 horas para la extracción óptima de PHB y PHV. Se utiliza benzoato de sodio como estándar interno. El estándar interno sirve para evitar errores de inyección. De aquí se determinó utilizar 3% de H₂SO₄ en el metanol acidificado y un tiempo de digestión de 20 horas.

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 la muestra durante 5 minutos a 5000 rpm y se retira el sobrenadante. La muestra se deja secar una noche en el horno a 120°C para evaporar toda el agua (Gurieff, *en prensa*).

Cuando se seca la biomasa 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 milliQ para lograr la separación de fases; se agitan en un aparato vortex durante 1 minuto 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 fase separada se coloca en viales que contienen 2 *pellets* de absorción de agua cada uno; esto se hace para retirar el exceso de agua en la muestra que puede interferir con la lectura del cromatógrafo. La muestra se pasa por un cromatógrafo de gases.

Para la cromatografía de gases (AWMC) se utiliza una curva de calibración con 4 estándares que se encuentren en un intervalo adecuado que cubra las concentraciones esperadas de PHA. Se utilizó un copolímero de ácido R-3-hidroxitbutírico (3HB) y ácido R-3-hidroxitvalérico (3HV) en proporción 7:3 (Fluka, Melbourne, Victoria, Australia) para la preparación de estándares.

En el LIPATA se utilizaron dos estándares: uno de polímero de ácido R-3-hidroxitbutírico (3HB) puro y un copolímero de ácido R-3-hidroxitbutírico (3HB) y ácido R-3-hidroxitvalérico (3HV) en proporción 8:2 (Sigma Aldrich).

Tres microlitros de la muestra fueron analizados con un cromatógrafo Perkin-Elmer (Australia) y un Agilent Technologies 6890N (México). Ambos cromatógrafos fueron operados con una columna DB-5 (30 m de largo x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m de película), un radio de inyección con separación de 1:15 y helio como gas de arrastre (1.5 mL/min). Una 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 establecida a 80°C y durante 1 min, se incremento a razón de 10°C/min hasta llegar a 120°C, y después hasta 270°C a razón de 45°C/min y se mantiene por 3 minutos.

El sistema GC-MS (cromatógrafo de gases-espectrofotómetro de masas) tenía acoplado un espectrómetro de masas Shimadzu GC-MS-QP5050 y un automuestreador AOC-1400 (Australia), mientras que en el LIPATA no se utilizó un espectrómetro de masas y únicamente se utilizaron curvas de calibración con regresiones lineales para la determinación del contenido de PHA. Para la identificación de los compuestos se utilizó la base de datos NIST02 (National Institute of Standards and Technology) (Australia). En el LIPATA se utilizaron estos resultados de búsqueda de bases de datos para determinar si los picos obtenidos correspondían a los compuestos de interés.

4.4. Estudios de ciclo y pruebas de acumulación por lotes

En el sistema del AWMC, se realizaron estudios de ciclo una vez por semana, al menos. Los estudios de ciclo se caracterizaron por la medición en línea y registro del valor de pH y oxígeno disuelto (OD) durante todo el ciclo con muestreos aproximadamente cada 50 segundos. Los parámetros determinados durante el ciclo fueron DQOs (DQO soluble), DQOt (DQO total), AGV (ácido acético, ácido propiónico, ácido iso-butírico, ácido iso-valérico, ácido valérico y ácido hexanóico); PHA (PHB y PHV), sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendido volátiles (SSV). Los intervalos de muestreo fueron definidos al realizar experimentación previa que sugirió que la acumulación de PHA se encuentra en las primeras tres horas del ciclo, siendo máxima durante la primera hora, por lo cual en la primera hora la frecuencia de muestreo es de cada 0.25 horas. Durante las siguientes dos horas se toman muestras a intervalos de 0.5 horas y finalmente cada hora durante el período de tiempo que es considerado como el tiempo donde se consume el PHA acumulado como sustrato. Esto se resume en la tabla 4-1.

Tabla 4-1 Intervalos de muestreo

#Muestra	Estudio de Ciclo	Prueba Batch
	t muestreo	t muestreo
	horas	horas
1	0	0
2	0.25	0.5
3	0.5	1
4	0.75	1.5
5	1	2
6	1.5	2.5
7	2	3
8	2.5	4
9	3	5
10	4	6
11	5	7
12	6	8

El peso seco celular se determinó utilizando la técnica de SSV de acuerdo a métodos estándar (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1992). La determinación de DQO soluble y total se lleva a cabo con el sobrenadante de la muestra que se filtra y se siguen métodos estándar para determinarlos, se agregan los reactivos a 3 mL de muestra y se digieren durante 2 horas a 148°C. Para la DQO total se hace una dilución de 30 veces de la biomasa. Para seguir el perfil de ácidos grasos volátiles, que son los que reflejan mejor la acumulación de PHA, se utiliza 1 mL de sobrenadante filtrado y mezclado con 100 μL de ácido fórmico al 7% w/v para conservación de la muestra y se pasan por cromatografía de gases. Los PHA fueron determinados de acuerdo a Braunegg y colaboradores (1979) con modificaciones propuestas por Oehmen y colaboradores (2004) y por GuriEFF (*en prensa*).

Pruebas de acumulación por lote

Se realizaron pruebas de acumulación por lote con control de OD mediante un programa y un PLC con un punto de referencia de 4.1 mg L^{-1} como se ha descrito en el apartado 3.3. Los sensores mandan su señal a un PLC (controlador lógico programable) que la procesa y la envía al programa donde se detecta su valor y se toma una decisión en función del valor de OD leído, en este caso, si el OD se encuentra por arriba del 4.2 mg L^{-1} , el programa envía una señal al PLC que, a su vez, envía otra para encender una bomba calibrada adecuadamente que se enciende para adicionar un pulso de sustrato al reactor y permitir que el valor de OD baje.

Estas pruebas sirven para llevar a la biomasa a su máxima acumulación de PHA para suspender la reacción y extraer y cuantificar en este punto. El reactor monitorea OD y pH mediante sensores controlados por un PLC (Control Lógico Programable) como se ha descrito antes. Se obtienen por lo menos 12 muestras y se miden los mismos parámetros y utilizando las mismas técnicas analíticas que en los reactores de enriquecimiento selectivo. Los intervalos de muestreo se muestran en la tabla 4-1.

También se realizaron tinciones con negro de sudán B y safranina, de acuerdo a Lee y colaboradores (1999), como técnica auxiliar para detectar si la biomasa seguía almacenando PHA en momentos donde se tuvo problemas de sedimentabilidad y pérdida de biomasa en el reactor de enriquecimiento selectivo como consecuencia.

4.5. Cálculos

Todos los resultados se convierten a unidades de DQO para los cálculos.

Para calcular el porcentaje de sustrato acumulado en forma de PHA y expresado como DQO acumulado se utiliza la ecuación (4-1).

$$DQO_{acum} = \frac{PHA(mgDQO/L)}{SSV(mgDQO/L)} \quad (4-1)$$

Esta ecuación da como resultado un índice que indica la cantidad de PHA presente por unidad de biomasa, considerando a la biomasa como la suma de biomasa activa y PHA, por lo que representa la fracción de SSV que corresponden a PHA.

Para calcular el porcentaje o fracción de monómero PHB y monómero PHV acumulado se utilizan las ecuaciones (4-2) y (4-3) respectivamente para transformar en Cmmol las unidades de PHA acumulado, esto tiene el fin de poder calcular correctamente un porcentaje de monómero acumulado (*PM* representa el peso molecular). *PM*, representa el peso molecular de una unidad monomérica del PHB (86 g mol⁻¹) o PHV (100 g mol⁻¹).

$$CmmolPHB = \frac{\left[PHB(mgL^{-1}) \right]}{1000} \cdot PM(gmol^{-1}) \quad (4-2)$$

$$CmmolPHV = \frac{\left[PHV(mgL^{-1}) \right]}{1000} \cdot PM(gmol^{-1}) \quad (4-3)$$

De los resultados de las ecuaciones anteriores se puede entonces calcular la composición de fracciones monoméricas para cada dato, es decir, que porcentaje del copolímero obtenido es PHB y cual es PHV (4-4) y (4-5).

$$\%PHB_{monomero} = \frac{CmmolPHB}{CmmolPHB + CmmolPHV} \quad (4-4)$$

$$\%PHV_{monomero} = \frac{CmmolPHV}{CmmolPHB + CmmolPHV} \quad (4-5)$$

El consumo de sustrato y la formación de PHA fueron obtenidas convirtiendo los resultados analíticos a unidades de DQO por estequiometría de oxidación de acuerdo a Dionisi y colaboradores (2004); 1.672 mgDQO mgAc.Acético⁻¹, 1.514 mgDQO mgAc.Propiónico⁻¹, 1.816 mgDQO mgAc.Butírico⁻¹, 2.036 mgDQO mgAc.Valérico⁻¹, 2.203 mgDQO mgAc.Hexanóico⁻¹, 1.672 mgDQO mg(Ácido 3-Polihidroxi-butírico)⁻¹ y 1.918 mgDQO mg (Ácido 3-Polihidroxi-valérico)⁻¹.

También se calcula el porcentaje acumulado de PHA como peso seco celular con la ecuación (4-6).

$$PSCAcum = \frac{PHA(mgL^{-1})}{SSV(mgL^{-1})} \quad (4-6)$$

Este cálculo indica el porcentaje de PHA dentro de la célula; es decir, qué parte del peso de la célula corresponde a PHA, por lo que no se expresa en términos de DQO. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) incluyen a la biomasa activa (**X**) y al PHA formado.

Para calcular la tasa de acumulación de PHA en función del tiempo se necesita calcular la parte de biomasa que no es PHA (**X**); es decir, lo que se considera como la biomasa activa y es en función de ésta que se calcula la tasa de acumulación de PHA utilizando la ecuación (4-7). Donde **i** es el número de muestra.

$$v_i(t) = \frac{dPHA}{dt} = \frac{(PHA_i - PHA_{i-1})/X_i}{t_i - t_{i+1}} \quad (4-7)$$

Esta tasa de acumulación puede ser positiva o negativa; el signo negativo indica que los PHA están siendo consumidos y el positivo que se están acumulando.

Se puede también calcular la tasa de acumulación total en el tiempo **t** mediante la ecuación (4-8). Donde **X** es la biomasa activa y se calcula mediante la ecuación (4-9).

$$Tacumm = \frac{PHA_i/X_i}{t_i} \quad (4-8)$$

$$X = SSV_i - PHA_i \quad (4-9)$$

Esta tasa de acumulación considera únicamente a la biomasa activa, que es la diferencia de los SSV y el PHA acumulado en unidades de DQO. Se puede pensar como la tasa de rendimiento de la biomasa o su capacidad de acumular PHA.

La productividad del proceso se calcula con la ecuación (4-10), expresada en $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ y se interpreta como la eficiencia del proceso; es decir, con qué tasa se está acumulando el polímero en concentración.

$$P = \frac{PHA_i - PHA_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (4-10)$$

Este parámetro puede ser positivo o negativo; negativo indica que se está consumiendo el PHA y por lo tanto la concentración baja en el medio.

Estos cálculos se realizaron en cada estudio de ciclo en el SBR y en los experimentos de acumulación por lote en cada intervalo de tiempo. Adicionalmente se calcula la productividad máxima de PHA (QPHA [$\text{mgDQO L}^{-1} \text{h}^{-1}$]), la tasa máxima de degradación (QPHA [$\text{mgDQO L}^{-1} \text{h}^{-1}$]), la tasa de toma de AGVs máxima ((QAGV [$\text{mgDQO L}^{-1} \text{h}^{-1}$]) ajustando una recta en el período donde se muestran constantes y derivando para $t=0$.

Además se calculan las tasas específicas de toma de AGVs, acumulación de PHA y degradación de PHA ($-q_{AGV}$ [$\text{mgDQO mgDQO}^{-1} \text{h}^{-1}$], q_{PHA} y $-q_{PHA}$) dividiendo por el promedio de biomasa activa durante el ciclo.

$$q = \frac{Q}{\bar{X}} \quad (4-11)$$

4.6. Espectroscopía con infrarrojo y la transformada de Fourier

Transformada de Fourier

La absorción de la radiación infrarroja de energía baja causa excitación vibratoria y rotacional de los grupos de átomos de un compuesto dentro de la molécula. Debido a las absorciones características se logra fácilmente la identificación de grupos funcionales y como consecuencia, de las sustancias que forman.

La cuantificación de compuestos con el espectro infrarrojo de una muestra no se puede realizar directamente ya que, cada compuesto presente en la muestra contribuye al espectro con más de una banda o pico y, el valor de la absorbancia no es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Sin embargo, la combinación del espectro de infrarrojo con técnicas estadísticas de análisis puede resultar en un método alternativo de medición de

concentraciones de analitos cuando las técnicas tradicionales consumen mucho tiempo, son muy caras, o producen desechos peligrosos. Una de las técnicas estadísticas más utilizadas es la técnica de mínimos cuadrados parciales (*PLS, Partial Least Squares*) y análisis de componentes principales (*PCR, Principal Component Analysis*).

El funcionamiento de un espectrofotómetro tiene su base en el conocimiento de la radiación electromagnética, la cual es una onda de campos magnéticos y eléctricos viajando cuyas amplitudes varían con el tiempo. Consideremos sólo el campo eléctrico, ya que tanto la fase como la amplitud de la onda magnética están linealmente relacionadas al campo eléctrico, y los efectos observables en los detectores se deben, en gran parte, al campo eléctrico y no al magnético. Esta onda transporta información acerca de la fuente que la genera, esta información podría ser utilizada para obtener un modelo de la fuente cuando se conocen las frecuencias, amplitudes y las fases que forman a la onda al variar en el tiempo. Este fenómeno puede explicarse si se piensa en un prisma que separa la luz en los diferentes colores que la componen y cómo esto puede usarse como herramienta para examinar el espectro de las diferentes fuentes de luz (Davis et al, 2001).

El prisma dispersa la luz cambiando su dirección de propagación proporcionalmente a la frecuencia. Una rejilla de difracción también dispersa la luz, pero en varios espectros, no en uno sólo, y lo hace a través de ángulos proporcionales a la longitud de onda en lugar de a la frecuencia. Ya que se sabe como describir la acción de un elemento dispersante sobre una onda Electromagnética, es de suponerse que existe un principio físico y un proceso matemático implicados que describe la resolución de una onda variante en el tiempo en sus frecuencias constituyentes o colores, independientemente del tipo de objeto dispersante. Este proceso se conoce como la *descomposición de ondas de Fourier*. Y este principio es la base de un espectrofotómetro de infrarrojo de la transformada de Fourier (Davis et al, 2001).

En términos químicos analíticos, la transformada de Fourier se utiliza en la espectrofotometría con infrarrojo con la finalidad de que en vez de que la lámpara IR vaya barriendo todo el espectro, se excite al analito con todas las frecuencias (“luz blanca”) y la transformada de Fourier sirve para descomponer la señal captada en sus componentes de frecuencia.

Por ejemplo, digamos que una señal se compone de distintas ondas senoidales de frecuencias distintas. Sin embargo la señal se observa como una sola onda

donde no es posible notar que se encuentran varias frecuencias distintas combinadas. Al realizar la transformada de Fourier, obtenemos una gráfica de amplitud contra frecuencia, la cual nos dice que la onda contiene tres senoidales a tres diferentes frecuencias.

La transformada no grafica las ondas senoidales, sino que solo especifica las amplitudes relativas de los componentes de frecuencia. Esto se muestra en la figura 4-1 (Davis et al, 2001).

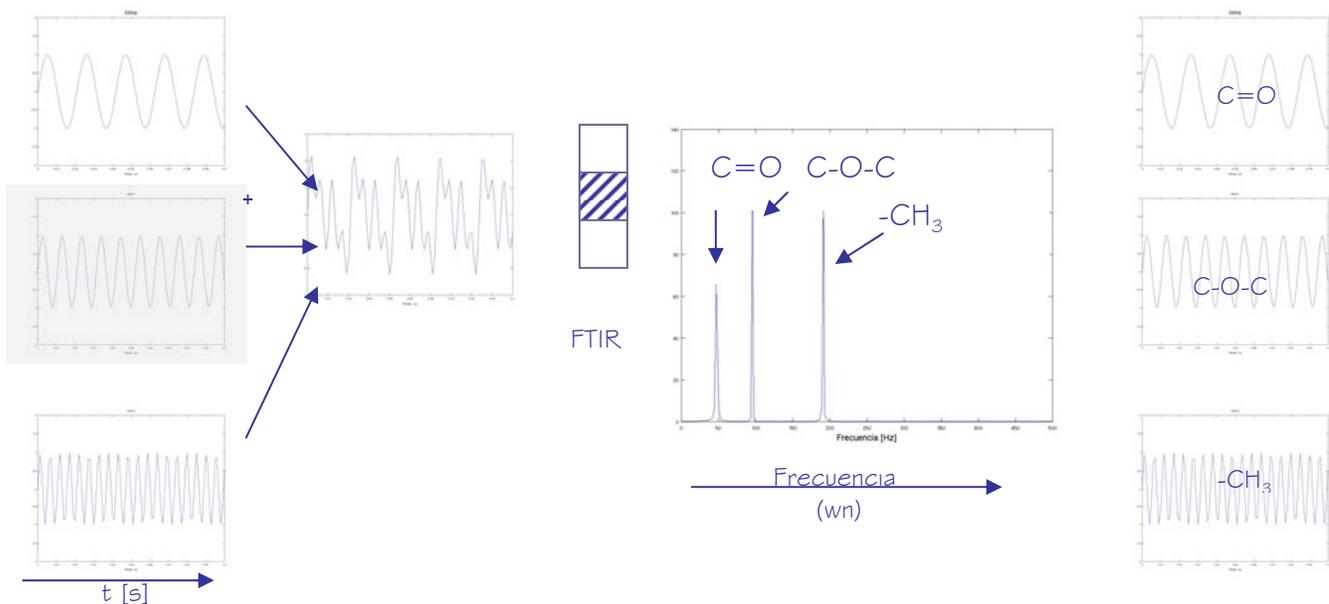


Figura 4-1 Transformada de Fourier aplicada en espectrofotometría

En esta figura se observa que la señal original es transformada del dominio del tiempo al dominio de la frecuencia (cm^{-1} , como la unidad más común).

En cuanto a identificación de compuestos, se puede explicar que la luz que alcanzamos a ver no es más que una pequeña parte del amplio espectro de radiación electromagnética. En la parte inmediata de alta energía del espectro visible se encuentra la luz ultravioleta, y en la parte de baja energía se encuentra el *infrarrojo*. La porción de la región infrarroja utilizada para el análisis de compuestos orgánicos no es inmediatamente adyacente al espectro visible. Los fotones de energía asociados con esta parte del infrarrojo no son lo suficientemente grandes para excitar a los electrones, pero sí pueden inducir *excitación vibracional* de átomos ligados covalentemente y grupos funcionales moleculares.

Los enlaces covalentes en las moléculas orgánicas no son rígidos, son más bien como resortes rígidos que pueden estirarse y doblarse. Se debe reconocer que, adicionalmente a la rotación de los grupos alrededor de enlaces simples, las moléculas experimentan una amplia variedad de movimientos vibratorios, los cuales son característicos de los átomos que lo componen (Davis et al, 2001).

Consecuentemente, virtualmente todos los compuestos absorberán radiación infrarroja que corresponde, en energía, a esas vibraciones. Los espectrofotómetros con infrarrojo, de manera similar a los de UV, permiten obtener espectros de absorción de compuestos en forma de una reflexión única de su estructura molecular. Un espectro que no absorba nada en absoluto, registrará una línea horizontal en el 100% de transmitancia o 0% de absorbancia. Un ejemplo de un espectro obtenido (transmitancia-frecuencia de onda) del CCl_4 , es mostrado en la figura 4-2 (Reusch, 1999).

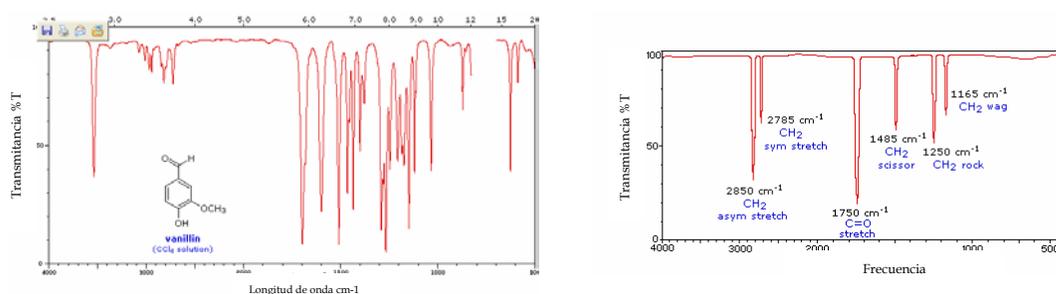


Figura 4-2 Ejemplo de un espectro en transmitancia de el compuesto CCl_4 y su interpretación en la teoría de espectrofotometría vibratoria (Reusch, 1999).

Cuando un objeto vibra a una cierta frecuencia y encuentra otra vibración de exactamente la misma frecuencia, el oscilador absorberá esa energía. A cualquier

temperatura por encima del cero absoluto, todos los pequeños osciladores armónicos simples¹ (figura 4-3, acoplamiento átomo-enlace-átomo) que constituyen una molécula se encuentran en vigorosa vibración. Da la casualidad de que la luz infrarroja está en el mismo rango de frecuencia que la molécula en vibración. De modo que si se irradia una molécula en vibración con luz infrarroja, absorberá aquellas frecuencias de la luz que sean exactamente iguales a las frecuencias de los distintos osciladores armónicos que constituyen dicha molécula. Cuando la luz es absorbida, los pequeños osciladores de la molécula seguirán vibrando a la misma frecuencia, pero dado que han absorbido la energía de la luz, tendrán una amplitud de vibración más grande. Esto significa que los "resortes" (enlaces) se estirarán más que antes de absorber la luz. La luz que no fue absorbida por ninguno de los osciladores de la molécula, es transmitida desde la muestra a un detector y una computadora la analizará y determinará las frecuencias que fueron absorbidas (Nakamoto, 1986).

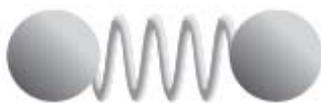


Figura 4-3 Enlaces moleculares vistos como un sistema de oscilador armónico simple

Una molécula compuesta de n -átomos tiene un total de $3n$ grados de libertad, correspondientes a las coordenadas cartesianas de cada átomo en la molécula, estos son: 3 de traslación, 3 de rotación (2 si es lineal), $3n-6$ de vibración ($3n-5$ si la molécula es lineal). Los movimientos de vibración de una molécula se pueden descomponer en oscilaciones en las que los átomos se mueven en fase y que se llaman *modos normales de vibración*, cada uno de los cuales tiene una frecuencia característica; estos reciben el nombre de *tensión y flexión*. Normalmente el número de vibraciones de tensión coincide con el número de enlaces. En estos modos puros de vibración el centro de gravedad de la molécula no se traslada.

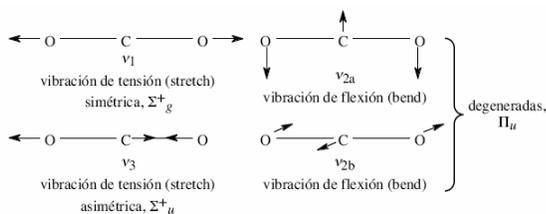


Figura 4-4 Modos normales de vibración de la molécula de CO₂ (Nakamoto, 1986).

La frecuencia exacta a la cual ocurre cada vibración se encuentra determinada por la fuerza de los enlaces involucrados y la masa de los átomos presentes. Normalmente, se esperaría una sola banda o pico en el espectro por cada

¹ Un enlace químico no es verdaderamente un oscilador armónico pues la energía potencial aumenta más cuando se disminuye la distancia por debajo de la del equilibrio que cuando se aumenta (Nakamoto, 1986).

vibración. Sin embargo, esto no sucede, ya que el número de vibraciones observadas puede incrementarse por las interacciones aditivas o sustractivas de las vibraciones, lo cual lleva a la combinación de tonos y sobretonos de las vibraciones fundamentales. Además, el número de absorciones observadas pueden disminuir por la simetría molecular, limitaciones del espectrofotómetro, entre otras causas. Una regla general es que debe de ocurrir un cambio en el momento bipolar para que una vibración absorba energía infrarroja.

La observación y medición de la radiación emitida o absorbida por los átomos y moléculas da información sobre su identidad y estructura así como de su ambiente físico. Un espectro puede contener líneas discretas y bandas y quizá tal vez hasta continuidades. Cada una de estas características del espectro puede ser identificada y asociada con un átomo o molécula en particular, así como con su ambiente físico. En este sentido el uso de este tipo de espectros en análisis espectroquímicos utiliza las características del espectro para determinar la composición química de la fuente de radiación.

El espectro vibratorio de una molécula –como los espectros obtenidos en la espectrofotometría con infrarrojo- es considerado como una propiedad física única y es característico de una molécula. Es bajo este principio que el espectro infrarrojo es considerado como la huella digital que puede identificar mediante comparación una muestra de un compuesto “desconocido” con algún espectro de referencia previamente obtenido. En caso de que no se tenga un espectro de referencia con el cual realizar la comparación se puede hacer una interpretación del espectro identificando las bandas asociadas con los grupos funcionales para los cuales se conoce el rango de aparición de bandas en el espectro; esto dará como resultado la caracterización del compuesto e incluso la identificación del mismo. Es importante considerar que una completa interpretación incluye el reconocimiento de las bandas presentes y de las que no están presentes. En la terminología común se utiliza picos, bandas infrarrojas y absorción indistintamente (Meek, 1998).

En la figura 4-5 se muestran las regiones generales del espectro de infrarrojo, en las cuales se observan varios tipos de bandas vibracionales. Se puede observar

Tabla 4-2 Asignación de bandas de grupos comunes (Rusch, 1999; Kansiz et al, 2004; Jarute et al, 2004)

Clase funcional	Vibraciones de tensión			Vibraciones de flexión		
	Rango (cm ⁻¹)	Intensidad	Asignación	Rango (cm ⁻¹)	Intensidad	Asignación
Alcanos	2850-3000	fuerte	CH ₃ , CH ₂ & CH 2 or 3 bandas	1350-1470 1370-1390 720-725	media media débil	CH ₂ & CH ₃ deformación CH ₃ deformación CH ₂
Alquenos	3020-3100 1630-1680 1900-2000	media variable fuerte	=C-H & =CH ₂ (usualmente agudos) C=C (simetría que reduce intensidad) C=C tensión asimétrica	880-995 780-850 675-730	fuerte media media	=C-H & =CH ₂ (flexión fuera de plano) cis-RCH=CHR
Alquinos	3300 2100-2250	fuerte variable	C-H (usualmente agudos) C≡C (simetría reduce intensidad)	600-700	fuerte	C-H deformación
Arenos	3030 1600 & 1500	variable media- débil	C-H (mpueden ser varias bandas) C=C (en anillo) (2 bandas) (3 si conjugado)	690-900	fuerte- media	C-H flexión
Alcoholes y fenoles	3580-3650 3200-3550 970-1250	variable fuerte fuerte	O-H (libre), usualmente agudos O-H (H-ligado), usualmente amplio C-O	1330-1430 650-770	media variable- débil	O-H tensión (en plano) O-H tensión (fuera de plano)

Clase funcional	Vibraciones de tensión		Vibraciones de flexión

	Rango (cm ⁻¹)	Intensidad	Asignación	Rango (cm ⁻¹)	Intensidad	Asignación
Aminas	3400-3500 (sol. Dil.)	débil	N-H (1°-aminas), 2 bandas	1550-1650	media-fuerte	NH ₂ de corte (1°-aminas)
	3300-3400 (sol. Dil.)	débil	N-H (2°-aminas)	660-900	variable	NH ₂ & N-H meneo (cambios en el H-ligado)
	1000-1250	media	C-N			
Aldehídos y cetonas	2690-2840(2 bandas)	media	C-H (aldehído de C-H)	1350-1360 1400-1450 1100	fuerte fuerte media	α-CH ₃ tensión α-CH ₂ tensión C-C-C tensión
	1720-1740	fuerte	C=O (aldehído saturado)			
	1710-1720	fuerte	C=O (cetona saturada)			
	1690	fuerte	anil cetona			
	1675	fuerte	α, β-no saturado			
	1745	fuerte	Ciclopentanona			
	1780	fuerte	ciclobutanona			
Ácidos carboxílicos y derivados	2500-3300 (ácidos) C-H sobrepuesto	fuerte	O-H (muy amplio)	1395-1440	media	C-O-H tensión
	1705-1720 (ácidos)	fuerte	C=O (H-ligado)			
	1210-1320 (ácidos)	media-fuerte	O-C (a veces 2-picos)			
	1785-1815 (ácidos halidos)	fuerte	C=O			
	1750 & 1820 (anhídridos)	fuerte	C=O (2-bandas)			
	1040-1100	fuerte	O-C			
	1735-1750 (ésteres)	fuerte	C=O			
	1000-1300	fuerte	O-C (2-bandas)			
1630-1695(amidas)	fuerte	C=O (banda Amida I)	1590-1650	media	N-H (1i-amida) II banda	
			1500-1560	media	N-H (2i-amida) II banda	

Preparación de muestra

Existen varias formas de preparación de muestra en función de la forma física de la muestra analizada.

Para sólidos existen dos formas principales. Uno es con el uso de *Nujol mull* o discos de bromuro de potasio, aunque también se puede preparar una solución de la muestra en un solvente que no sea activo en el infrarrojo en el rango de interés. Se pueden utilizar soluciones de sales de materiales inactivos al infrarrojo como el NaCl o el CaF₂.

También se pueden obtener espectros de películas delgadas de material colocado sobre la ventana de muestra del espectrofotómetro.

En cuanto a líquidos, simplemente se coloca una gota entres dos platos de KBr para hacer una fina película capilar. Los gases necesitan el uso de una celda cilíndrica de gas con ventanas en los extremos y debe estar hecha de un material inactivo al infrarrojo (Davis et al, 2001).

Adquisición de un espectro

Durante la adquisición de un espectro, frecuentemente se mide un espectro de referencia de un canal simple (single-channel), tomando el espectro de rayo abierto sin ninguna muestra en el camino óptico. A este espectro se le conoce como *background* o de referencia. Este espectro permite tomar en cuenta los efectos que ha tenido la medición del espectrofotómetro por sí mismo sobre el espectro medido, p.e. la potencia de la fuente de luz que puede variar a diferentes frecuencias.

Hablando estrictamente, lo que mide es un interferograma en vez de un espectro. Al utilizar la transformada de Fourier, este interferograma, es transferido a un espectro de canal simple. Con base en este espectro y el *background* medido, un espectro de transmisión/absorción será calculado (Davis et al, 2001).

Para la toma de muestras se deben tomar en cuenta varios aspectos y errores que pueden cometerse que disminuyan la utilidad o validez del espectro que de ellas se obtengan. Se deben recolectar muestras que incluyan el rango completo de concentración del componente en estudio y lo mejor distribuidas posible.

Un aspecto importante es la ausencia o presencia de agua en la muestra, lo cual influirá en la extensión de enlaces de hidrógeno dentro de la muestra. Los enlaces de hidrógeno influirán tanto la posición de banda como su ancho. Si se toman muestras fuera del rango considerado de nivel de humedad se obtendrán resultados incorrectos.

Otros errores comunes al tomar muestras son errores técnicos al preparar la muestra, diferencias de temperatura en los estándares o instrumentos mientras se obtienen datos, inestabilidad de la muestra, ruido en el instrumento, cambios en la longitud de onda establecida, no linealidad, diferencias en el tamaño de partícula, variación de color con la concentración, diferencias en el tratamiento de la muestra, o que el método de referencia no mida el mismo componente que el método espectroscópico (Davis et al, 2001 ; Meek, 1998).

Para las muestras pulverizadas los dos mayores componentes a considerar son el tamaño de partícula y la humedad (enlace O-H).

Correcciones al espectro

Corrección de línea de base

Cuando la línea de base se encuentra con una pendiente, curvada o significativamente debajo del 100% (transmitancia) o de 0% (absorbancia), significa que la preparación de la muestra es insuficiente. En lugar de preparar otra muestra, se corrige la línea de base, usualmente utilizando software especializado. En la mayor parte de los casos, esto arreglará el problema.

Es posible también excluir el rango del CO_2 durante la corrección de línea de base. La corrección de línea de base se utiliza para manipular espectros que no fueron medidos muy bien. Se ejemplifica en la figura 4-6.

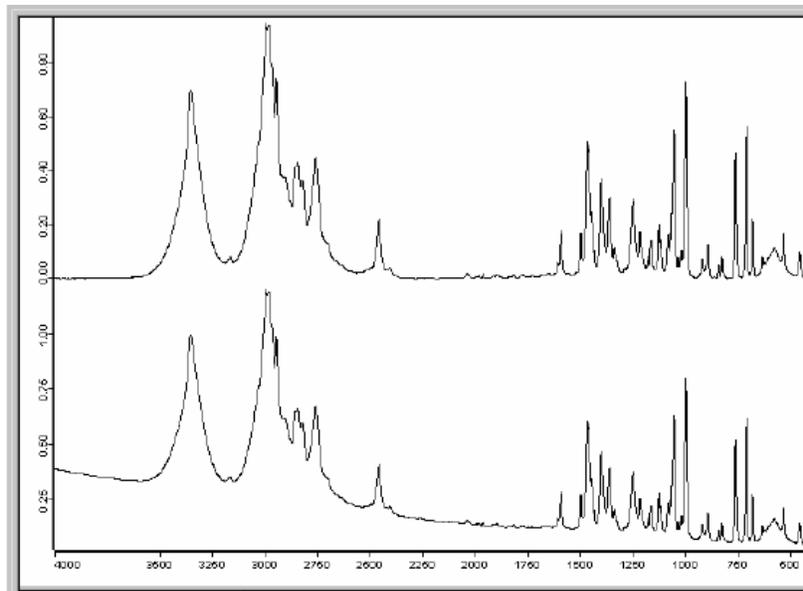


Figura 4-6 Corrección de línea de base (Nakamoto, 1986).

Normalización del espectro

La normalización de un espectro permite normalizar el espectro y realizar correcciones de compensación sobre el mismo. Un modo de normalización consiste en determinar el mínimo y el máximo del espectro, la asigna un valor de 0 al mínimo y de 1 o 2 al máximo y sobre eso normalizan las demás bandas.

Una de las normalizaciones más comunes consiste en cambiar las intensidades del espectro de modo que la unidad mínima de absorbancia sea de 0. Se puede tomar otra absorbancia de interés para normalizar (Nakamoto, 1996).

Compensación atmosférica

Esto consiste en eliminar las bandas que puedan causar disturbios en el espectro, tanto de H₂O como de CO₂. Estas bandas surgen debido a diferentes concentraciones de vapor H₂O/CO₂ que están sobre el camino del haz al medir el espectro de referencia o la muestra. Se ejemplifica en la figura 4-7.

Suavizado

El suavizado de un espectro causa un efecto cosmético sobre el espectro. Reduce el ruido y distorsiona las intensidades de las señales. Es común usar el algoritmo de Savitzky-Golay con cierto ancho de ventana.

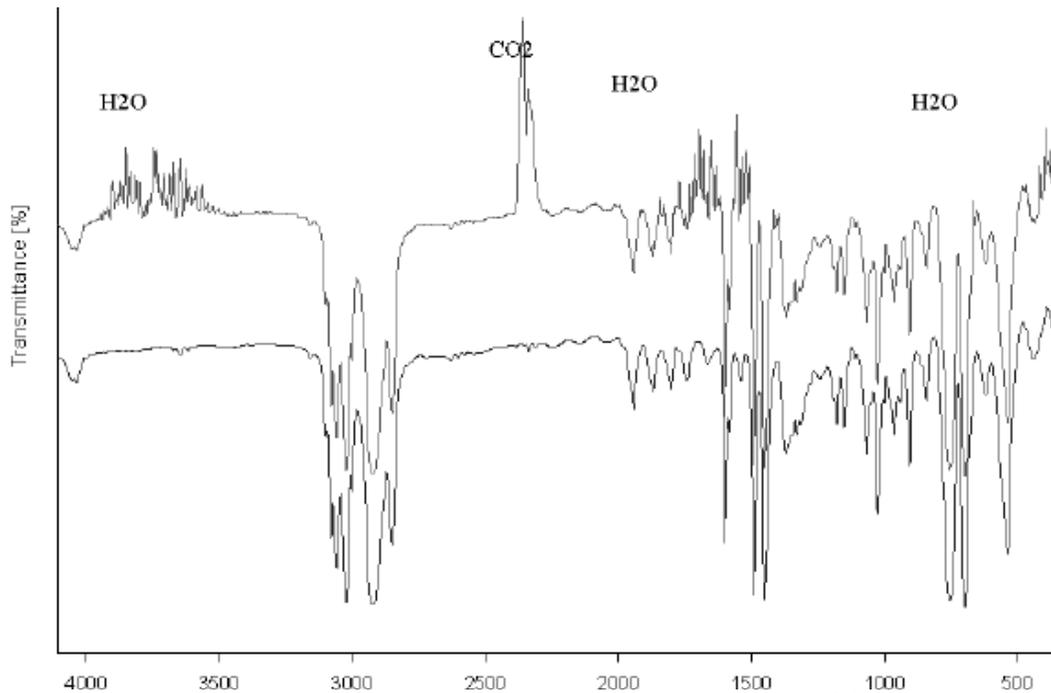


Figura 4-7 Compensación atmosférica (Nakamoto, 1986)

4.7. Cuantificación rápida de PHA con FTIR

La espectroscopía con FTIR en conjunto con el análisis de mínimos cuadrados parciales se propone como un método alternativo para cuantificación segura y rápida de polihidroxialcanoatos (PHA) en cultivos bacterianos mixtos.

4.7.1. Preparación de muestra

La preparación de muestra fue hecha de acuerdo a Kansiz y colaboradores (2000) con algunas modificaciones. Durante seis distintas pruebas de acumulación en lote, las muestras fueron tomadas sobre un intervalo de tiempo entre 0 y 8 horas para análisis con GC y para FTIR. Para el análisis de FTIR, 1 mL de muestra fue colectada y centrifugada a $15000 \times g$ durante 4 minutos. El sobrenadante es removido y el *pellet* celular resultante es lavado con $90\mu\text{l}$ de solución isotónica salina ($9\text{g L}^{-1}\text{NaCl}$) y re-centrifugada. El sobrenadante es removido una vez más y el *pellet* final es resuspendido en $80\mu\text{l}$ de solución isotónica salina. Las muestras fueron secadas en un horno a 105°C por 20 minutos para obtener una muestra sólida para adquirir el espectro. Para análisis con GC se realizó el procedimiento descrito en el apartado 4.3.

4.7.2. Adquisición de los espectros FTIR

Los espectros FTIR fueron obtenidos con un espectrofotómetro Nicolet 6700 acoplado a una PC con el software OMNIC para análisis de espectros, un divisor de haz de KBr. Los espectros de absorbancia fueron colectados a una longitud de onda entre 4000cm^{-1} y 400cm^{-1} , con una resolución espectral 4cm^{-1} . Se colectaron 32 escaneos por cada espectro. Así mismo se obtuvieron 5 ó 6 espectros por muestra. Una corrección de línea base automática se realizó utilizando el software ONMIC en todos los espectros para evitar errores debidos a cambios en las líneas base. La muestra seca forma una fina película de biomasa, esta película es colocada en la ventana de muestra del espectro para obtener el espectro.

Durante la toma de espectros se corrió un algoritmo para excluir bandas de CO_2 y de H_2O . Para pre-filtrar el efecto en el modelo debido a las diferencias en el grosor de la muestra de un mismo depósito de muestra las réplicas se colocaron con películas de diferente grosor.

4.7.3. Aplicación de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

PLS es una técnica que ha sido utilizada para obtener un modelo predictivo para PHA como un función lineal de la absorbancia en un rango de longitudes de onda. El modelo es de la forma mostrada en la ecuación 4-12: Por ejemplo, un

espectrograma es una curva que representa la absorbancia o transmitancia con respecto a un número de onda. En términos de datos es sólo un par de vectores; es decir una colección de p pares $(\mathbf{x}_j, \mathbf{z}_j)$, con $j = 1, \dots, p$, donde \mathbf{x}_j corresponde a los número de onda (abscisa) y \mathbf{z}_j corresponde a la absorbancia (ordenada). Los dos vectores \mathbf{x} y \mathbf{z} están formados con elementos \mathbf{x}_j y \mathbf{z}_j , respectivamente como indica la Ecuación 4-12.

$$y_k = \sum_{j=1}^p G_{k,j} \cdot z_j + g_k, \quad k = 1, \dots, m \quad (4-12)$$

Donde:

\mathbf{Y} = vector que representa el contenido celular de PHA (%PHA expresado como peso seco celular)

\mathbf{G} = matriz de valores de ponderación o de peso

\mathbf{Z} = vector que representa los espectros FTIR obtenidos (absorbancias a.u.)

\mathbf{g} = vector de offsets o de penalización

PLS permite realizar la identificación de la mayoría de las longitudes de onda que aporten información valiosa sobre el contenido de PHA y que se incluirán en el modelo. Los espectros obtenidos de FTIR cuantifican la absorbancia a p longitudes de onda en un intervalo desde 4000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} . En lugar de asignarles a todas las longitudes de onda disponibles el mismo valor en el modelo, es deseable darle mayor peso a aquellas absorbancias que ocurren en longitudes de onda causadas por el PHA intracelular. En términos prácticos, cada pieza de información extraída se convierte, entonces, en una combinación lineal de los datos dados. La matriz \mathbf{G} otorgará los pesos a la combinación lineal y el vector \mathbf{g} otorgará las penalizaciones u *offsets* de la ecuación 4-12, y entonces, PLS provee una forma de encontrarlos. La información extraída de los datos medidos (p.e. concentración de PHA intracelular) es condensada en un vector \mathbf{y} , el cual, es mucho más pequeño que p , y los datos dados (p.e. el vector de absorbancias \mathbf{z}) es altamente colineal.

En PLS se asume que solo existen unos pocos factores implícitos o también conocidos como factores latentes a los cuales se les puede atribuir la mayor parte de la varianza en la respuesta (p.e. el vector \mathbf{y}).

La matriz \mathbf{G} y el vector de penalizaciones u *offsets* \mathbf{g} se construyen secuencialmente utilizando un número determinado de componentes o factores (\mathbf{r}) que contribuyan significativamente a la respuesta. Para encontrar este número de factores y el modelo PLS correspondiente, se generan datos de calibración (p.e.

valores medidos de \mathbf{y} y \mathbf{z}), se construye un modelo, y una validación cruzada se lleva a cabo (Geladi y Kowalski, 1986).

Este método es muy utilizado en quimiométrica para extraer información de grandes vectores, tales como los espectros FTIR (Kansiz et al, 2000; Jarute et al, 2004). Una vez que una matriz \hat{G} adecuada y un vector \hat{g} han sido determinados, dado un vector nuevo (\mathbf{Z}_{new}) de datos (en este caso un espectro FTIR), la salida (\hat{y}), el contenido genérico de biomasa que contiene PHA, puede predecirse utilizando la ecuación 4-13, en donde, solo una pieza de información es necesaria de modo que la matriz G se vuelve un vector fila y el vector \mathbf{g} un escalar.

$$\hat{y} = \sum_{j=1}^p \hat{G}_j z_{new,j} + \hat{g} \quad (4-13)$$

4.7.4. Selección de muestras para calibración

Generalmente se utilizan de 10 a 15 muestras para calibración. Estas muestras abarcan un amplio rango de concentraciones idealmente. Un conjunto ideal de muestras de calibración no debe presentar correlación con la humedad, tamaño de partícula, o alguna otra característica con cualquiera de los componentes de interés.

Al seleccionar las muestras para la calibración se consideró que la varianza de un conjunto de muestras determina tanto la robustez como la precisión para una aplicación en particular, y que más allá de encontrar errores en la calibración y/o predicción de concentraciones debida a la elección del aparato o la técnica de regresión escogida, la mayor parte de las veces los errores se deben a errores de la técnica de referencia (fuente de error estocástico), no homogeneidad en la muestra (fuente de error estocástico), muestreo no representativo (error indefinido).

En el experimento se seleccionaron aquellas muestras cuya preparación fue homogénea y se descartaron aquellas que tuvieron diferencias en su preparación como se describirá en el apartado 5.3.8.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fase I

El inóculo del reactor de enriquecimiento selectivo fue sometido a períodos como los descritos en el Capítulo 3. Se realizaron primero ciclos sin período de sedimentación, con lo cual se observó un lavado del reactor debido a la aparición de lo que parecían ser exopolímeros o bacterias filamentosas. Esto se muestra en la figura 5-1. Debido a esto se agregó un periodo de sedimentación al ciclo de 10 minutos y se alcanzó un estado semi-estable en el SBR después de 24 días de reinoculación. Se obtuvieron muestras del reactor para hacer pruebas cualitativas de detección en PHA con tinción de azul de Nilo A de acuerdo a Ostle y Holt (1982).

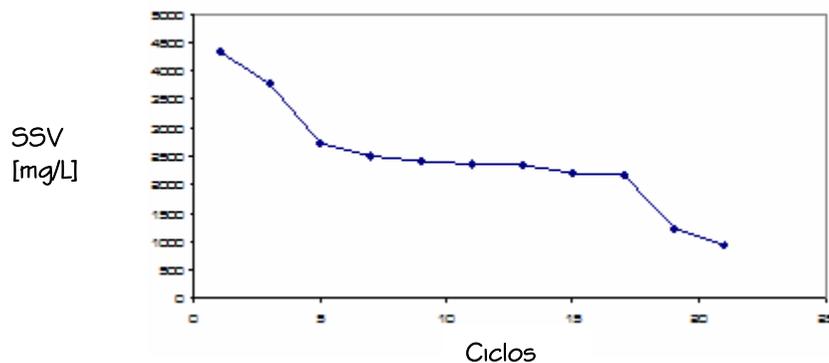
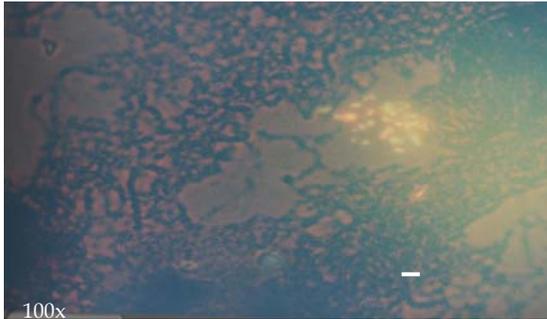


Figura 5-1 SST-SSV 21 ciclos después de inoculación; lavado de reactor

La primera tinción se realizó al agregar el tiempo de sedimentación y después de 24 días de reinoculación; la tinción es específica para PHB.



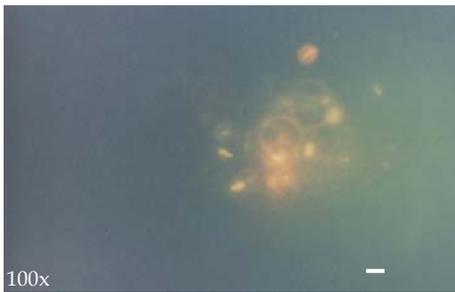
Fotografía 5-1 Vista de gránulos de PHB en contraste de fase para muestra de reactor de enriquecimiento selectivo después de estabilización (contraste de fase)

Barra, 2.0 μm , microscopio de fluorescencia objetivo 100X con aceite de inmersión



Fotografía 5-2 Vista de gránulos de PHB en microscopio de fluorescencia 460 nm para muestra de reactor de enriquecimiento selectivo después de estabilización

Se detectaron gránulos de PHB en las muestras, como se muestra en las fotografías 5-1 y 5-2. Sin embargo las condiciones de baja sedimentabilidad resurgieron a pesar de haber incluido un período de sedimentación. La presumible aparición de exopolímeros o de organismos filamentosos (que no se comprobó) resultó en un medio viscoso lo cual dificultó la sedimentabilidad llevando a un lavado gradual de la biomasa. En las fotografías se observaron cocos y bacilos como estructuras bacterianas presentes, sin presencia aparente de organismos filamentosos. Es por ello que se supone que la presencia de exopolímeros fue la causa de la afectación en el reactor. Para recuperar el estado del reactor se agregó biomasa nueva, una vez cada 24 ciclos, con un volumen de intercambio de 0.3 L. Se hicieron nuevas tinciones después de una semana de agregar el lodo nuevo para verificar la adaptación de los nuevos cultivos y la rapidez del proceso de enriquecimiento selectivo en el reactor. Véanse las fotografías 5-3 y 5-4.



Fotografía 5-3 Presencia de gránulos de PHB después de una semana de reinoculación parcial

Barra, 2.0 μm , microscopio de fluorescencia objetivo 100X con aceite de inmersión



Fotografía 5-4 Presencia de gránulos de PHB después de tercera semana de reinoculaciones parciales

De las tinciones obtenidas, no se puede definir la cantidad de PHB presente, ni si hay otro tipo de PHA presente. Sin embargo, permitió, al menos, comprobar que el enriquecimiento selectivo puede llevarse a cabo utilizando bajos tiempos de retención celular. La edad de lodo presente es siempre baja; los lodos al permanecer tan poco tiempo en el reactor captan la mayor cantidad de sustrato posible al recibir una alta carga orgánica.

Se realizaron algunas pruebas de cromatografía de gases exploratorias, los picos observados fueron imperceptibles por lo que se asumió que había una bajísima concentración de PHA en las muestras, ya que los estándares utilizados fueron con cantidades mínimas de 0.1 mg y aún así no se obtuvo un pico perceptible. La etapa de experimentación inicial sirvió para comprobar la acumulación de al menos un PHA en los cultivos mixtos utilizando técnicas puramente cualitativas y específicas para PHB. Se logró identificar al bajo tiempo de retención celular como el parámetro que dispara la acumulación de PHB en los cultivos mixtos debido a la reinoculación parcial del reactor, a través de las cuales se siguió observando la presencia del PHB.

A pesar de que se obtuvieron PHB, la pérdida de biomasa seguía sucediendo debido al aumento de la viscosidad en el reactor. Siguió varias reinoculaciones; y a pesar de seguir obteniendo PHB en las tinciones, la aparición de exopolímeros que impedían la sedimentación y por lo tanto propiciaban el lavado del reactor continuaron. Se probó la recirculación de biomasa al reactor y una sedimentación de mayor duración; se dejó de retirar licor mezclado cada ciclo, pero aún así, el lavado continuó. Se seguían observando PHA en el microscopio y todavía no se pudieron realizar cuantificaciones por CG. Se bajó la carga de la alimentación hasta $5.0 \text{ mgDQOL}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pero el resultado fue el mismo.

Se hicieron cambios en la agitación (200 rpm), aireación (2 vvm), y tiempos de sedimentación (15-30 minutos) y el resultado seguía siendo el mismo. Se probó un inóculo distinto y control de temperatura sin obtener buenos resultados, por lo que se procedió a la investigación de otras condiciones de operación que disminuyeran la viscosidad.

5.2 Fase II

5.2.1 Desempeño del sistema RW

El reactor ha operado desde julio del 2005, pero el período de experimentación durante la visita de investigación cubrió 14 estudios de ciclo, de los cuales de sólo 10 se tienen los resultados completos y 12 pruebas batch de acumulación.

El primer estudio de ciclo se realizó el 16 de octubre de 2006 (figura 5-2), cuantificando el contenido de PHA con muestras cada 15 minutos. El estudio arrojó como resultados el adecuado espaciamiento de muestreo en el tiempo, al permitir identificar dónde se logra la acumulación máxima de polímero y dónde comienza la degradación.

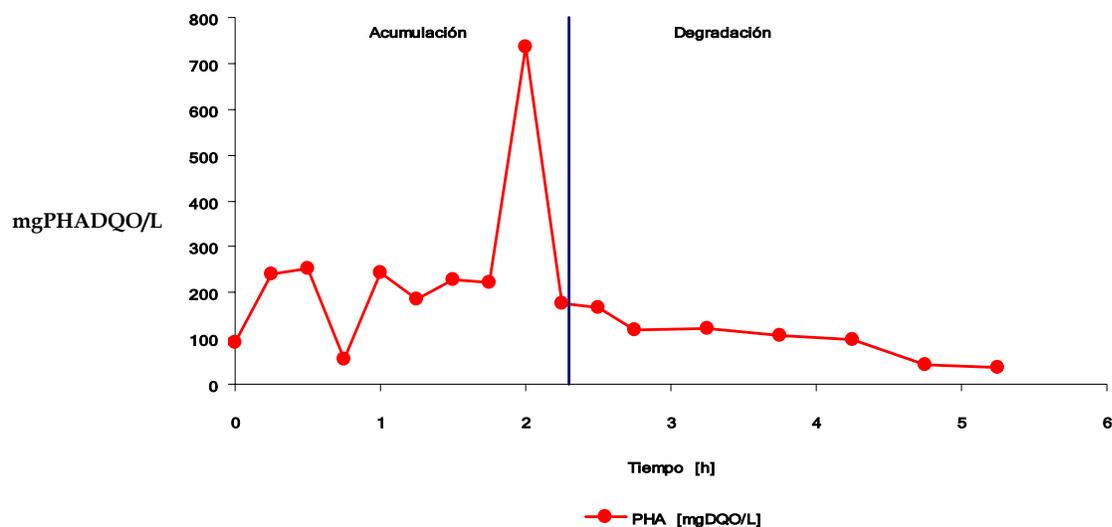


Figura 5–2 Intervalos de acumulación y degradación de PHA

A partir de este ciclo los intervalos de muestreo tuvieron la distribución ya mencionada anteriormente en la Sección 4.4.

Un ciclo típico del SBR es presentado en la figura 5-3, en donde el perfil de los AGVs [mgDQO L⁻¹], de los PHA [mgDQO L⁻¹], el oxígeno disuelto (OD) [mg L⁻¹], nitrógeno amoniacal (N-NO₄) [mg L⁻¹], fosfatos (P-PO₄) [mg L⁻¹] y pH en función del tiempo se puede observar. Durante todos los ciclos el pH no fue controlado, variando su valor entre 7.3 y 8.7 durante el ciclo, sucediendo pH más bajos al inicio de la adición del sustrato y más altos al finalizar el ciclo.

La razón por la que no se controló el pH fue porque se compararon las acumulaciones obtenidas al controlar el pH y fueron menores que al no controlar el pH (resultados no mostrados).

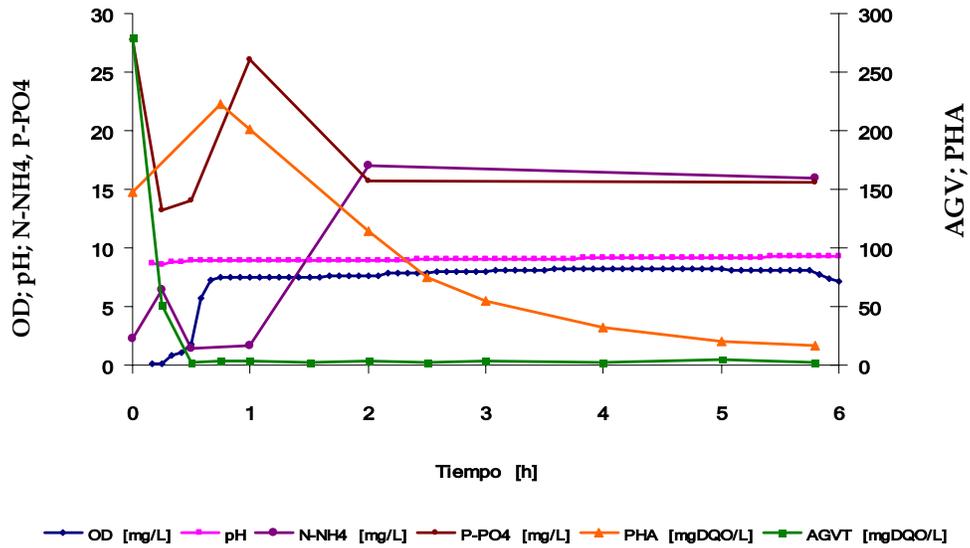


Figura 5-3 Estudio de Ciclo en SBR

En la figura 5-4 se observan los perfiles de los parámetros por separado para su análisis.

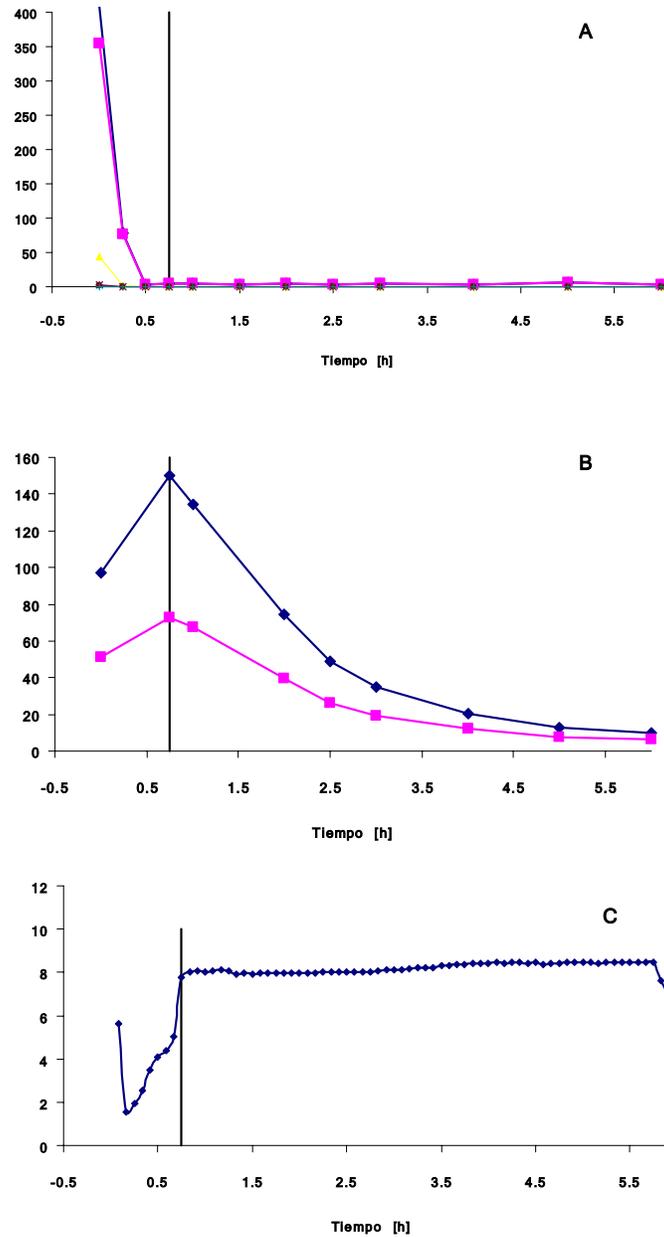


Figura 5–4 (A) Perfil de AGVs [mgDQO L⁻¹]; (B) Perfil de PHB y PHV [mgDQO L⁻¹]; (C) Perfil de OD [mg L⁻¹]

La alimentación termina a los cinco minutos de inicio del ciclo; en la figura 5-4(A) se observa el consumo de AGVs, este sustrato está compuesto de ácido acético, propiónico, butírico, iso-butírico, valérico, iso-valérico y hexanóico, sin embargo solo el ácido acético y el propiónico se presentan en proporciones significativas en la composición del agua residual real y así lo muestra la gráfica 5-4(A) A.

Se puede observar el agotamiento de los AGVs después de 0.75 h de inicio de reacción, es evidente que la tasa de consumo de sustrato en este período de tiempo es aproximadamente constante; se puede ver que el sustrato es inmediatamente consumido mientras es suministrado y poco después de terminar este suministro es completamente agotado, quedando la biomasa expuesta a un largo período de ayuno. De la gráfica 5-4(B) se puede observar que los PHA (PHB/PHV) son sintetizados cuando hay presencia de sustrato, el consumo de sustrato es simultáneo al proceso de acumulación de PHA.

También puede observarse que al comenzar el periodo de ayuno (ausencia de sustrato en el medio) comienza la degradación o consumo del PHA intracelular acumulado en la etapa de abundancia de sustrato. En la figura 5-4(C) se observa el perfil de OD durante todo el ciclo, que observa un comportamiento esperado y reportado en varios trabajos (Sato et al, 1998; Serafim et al, 2004; Dionisi et al, 2004). Una depresión pronunciada de la gráfica durante el aporte del sustrato (5 minutos iniciales de ciclo) debido a que el oxígeno es consumido a una tasa muy alta para realizar la acumulación de PHA. Después del período de alimentación la curva de oxígeno comienza a subir hasta estabilizarse después de que se ha consumido el sustrato hasta valores de 80% de saturación (ayuno); de esto se puede ver que la tasa de consumo de oxígeno disuelto para degradación de PHA es muy baja por lo que se concluye que la tasa de degradación de PHA es menor que la tasa de acumulación. El PHA es utilizado como fuente de carbono al agotarse el sustrato que son los AGV, ya que los AGV claramente son agotados tempranamente dejando sin fuente de carbono a los microorganismos que recurren a su fuente de carbono alterna almacenada durante la etapa de abundancia de sustrato. Sin embargo sucede que la biomasa reportada como SSV se mantiene aproximadamente constante también en el período de degradación, por lo que los PHA, se supone, son utilizados para funciones de mantenimiento celular principalmente.

El amonio se siguió durante tres ciclos solamente y se observó que se consumía al principio junto con el sustrato, lo cual indica que el crecimiento celular se lleva a cabo al mismo tiempo que la acumulación de PHA como indican Serafim y colaboradores (2004). Esto permite concluir que los cultivos mixtos no necesitan de la limitación de un nutriente para acumular PHA como sucede en cultivos puros (Lee y Choi, 1999).

Las tasas máximas de acumulación, degradación de PHA; y la de toma de AGVs se pueden calcular ajustando una recta en el período donde se muestran constantes y derivando para $t=0$. La figura 5-5 muestra el ajuste por regresión lineal de estos parámetros para un ciclo típico del SBR (figura 5-3).

Las tasas máximas determinadas se presentan en la tabla 5-1.

Tabla 5-1 Tasas máximas calculadas para el ciclo de la figura 5-3

Tasa de consumo de Ac. Acético, - QHAc [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	1110.2
Tasa de consumo de Ac. Acético, - QHPr [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	169.57
Tasa de acumulación de PHB, Qphb. [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	71.12
Tasa de acumulación de PHV, Qphv. [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	28.90
Tasa de degradación de PHB, -Qphb. [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	60.38
Tasa de degradación de PHV, -Qphv. [mgDQO L ⁻¹ h ⁻¹]	26.92

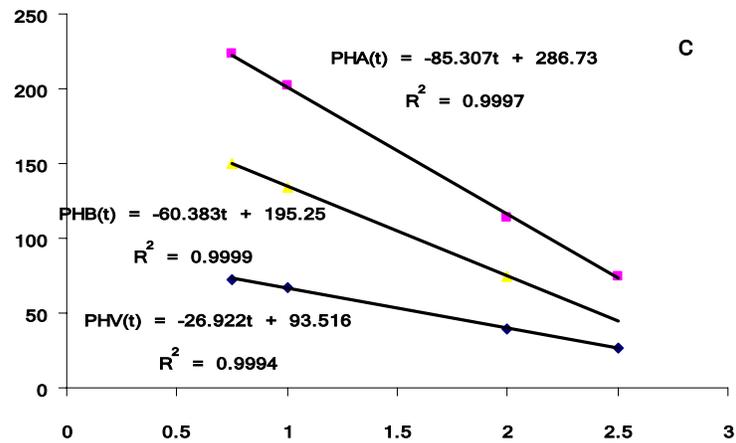
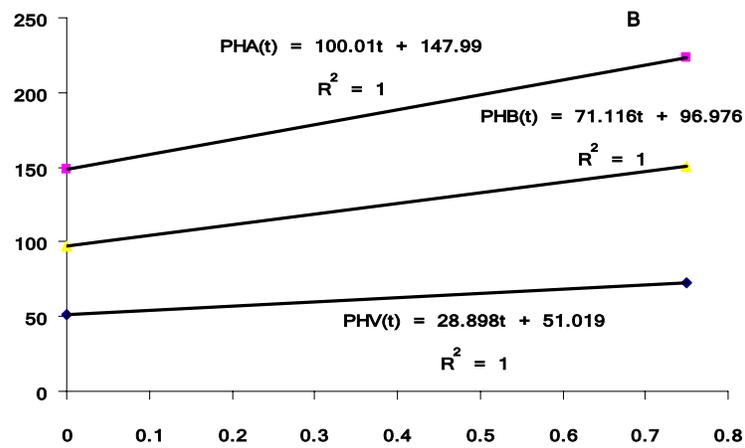
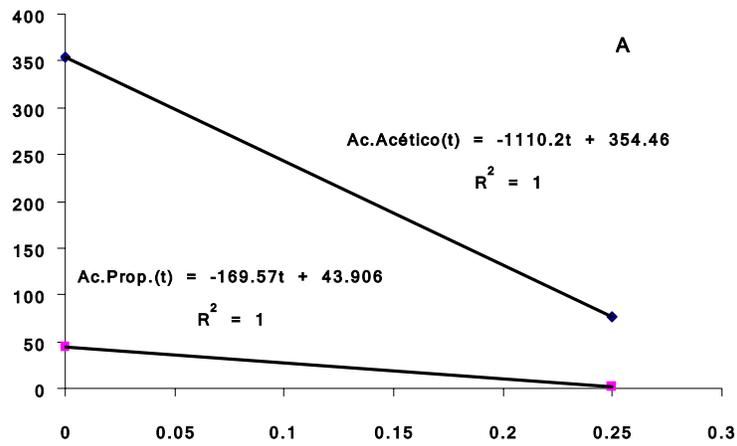


Figura 5-5 Tasas máximas de acumulación y degradación

Todos los sustratos son consumidos simultáneamente aunque con distintas tasas. La tasa de toma de sustrato general para el reactor SBR es de $-1317.9 \text{ mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para el ciclo mostrado en la figura 5-3 y la tasa de acumulación de PHA general es de $100.01 \text{ mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El cálculo de las tasas específicas se hizo utilizando la concentración promedio de biomasa en el reactor durante el ciclo, esto se hace ya que se considera un crecimiento no significativo de biomasa durante el ciclo. Como se puede ver en la tabla 5-2.

Tabla 5-2 Comportamiento de SSV en el SBR

Ciclo	SSV [mg L^{-1}] (promedio +/- sigma)	
EC-2	3.7	+/- 0.3
EC-3	3.7	+/- 0.15
EC-4	2.9	+/- 0.16
EC-5	1.6	+/- 0.093
EC-7	2	+/- 0.16
EC-8	1.7	+/- 0.21
EC-9	2.2	+/- 0.20
EC-10	1.4	+/- 0.17

La tabla 5-3 resume las tasas máximas promedio calculadas para los ciclos de estudio en el SBR de enriquecimiento selectivo por ciclo, estas fueron calculadas a través de una regresión lineal de los datos experimentales, ya que se observaron perfiles lineales durante el inicio de los ciclos, se muestran también las tasas específicas (considerando los valores experimentales de SSV [mgDQO L^{-1}] promedio de cada ciclo).

Tabla 5-3 Tasas máximas promedio por ciclo

#Ciclo	-QAGVt	\bar{q}_{AGVt}	QPHA	q_{PHA}	QPHB	q_{PHB}	QPHV	q_{PHV}	-QPHA	\bar{q}_{PHA}	-QPHB	\bar{q}_{PHB}	-QPHV	\bar{q}_{PHV}	PSC	SSV
2	197.810	0.054	1438.8000	0.390	900.3200	0.244	538.4500	0.146	2495.4000	0.676	1449.4000	0.393	1046.0000	0.283	0.144	3690
3	6.534	0.002	1174.4000	0.316	809.2500	0.218	365.1900	0.098	38.816	0.010	26.811	0.007	12.005	0.003	0.087	3720
4	115.040	0.041	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	44.810	0.016	74.292	0.026	29.482	0.010	0.023	2809
5	117.630	0.051	200.470	0.086	144.4600	0.062	56.006	0.024	177.170	0.076	130.750	0.056	46.416	0.020	0.053	2329
6	144.800	0.068	48.784	0.023	33.440	0.016	15.344	0.007	29.950	0.014	21.853	0.010	8.097	0.004	0.230	2118
7	203.510	0.103	291.630	0.148	231.4000	0.118	60.225	0.031	66.711	0.034	54.525	0.028	12.185	0.006	0.113	1967
8	738.830	0.426	353.260	0.204	253.1400	0.146	100.1200	0.058	102.580	0.059	73.877	0.043	28.703	0.017	0.179	1732
9	1317.9000	0.609	100.010	0.046	71.120	0.00	28.898	0.013	85.307	0.039	60.383	0.028	26.920	0.012	0.103	2163
10	683.020	0.478	225.140	0.157	175.9600	0.123	123.6500	0.087	12.102	0.008	9.607	0.007	2.555	0.002	0.271	1429
Promedio	391.675	0.204	479.062	0.171	327.3860	0.116	160.9850	0.058	339.205	0.104	211.278	0.066	134.707	0.040	0.134	2440
Máximo	1317.9000	0.609	1438.8000	0.390	900.3200	0.244	538.4500	0.146	2495.4000	0.676	1449.4000	0.393	1046.0000	0.283	0.271	3720
Mínimo	6.534	0.002	48.784	0.023	33.440	0.000	15.344	0.007	12.102	0.008	9.607	0.007	2.555	0.002	0.023	1429

Unidades -- Q: [$\text{mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$]; q [$\text{mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$]; PSC [mgPHA mgSSV^{-1}]; SSV [mgDQO L^{-1}]; N.D. No Disponible

El máximo rendimiento, en Peso Seco Celular, es de 27% mgPHA mgSSV^{-1} que se logra en el ciclo 10 con una tasa de acumulación de PHA máxima específica de $0.157 \text{ mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$, una tasa específica de consumo de AGV totales de $0.478 \text{ mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una tasa de degradación del PHA de $0.08 \text{ mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mientras que dos mínimos de acumulación de 2.3% y 5.3% suceden el ciclo 4 y 5 respectivamente, esto se relacionara con condiciones experimentales tratadas en la siguiente sección.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que la estrategia utilizada para seleccionar una biomasa capaz de almacenar PHA sobre cultivos mixtos utilizando condiciones dinámicas de alimentación basadas en abundancia-ayuno de sustrato es efectiva, aun utilizando como sustrato agua residual y no una mezcla sintética de AGVs (Serafim et al, 2004; Dionisi et al, 2004) y sin controlar la concentración relativa de ácidos presentes (Serafim et al, 2004). Adicionalmente esta capacidad prevalece a lo largo del tiempo. La conclusión que se obtiene de estos estudios es que a partir de un producto de desecho se logra obtener un producto de valor agregado como es el polímero biodegradable y que sin embargo es necesario ajustar las condiciones experimentales de modo que se obtengan rendimientos constantes y significativos en todos los ciclos del reactor.

5.2.2 Efectos del cambio de composición en el sustrato sobre la acumulación de PHA

Durante los estudios de ciclo se tuvo la oportunidad de estudiar el efecto de la composición de la alimentación sobre el PHA acumulado. El impacto de la concentración inicial de los AGVs de la alimentación fue observado al tener un cambio en la producción de la planta enlatadora, este cambio de producción tuvo repercusiones sobre la calidad, en términos de contenido de AGVs, del efluente obtenido.

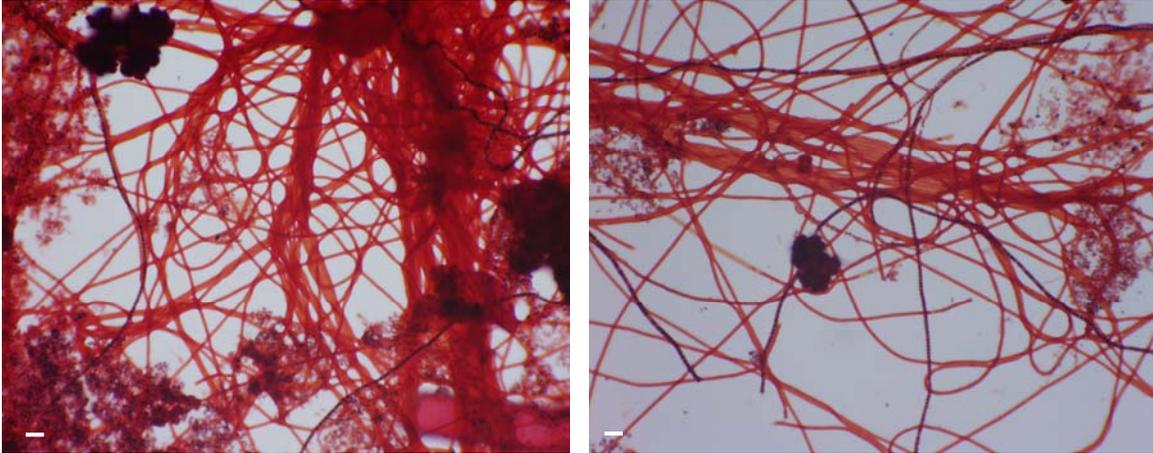
El sustrato pasó de tener una composición del 80% de AGVs y 20% de azúcares a una composición de 20% de AGV y el resto de azúcares. La composición de la alimentación fue estudiada, sin embargo, se decidió seguir alimentando con este sustrato bajo en AGVs para ver la afectación sobre el reactor.

El reactor mostró cambios rápidos. Se observó un cambio de coloración inmediato y un cambio de la consistencia del lodo en el reactor. Se obtuvo un licor mezclado altamente viscoso, que provocó que el lodo no sedimentara apropiadamente. La causa fue la aparición de organismos filamentosos que causan la flotación del lodo.

La falta de sedimentación ocasionó la pérdida paulatina de biomasa en el reactor. El efecto de la concentración de AGVs sobre la acumulación de PHA se explica en la tabla 5-3, donde se observa una disminución de la tasa de rendimiento PSC al bajar la concentración relativa de AGVs (EC-4 y EC-5) en la alimentación.

La baja concentración de AGVo en los ciclos 4 y 5 repercute sobre los bajos rendimientos obtenidos de PHA, mientras que no existe una relación lineal estrictamente entre la concentración de AGVo y el PSC alcanzado, se puede percibir que están estrechamente ligados. Las relaciones entre los parámetros muestran una compleja interpretación, la acumulación de PHA depende de todos ellos y estas tasas están ligadas a la concentración de SSV en el medio así como de la actividad microbiana. Otros factores que influyen son el origen del agua residual, los tiempos de alternancia entre ayunos y abundancia, la forma de aportación del sustrato y la composición del mismo. La finalidad de los experimentos SBR son las de obtener una biomasa capaz de acumular PHA propiciando la selección de los cultivos con esta capacidad sobre el resto, el diseño de pruebas por lotes permite determinar los parámetros de control involucrados y obtener sus valores óptimos y relaciones a fin de llegar a un modelo matemático.

Para analizar uno de estos parámetros, la composición del sustrato proporcionado, durante este período de “inestabilidad”, debido a la baja sedimentabilidad del reactor, se siguieron unas tinciones para observar qué tipos de bacterias se tenían. Además se esperaba tener valores nulos de acumulación de PHA, pero sorprendentemente esto no sucedió. Aun cuando las tasas de acumulación de PHA bajaron, se siguió obteniendo PHA en los análisis con cromatografía. Por esta razón se realizaron tinciones de acuerdo a Burdon (1946) con negro de Sudán B y safranina para observar si en realidad se seguía teniendo acumulación de PHA. Los resultados de las tinciones se presentan en las fotografía 5-5.



Fotografía 5-5 Tinciones con negro de Súdán B y safranina. PHA en negro, pared celular en magenta. Abundancia de organismos filamentosos que almacenan PHA en toda su estructura
Barra, 2.0 μm , Objetivo 100x, aceite de inmersión

Las tinciones revelaron la presencia de bacterias filamentosas, que por comparación visual puede tratarse de *Noistocoida limicola* o *Sphaerotilus natans*, que han sido caracterizadas como las causantes de espuma en los reactores biológicos. Entre las causas del surgimiento de estas bacterias se han identificado la mala configuración del sistema, la composición del sustrato y la afinidad de las bacterias filamentosas con el sustrato, entre otras (Vaiopoulou et al, 2007). En el reactor de enriquecimiento selectivo se presentó una baja considerable de la eficiencia de sedimentabilidad y ésta fue disminuyendo continuamente mientras los organismos filamentosos comenzaron a crecer gradualmente hasta dominar la comunidad bacteriana del reactor. El índice volumétrico de lodo (IVL) del lodo pasó de entre 80-100 mL g^{-1} hasta un IVL de 350 mL g^{-1} cuando se presentaron los problemas de sedimentabilidad. Sin embargo se identificó que los organismos filamentosos son capaces de acumular el polímero.

Debido a que la presencia de PHA se observó inclusive bajo las condiciones descritas en organismos filamentosos, se adicionó una mezcla sintética de AGVs al agua residual utilizada como sustrato para enriquecerla y observar el efecto que pudiera tener sobre el reactor. Se observó que la capacidad de acumular PHA se mantuvo en las bacterias (cocos y bacilos) remanentes y se detectó que los organismos filamentosos que también la tenían. Entonces se intentó regenerar las condiciones del reactor mediante el enriquecimiento del agua residual con AGVs de mezcla sintética (ácido propiónico y acético; 30:70).

El reactor mostró una recuperación en cuanto a la acumulación de PHA se refiere al aumentar la concentración de AGVs en el influente, como era de esperarse. Un estudio de ciclo del reactor con sustrato enriquecido con AGVs sintéticos se muestra en la figura 5-6.

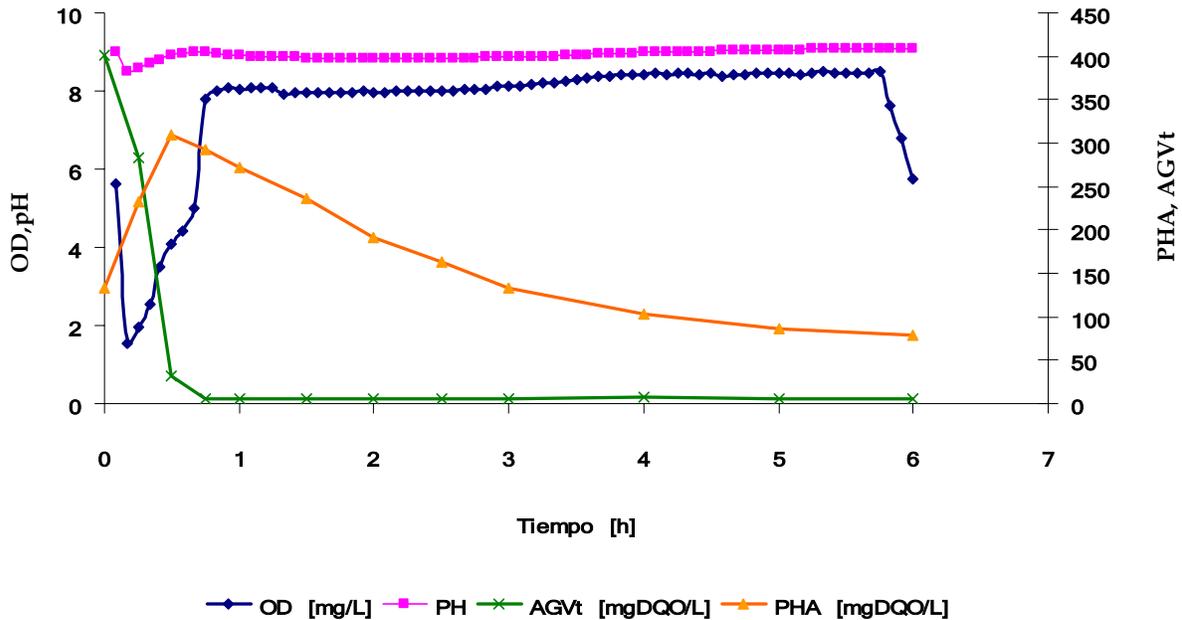
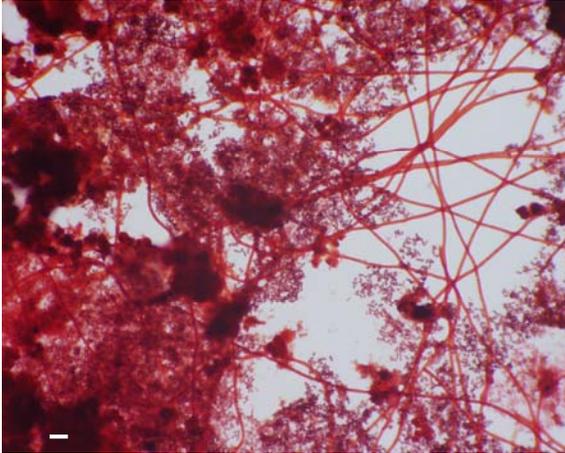


Figura 5-6 Ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo al adicionar mezcla sintética de AGVs para enriquecer el agua residual baja en AGVs.

En este ciclo se observó una tasa de rendimiento en peso seco celular máxima de (PSC, mgPHA mgSSV^{-1}) de 1.8%. Sin embargo el estado físico del lodo presente y la nula sedimentabilidad alcanzada en este punto que dificultaba la determinación de PHA, SSV y separación del efluente del lodo para determinar AGVs y DQOs, dieron por resultado la reinoculación del reactor. La composición de la alimentación en términos de concentración de AGVs, específicamente una baja razón AGV:Azúcares parece fomentar la aparición de organismos filamentosos, que si bien son capaces de acumular PHA evitan la sedimentabilidad del reactor, lo cual provoca dificultades para la realización de pruebas analíticas; más pruebas son necesarias para comprobar este enunciado. Quizá el problema podría solucionarse con un reactor de membrana, pero este sería un estudio adicional para ver la interacción de la misma con los polímeros.

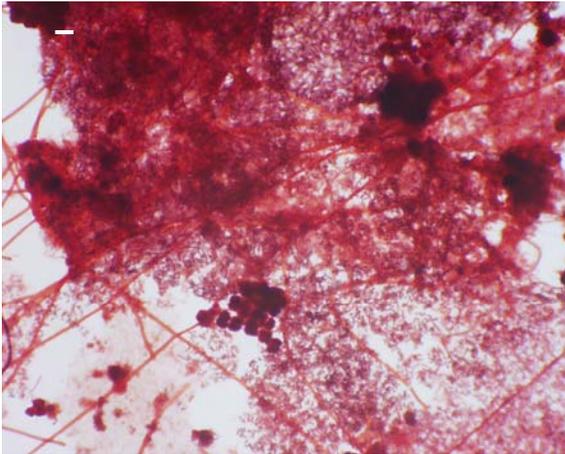
La reinoculación del reactor se realizó con lodo de la misma planta que se utilizó la primera vez. La producción de la planta enlatadora continuó originando efluentes bajos en AGVs por lo que un enriquecimiento de la misma con una mezcla de AGVs sintética se siguió a partir de este momento para simular las condiciones anteriores al cambio de concentración en el agua residual. Nuevas tinciones se realizaron para este nuevo inóculo y se muestran en las fotos 5-6 a 5-9.



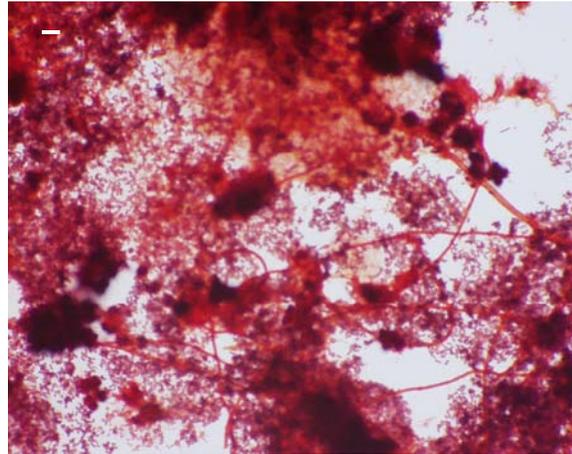
Fotografía5-6 Muestra de biomasa después de adición de mezcla de AGVs sintética para intentar revertir condiciones. Se observó una mejoría en el reactor.



Fotografía5-7 Persistencia de organismos filamentosos en el reactor aún después de aparente recuperación con la adición de mezcla de AGVs sintética. Reinoculación.



Fotografía5-8 Muestra después de 2 días de reinoculación. Aparición de PHA, lo que indica un enriquecimiento selectivo rápido en los lodos activados



Fotografía 5-9 Muestra después de 1 semana de reinoculación del reactor. Aumento de proporción de bacterias con PHA sobre toda la comunidad.

Barra, 2.0 μ m, Objetivo 100X, aceite de inmersión

De la observación al microscopio de las tinciones y de los estudios de ciclo y estudios batch realizados después de la reinoculación se observó que se obtenía acumulación de PHA rápidamente; la fotografía 5-8 corresponde a un ciclo después de dos días de reinoculación, y en la fotografía 5-9 una después de una semana de reinoculación. Esto permite concluir que la estrategia utilizada para realizar el enriquecimiento selectivo en el reactor es efectiva al seleccionar la biomasa capaz de almacenar PHA en poco tiempo y lograr que sea predominante sobre el resto de la comunidad.

Tan sólo 8 ciclos después de reinoculación se observó PHA y una semana después se observó mayor densidad de PHA en las tinciones, lo cual indica crecimiento de las bacterias acumuladoras de PHA sobre las que no lo hacen, favorecidas por las condiciones manejadas en el reactor.

A partir de aquí se siguieron estudios de ciclo regulares en el reactor como los mencionados antes, en el último estudio de ciclo realizado se obtuvo un 27% de PSC acumulado (Tabla 5-3).

La necesidad de tener una concentración controlada de AGVs en el influente es evidente, la disminución de AGVs en el influente resulta en cambios sustanciales en el medio del reactor y en acumulaciones de PHA. La aparición de organismos filamentosos ocasiona que la sedimentabilidad sea deficiente y la pérdida de biomasa es inevitable, si bien la acumulación de PHA se lleva a cabo en los organismos filamentosos, lo cual permite mantener acumulaciones de PHA de entre el 15-17% de peso seco celular. En este caso se observó una baja en la productividad de PHA y la pérdida de biomasa finalmente ocasiona un lavado del reactor. Se puede determinar que el correcto funcionamiento de un sistema integral de producción de PHA debe incluir un diseño considerando la fermentación del influente, cuya composición es variable, para obtener concentraciones de AGVs que permitan mantener o incrementar la acumulación de PHA y eviten la aparición de organismos filamentosos que pueden llevar a un colapso en el sistema.

En este respecto, el estudio de fermentadores con lodos primarios cuyo efluente pasa a ser influente de un reactor de enriquecimiento selectivo se lleva a cabo en la UQ. El reactor de enriquecimiento selectivo es alimentado con el efluente de los fermentadores, alcanzó estabilidad y se realizaron estudios de ciclo y pruebas de acumulación en lote en el mismo (resultados no mostrados). Se vio que el diseño es una clave del éxito en el proceso. En este caso el efluente de los fermentadores resultaba difícil de separar de los lodos por lo que se agregó un floculante al principio; este influente era rico en AGVs pero causó inestabilidad en el reactor de enriquecimiento selectivo. Sin embargo se necesita una mayor cantidad de lodos primarios en fermentadores para lograr obtener el volumen necesario de influente para el reactor de enriquecimiento selectivo. Al finalizar la visita de investigación ya se hacían pruebas de estudio de ciclo en el reactor alimentado con efluente de los fermentadores y se obtenían acumulaciones de 20% como máximo sin embargo se presentó problemas al aumentar el pH en los fermentadores.

5.2.3 Composición y propiedades del polímero obtenido

Se obtuvo un promedio de 78% de PHB y 22% de PHV de proporción monomérica para los estudios de ciclo en el SBR. La tabla 5-4 muestra las composiciones del polímero obtenido para un ciclo muestra a lo largo del tiempo y el promedio. Las pruebas para observar las propiedades del polímero obtenido se realizaron de acuerdo a Dai y colaboradores (2007). En cuanto a la composición del polímero obtenido se realizaron estudios de Espectroscopia NMR.

Tabla 5-4 Composición del polímero obtenido

#Muestra	t horas	HB	HV
		Monómero %	Monómero %
1	0	21	79
2	0.25	22	78
3	0.5	22	78
4	0.75	22	78
5	1	22	78
6	1.5	22	78
7	2	22	78
8	2.5	22	78
9	3	22	78
10	4	21	79
11	5	21	79
12	6	20	80
	Promedio	22	78

5.2.4 Pruebas de acumulación por lote

Se realizaron pruebas de acumulación de PHA con control de oxígeno disuelto con un punto de referencia de 4.2 mg L^{-1} como se ha descrito antes en el apartado 3.3. y en el apartado 4.4.

Cada pulso equivale a 2-4 mL de solución de AGVs en cada bombeo. El reactor se encuentra monitoreado en toda la reacción en cuanto a OD y pH, y estos resultados se despliegan en una PC. El sistema se encuentra conectado a un Controlador Lógico Programable (PLC). El software envía las señales de OD y pH al PLC; éste es capaz de enviar señales de activación a diferentes actuadores como respuesta a los valores de la señal obtenida de las variables de interés. En este caso la variable de control fue el pH o el OD.

Después de realizar varios experimentos controlando el pH se decidió tomar el OD como parámetro de control definitivo ya que se observó que al controlar el pH se obtenían menores acumulaciones de PHA.

El OD es registrado y la señal es procesada por un software de control en la PC. Mediante un algoritmo simple de comparación del valor de entrada contra uno de referencia (4.2 mg L^{-1} , en este caso) se toma una decisión. El algoritmo de decisión determina si el valor de entrada es mayor al valor de referencia; de ser así, se envía una señal a la bomba de alimentación previamente calibrada (actuador) para suministrar una cantidad definida de sustrato, de modo que el valor de OD comience a bajar. Este algoritmo se realiza durante toda la reacción. Cuando el valor de OD permanece mayor o igual a 4.2 mg L^{-1} a pesar de seguir agregando sustrato, se reconoce el final de reacción al alcanzar un punto de "saturación" del polímero intracelular.

La reacción se para en este punto para evitar el inicio de la degradación del polímero. El número de pulsos de alimentación agregada representaban 30 mgDQO cada vez.

La concentración de alimentación es de 25 gDQO L^{-1} , ya que se debe someter a la biomasa a altos valores de concentración de AGVs para obtener una máxima acumulación. Esto se debe a que durante los estudios de ciclo se observó que la acumulación de PHA aumenta al aumentar la concentración de AGVs y el tiempo de toma de sustrato es aproximadamente constante. En la figura 5-7 se ilustra el uso de la señal de OD como parámetro de control en las pruebas batch.

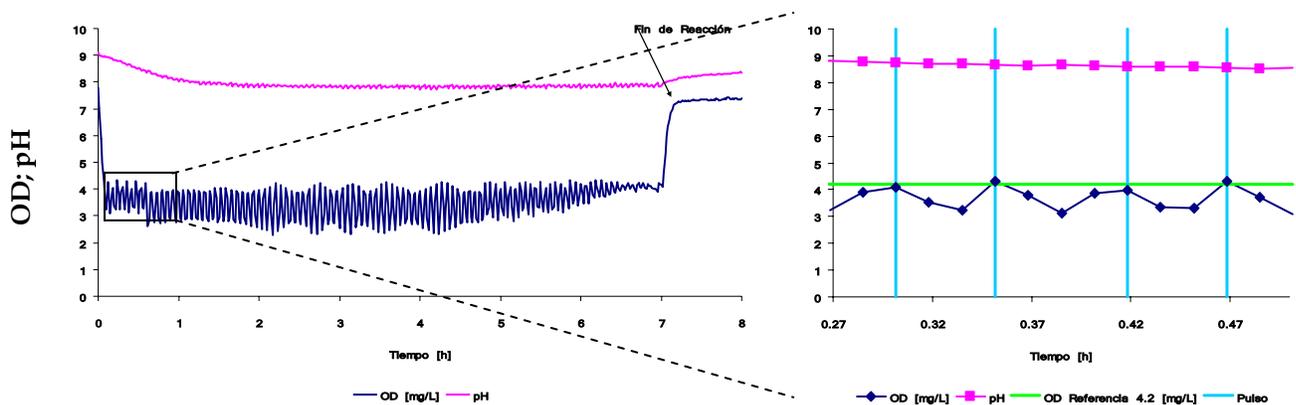


Figura 5-7 Uso de la señal de OD [mg L^{-1}] para determinar la adición de pulsos de alimentación. Término de la reacción al no obtener baja del valor de OD al agregar pulso.

En la gráfica con acercamiento se observan los pulsos de alimentación agregados cada vez que el valor de OD pasaba el valor de referencia de 4.2 mg L^{-1} ; algunas veces se observan pulsos antes de llegar a este valor; esto se debe a que la lectura del sensor tiene un retraso con respecto a la recepción en el software, además del intervalo de muestreo del sensor de OD. El espaciamiento entre pulsos fue variable en cada experimento debido a la actividad microbiana de cada inóculo. Así mismo, el número de pulsos y por lo tanto la cantidad de sustrato, medida como mgDQO , fue variable en cada experimento. Sin embargo se observó poca variabilidad en cuanto al DQO final agregado en cada experimento después de 8 horas de reacción. Este control con OD demostró ser más eficiente al reportar mayores acumulaciones de PHA al final de reacción que utilizando el pH como parámetro de control.

Estas pruebas tienen por objetivo evaluar los mecanismos distintos de remoción del sustrato (crecimiento, acumulación, etcétera) para poder optimizar el proceso y la cantidad de PHA acumulada. Los perfiles de los parámetros seguidos en estas pruebas para una prueba batch se muestran en la figura 5-8.

Un ejemplo de estudio de acumulación por lote, donde se obtuvo una acumulación máxima de peso seco celular (PSC) del 67%, durante el tiempo de experimentación en el AWMC se muestra en la figura 5-8. En ésta se muestra la acumulación de PHA con pendiente positiva durante toda la reacción, a diferencia de un ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo donde se permite la degradación del polímero. Esto permite concluir que al proporcionar el sustrato en pulsos propicia la acumulación del polímero sin degradación hasta alcanzar un punto de saturación intracelular donde se puede identificar un punto de inhibición para acumulación de polímero.

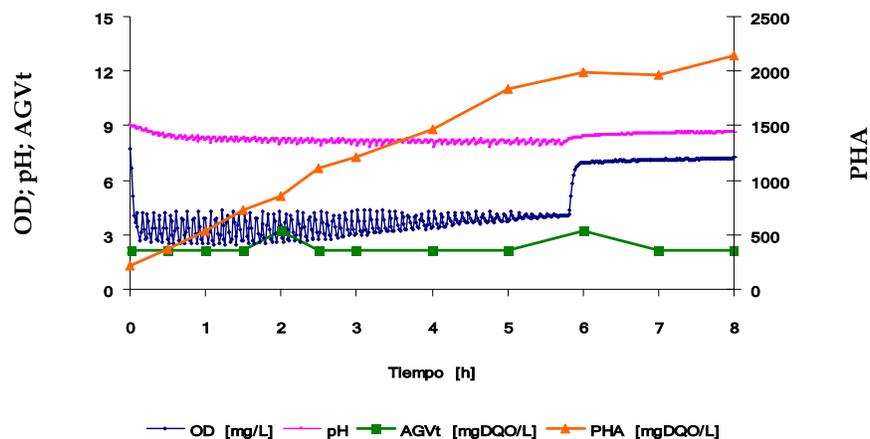


Figura 5-8 Prueba batch para biomasa del reactor de enriquecimiento selectivo, estrategia de alimentación por pulsos con control de OD, punto de referencia 4.2 mg L^{-1} .

Los mismos parámetros calculados para los estudios de ciclo se calcularon para los estudios batch, la máxima acumulación lograda fue del 73% (durante la estancia) y se calculo una QPHA de $335.93 \text{ mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ que es mayor que la reportada por Serafim y colaboradores (2004) de $140 \text{ mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con la diferencia, importante, de que se utilizó agua residual real como sustrato para el enriquecimiento selectivo de estos cultivos y se calculo un qPHA de $0.12 \text{ mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Por otro lado se realizaron pruebas de acumulación por lote utilizando como sustrato agua residual de la planta enlatadora sin diluir y se obtuvieron acumulaciones de hasta 60%, lo que es menor que con agua sintética. Una gráfica del comportamiento de parámetros utilizando agua residual real se muestra en la figura 5-9.

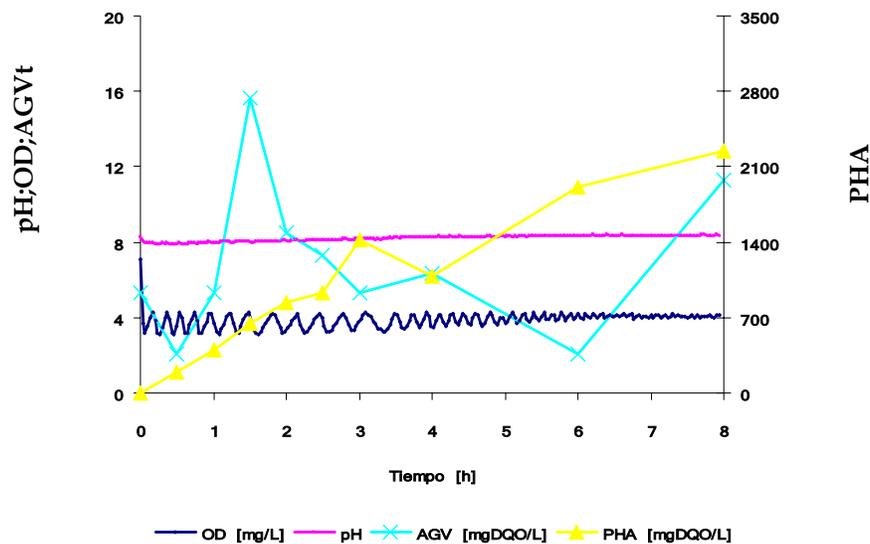


Figura 5-9 Prueba batch con agua residual real. OD [mg L^{-1}], pH en eje principal; AGVtdqo [mgDQO L^{-1}], PHAdqo [mgDQO L^{-1}] en eje auxiliar.

La acumulación máxima lograda en este estudio fue de 60% y QPHA máxima obtenida es de $391.6 \text{ mgDQO L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y qPHA máxima de $0.15 \text{ mgDQO mgDQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La productividad es mayor que la obtenida por Serafim y colaboradores (2004) con cultivos mixtos.

Al comparar la acumulación lograda en el reactor de acumulación por lote, se observa que la tasa de acumulación es mucho mayor que en los de enriquecimiento selectivo (véase la figura 5-10). En cada experimento se observó una tendencia a esperar aproximadamente 3 veces (valor máximo alcanzado) la acumulación alcanzada en el enriquecimiento selectivo.

Esto demuestra la necesidad de un sistema en tres etapas, una de fermentación del influente para alcanzar la concentración adecuada de AGVs, seguida de una fase de enriquecimiento selectivo para formar una comunidad predominante-mente acumuladora de PHA y finalmente una etapa de cultivo o fed-batch donde se lleva a su máxima capacidad acumuladora a la biomasa enriquecida para su extracción. Además se prueba nuevamente la eficiencia del reactor SBR de enriquecimiento selectivo, la factibilidad de utilizar agua residual real para el mismo y las oportunidades de optimización del proceso para igualar las acumulaciones alcanzadas en cultivos puros inclusive utilizando agua residual real en las pruebas fed-batch.

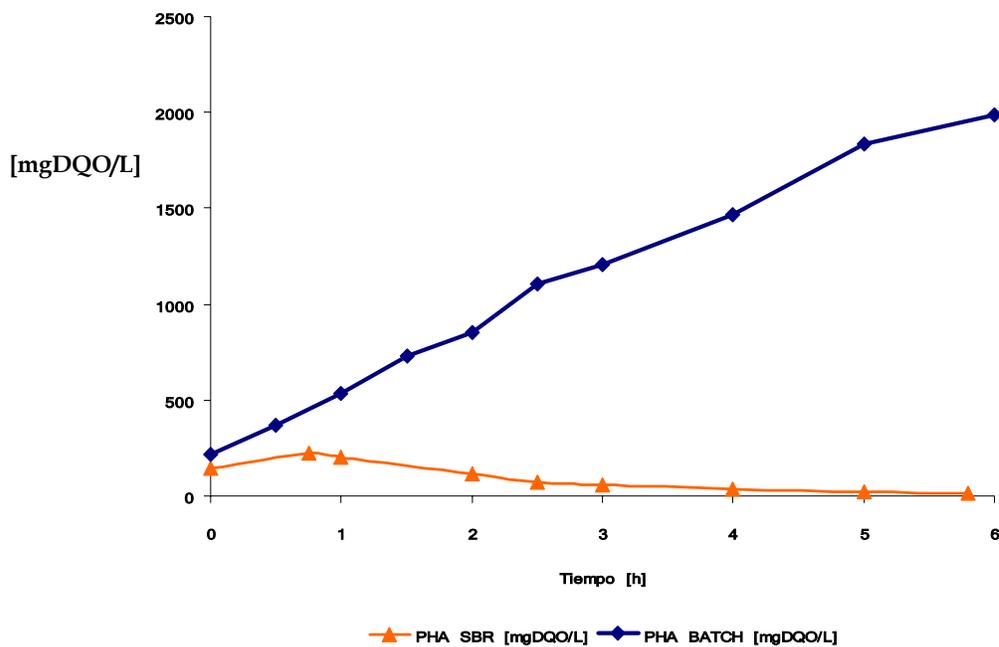


Figura 5-10 Comparación de acumulación de PHA en reactor de enriquecimiento selectivo y reactor batch.

El potencial de utilizar el agua residual real prefermentada para realizar acumulaciones batch es alto, como se ha mostrado en los resultados obtenidos, que son parecidos a los obtenidos con el agua residual sintética. La factibilidad económica de producir PHA a gran escala depende entre otros factores de la productividad y la acumulación lograda en peso seco celular, del costo del sustrato utilizado y por otro lado del conocimiento de los procesos de acumulación y degradación de sustrato para poder optimizar el proceso.

5.2.5 Comparación con cultivos puros

Los resultados obtenidos en el reactor de enriquecimiento selectivo y en las pruebas batch, al ser comparadas con aquellas obtenidas en cultivos puros, son aún bajos, aunque se logró superar los valores de PHA acumulados en cultivos mixtos reportados hasta ahora (Punrattanasin, 2001). Además se debe tomar en cuenta que es un estudio realizado con agua residual real de una planta enlatadora de frutas y jugos. El control de la concentración de AGVs fue un parámetro importante que determina la acumulación alcanzada en el reactor, por lo que para hacer un proceso con rendimientos constantes, se concluye que la etapa de prefermentación del sistema propuesto es necesaria para tener un control sobre la concentración de AGVs disponibles en el influente del reactor de enriquecimiento selectivo.

La acumulación máxima lograda, hasta el final de la visita académica, fue de 73% en PSC, lo cual es ligeramente bajo con cultivos puros donde se han obtenido acumulaciones de hasta 88% (Wang y Lee, 1997). Sin embargo, con estudios en lodos activados se han obtenido acumulaciones de 58% (Punrattanasin, 2001) pero utilizando sustrato sintético; por lo que se puede concluir que el uso de agua residual real tiene potencial para ser utilizada como sustrato de producción de PHA y de este modo poder realizar un sistema integral de tratamiento de agua residual y de producción de PHA. La optimización de este proceso dependerá del análisis de cambio de condiciones y de la posibilidad de realizar un control adecuado del proceso mediante modelos de los procesos o seguimiento en línea de los productos intracelulares.

5.3 Fase III

La base para la fase III se encuentra descrito en las secciones 5.1 y 5.2; esta fase se desarrollo utilizando como antecedentes los resultados observados en la fase II y en parte en la I. El desarrollo de la metodología alternativa para cuantificación de PHA a la CG se encuentra como la parte más importante del estudio de tesis ya que es una aportación nueva al campo de conocimiento y estudio de los PHA. Es necesario tener de base los estudios de ciclo y de acumulación por lotes antes descritos para desarrollar esta metodología.

5.3.1 Cuantificación de polihidroxicanoatos con espectrofotometría infrarroja (FTIR) y PLS

La espectroscopía con FTIR en conjunto con el análisis de mínimos cuadrados parciales se propone como un método alternativo para cuantificación segura y rápida de polihidroxicanoatos (PHA) en cultivos bacterianos mixtos. Los sistemas estudiados producen polihidroxicanoatos a partir de agua residual real. El objetivo de esta fase fue aplicar este método a un complejo sistema de cultivos mixtos y producir un modelo de predicción con una precisión similar a la que se logra con la técnica de referencia estándar, la cromatografía de gases (CG). Treinta y tres muestras fueron usadas para generar un modelo PLS basado en los espectros obtenidos con el FTIR. La cuantificación con CG fue realizada como una referencia para la concentración de PHA. Los valores analizados estuvieron en un rango de 6.9% - 58.3% PHA como peso seco celular. El modelo obtenido muestra muy buenos resultados. Un modelo PLS con 13 factores tiene un error estándar de predicción de 2.66%. Este modelo fue validado con la predicción precisa de 13 muestras que estaban en un rango de 3.2% - 42.6% PHA como peso seco celular. Este método reduce el tiempo analítico para la cuantificación de PHA de 24 horas a sólo media hora y elimina los productos de desecho peligrosos obtenidos en el método estándar (CG). El trabajo demostró un nivel de exactitud y reproducibilidad al cuantificar PHA en un sistema de cultivos mixtos similar a los obtenidos en la técnica analítica de CG.

5.3.2 Bandas de PHA

Los espectros adquiridos mostraron picos o bandas que han sido asociados con la presencia de PHB (Figura 5-11 – Espectro A) en cultivos puros (Kansiz et al, 2000) cerca de 1735cm^{-1} así como en el rango de $\sim 1200\text{cm}^{-1}$ a $\sim 900\text{cm}^{-1}$. En otros cultivos puros, estas bandas han sido reportadas también en $\sim 1724\text{cm}^{-1}$ con fuertes picos o bandas entre ~ 1280 y $\sim 1300\text{cm}^{-1}$ (Beun et al, 2002), mientras en otro estudio la banda entre $\sim 1728\text{cm}^{-1}$ y $\sim 1744\text{cm}^{-1}$ fue encontrada como característica de la presencia de PHB (Hong et al, 1999). La posición exacta del pico o banda varía con la cristalinidad del PHA presente y también parece variar debido al tamaño de cadena del PHA.

Debido a que el presente estudio utilizó cultivos mixtos y, ya que tanto el PHB como el PHV están presentes, existe la necesidad de justificar que estas bandas se deben a la presencia de PHA. Espectros de varias muestras de cultivos mixtos sin PHA fueron adquiridas. Estas muestras fueron tomadas del mismo sitio que el inóculo del SBR y aireado por dos horas para eliminar cualquier PHA presente.

El espectro resultante no mostró picos en $\sim 1735\text{cm}^{-1}$ o en $\sim 1280\text{cm}^{-1}$ como puede verse en la Figura 5-11 (espectro B). En ambos casos se presentaron picos distintivos en $\sim 1637\text{cm}^{-1}$ y en $\sim 1536\text{cm}^{-1}$. Estos han sido reportados como la banda amida I y la banda amida II, respectivamente, y están asociadas con proteínas celulares (Kansiz et al, 2000). Se nota que estas dos bandas aparecen independientemente de si hay PHA o no, sin afectación por la presencia de este compuesto. Por esta razón se usan para normalizar los espectros.

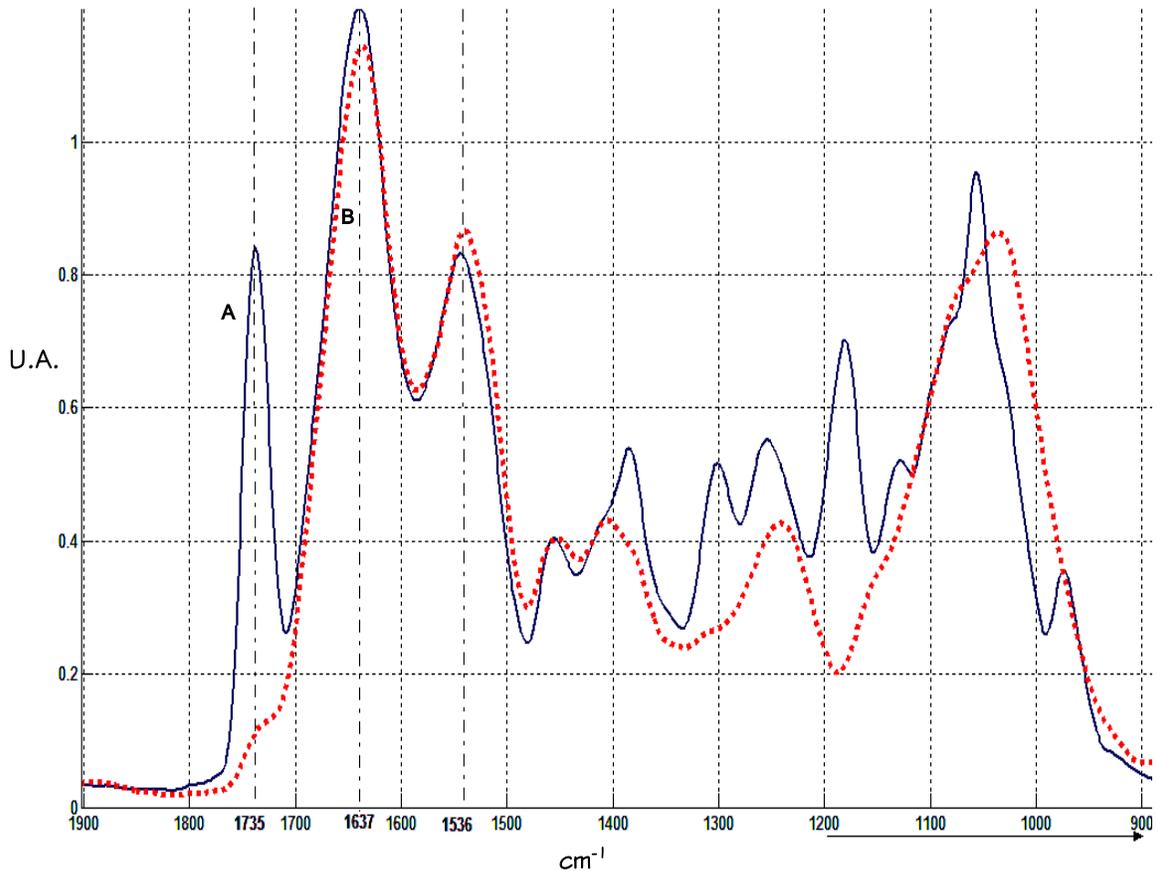


Figura 5-11 Espectro típico para cultivos mixtos con PHA (espectro A) y sin PHA (espectro B). Los picos de PHA se ven en A y faltan en B en las $\text{wn} = 1735\text{cm}^{-1}$ y 1280cm^{-1} . Bandas amida I y II en $\sim 1637\text{cm}^{-1}$ y $\sim 1536\text{cm}^{-1}$ utilizadas para normalizar el espectro. A.U.- Unidades Arbitrarias.

Diferentes espectros de estándares fueron también colectados de polímeros químicamente puros: copolímero PHB/PHV (92:8), copolímero PHB/PHV (70:30), copolímero PHB/PHV (88:12), PHB puro (todos de Sigma Chemicals).

Los picos en cada estándar mostraron la aparición constante de picos alrededor de $\sim 1735\text{cm}^{-1}$ y $\sim 1240\text{cm}^{-1}$ con la variabilidad entre ellos debida con mayor probabilidad al contenido diferente de PHV en las muestras. La figura 5-12 muestra espectros para los estándares sin pretratamiento. Es de notar la diferencia con las bandas de cultivos mixtos. Una muestra de compuesto puro permite distinguir fácilmente picos característicos, mientras que en cultivos bacterianos, especialmente los mixtos, se presentan una gran cantidad de sustancias que podrían enmascarar los picos de interés, por lo que se requiere de un pretratamiento adecuado de los espectros antes de ser utilizados para modelos de predicción. También se debe tener una buena preparación de muestra y se busca quitar bandas asociadas a vapor de agua, especialmente.

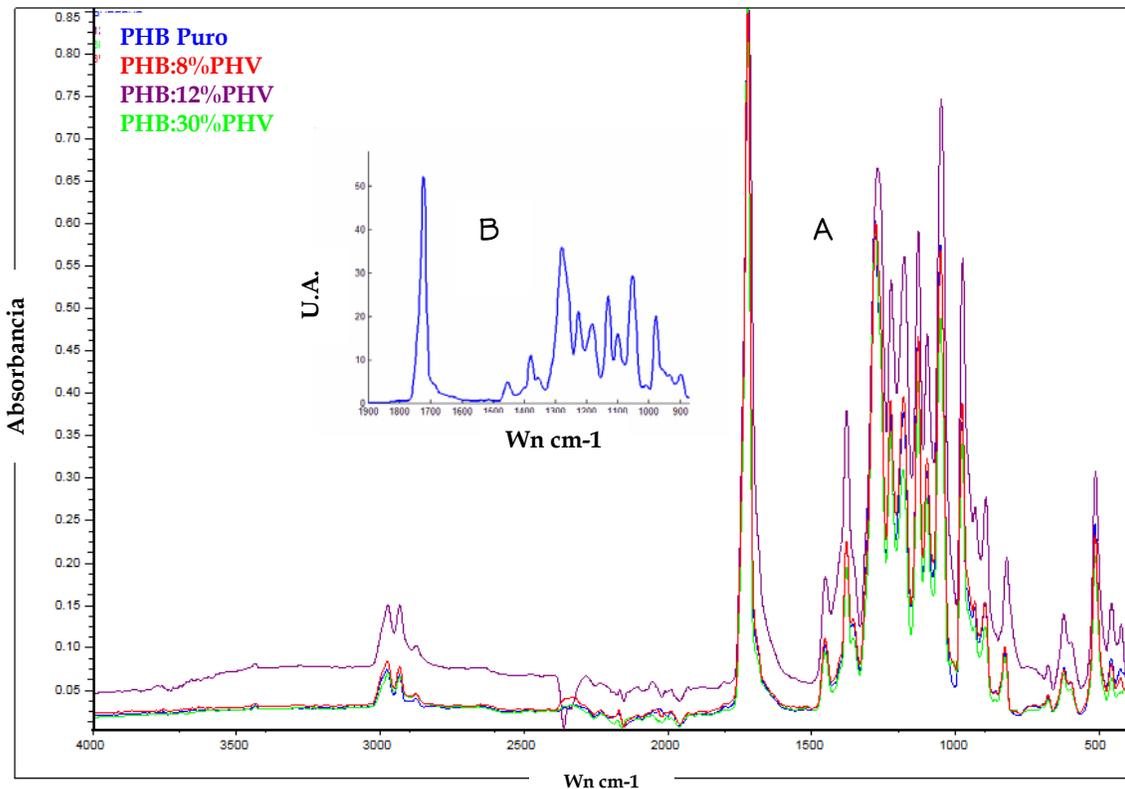


Figura 5-12 Espectros de estándares de PHB puro y copolímeros de PHB:PHV. Obsérvese los picos distintivos para todos. Los estándares en 1735cm^{-1} y alrededor de 1240cm^{-1} . Espectros sin pretratamiento (A). Espectro de PHB puro con pretratamiento (B)

5.3.3 Asignación de bandas

La interpretación de los espectros se realizó mediante la asignación de bandas características de grupos funcionales que se saben presentes en la estructura molecular del PHB:PHV.

La estructura del copolímero PHB:PHV es la mostrada en la figura 5-13.

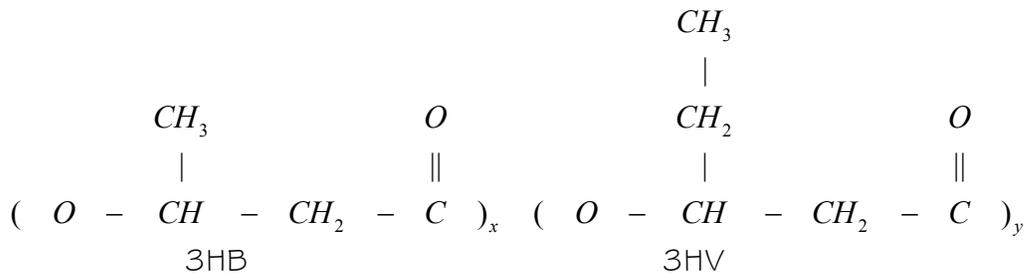


Figura 5-13 Estructura molecular del copolímero PHB:PHV

El espectro obtenido para cada muestra se interpreta en conjunto con el obtenido para una muestra de biomasa sin PHA. En ambos espectros se observan dos bandas características en la longitud de onda de $\sim 1637 \text{ cm}^{-1}$ y en $\sim 1536 \text{ cm}^{-1}$ (ver Figura 5-11), llamadas banda de amida I y amida II respectivamente; las cuales se consideran como bandas asociadas con las proteínas debido a que el enlace de amida peptídico es un grupo funcional básico y repetitivo en las proteínas. La intensidad de las bandas puede ser indicativa de la cantidad de bacterias y se pueden utilizar para normalizar los espectros (Kansız et al, 2000).

Se observan también los picos distintivos en $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$ y a partir de $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ y hasta $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$ asociadas a presencia del copolímero PHB:PHV. En la figura 5-14 se observa un espectro de biomasa con PHA después de pretratamiento de datos.

Un espectro, después de pretratamiento, se muestra en la figura 5-14, es un espectro característico de muestras obtenidas durante el estudio. Al analizar las bandas de las muestras, se observan bandas en los siguientes rangos: $\sim 1732-1736.3 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1637-1647 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1534-\sim 1545 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1380-1399 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1237-1242 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1300-1302 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1253-1260 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1178-1180 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1129-1131 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1050-1056 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 972-976 \text{ cm}^{-1}$.

Los espectros para los estándares muestran bandas representativas en $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1379 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1279 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1178 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1131 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1054 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 978 \text{ cm}^{-1}$. Por otro lado las bandas de muestras sin PHA se encuentran en $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1540-1536 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1031 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 461-464 \text{ cm}^{-1}$.

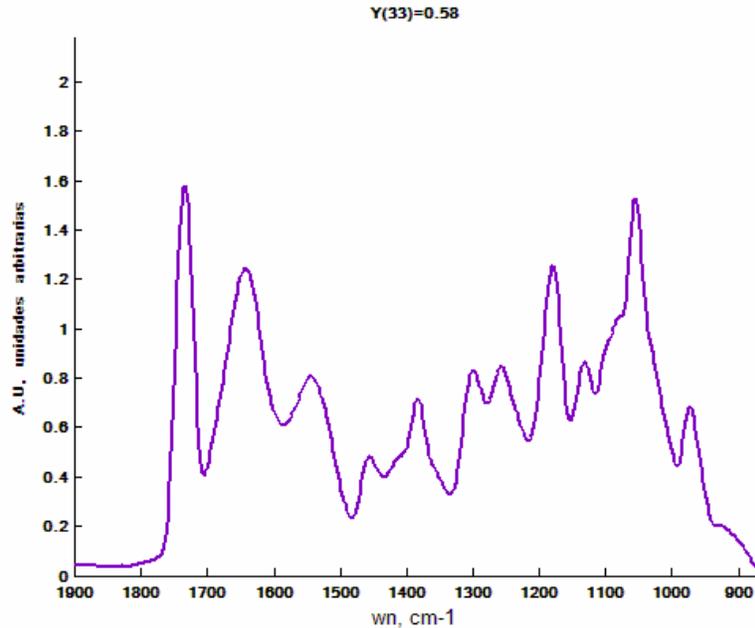


Figura 5-14 Espectro característico de muestra de biomasa conteniendo PHB:PHV, espectro después de pretratamiento. A.U. Unidades Arbitrarias

De acuerdo a la teoría de interpretación de espectros de infrarrojo, se pueden asignar grupos funcionales a las bandas encontradas, aparte de las bandas asociadas a proteínas inherentes a la biomasa independientemente de que contenga o no PHA. En la tabla 5-5 se muestra la asignación de bandas para reconocer los grupos funcionales presentes y determinación de que compuestos que contribuyen a la aparición de una banda en una longitud de onda específica.

Tabla 5-5 Asignación de bandas de espectros (Kansiz et al, 200; Jarute et al, 2004; Xu et al, 2002; Kansiz et al, 22007)

Longitud de onda [cm ⁻¹]	Asignación	Aportación
~1732-1736	Para absorancias de ésteres debido al grupo funcional carbonilo C=O. Vibración de tensión de intensidad fuerte.	Lípidos, ácidos grasos volátiles y PHB y PHV
~1637-1647	C=O banda asociada con las proteínas debido a que el enlace de amida peptídico es un grupo funcional básico y repetitivo en las proteínas. Vibración de tensión de intensidad fuerte.	Proteínas, para vibración de tensión se le conoce como banda Amida I.
~1534-1545	N-H banda asociada con las proteínas debido a que el enlace de amida peptídico es un grupo funcional básico y repetitivo en las proteínas. Vibración de flexión de intensidad media.	Proteínas, se conoce como banda amida II
~1380-1399	Absorbancia de deformación por -CH ₃ y -CH ₂ . Las vibraciones simétricas de CH ₃ ocurren entre 1390-1370 cm ⁻¹ . Deformaciones de -CH probablemente. Vibraciones de flexión de intensidad media.	CH ₃ de proteínas, y también del PHA. Algunos grupos alifáticos Aportes de PHB y PHV
~1300-1302, ~1237-1242, y ~1253-1260	P=O absorbancia de el fosfodiéster de ácidos nucleicos (DNA y RNA). Pueden confirmar la presencia del grupo t-butil. Presencia de ácidos carboxílicos, enlace O-C (a veces se reportan dos bandas en esta zona). Vibración de tensión de intensidad fuerte.	Puede deberse a proteínas fosforiladas o también a productos de almacén de polifosfato y presencia de ácidos carboxílicos.
~1178-1180, ~1130, ~1129-1131, ~1050-1056, y ~972-976	Posiblemente presencia del grupo isopropilo. C-O-C de polisacaridos. Presencia de enlace C-O. Vibración de tensión de intensidad fuerte.	Contribuciones de PHB y PHV

De acuerdo a la asignación de bandas se puede confirmar la presencia de los grupos funcionales presentes en el copolímero PHB:PHV, esencialmente el enlace C=O en ~1732-~1736 cm⁻¹. Sin embargo, ha de notarse que la banda asignada para este enlace en los estándares es en ~1720 cm⁻¹; para explicar esta variación se considerará la preparación de muestra y la relación que esto tuvo con la cristalización del polímero muestreado.

5.3.4 Cristalización de copolímero

La espectrofotometría infrarroja de tipo FTIR es sensible al medio molecular local, y es esto por lo que ha sido ampliamente utilizada para estudiar los cambios de conformación de las macromoléculas durante la fusión y cristalización (Xu et al, 2002). Las bandas en ~1741 cm⁻¹ y ~1724 cm⁻¹ se asignan a vibraciones de tensión de la fase amorfa y a la cristalina del enlace C=O, respectivamente.

En la fase cristalina los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo están localizados más cerca de los átomos de hidrógeno en los segmentos más cercanos, de modo que el momento bipolar decrece y es esto lo que causa que la vibración se lleve a cabo en longitud de onda menor. Por otro lado la banda alrededor de $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ es asignada a vibraciones simétricas de de grupos CH_3 . Esta banda aumenta al aumentar la temperatura y producir fusión del polímero; en este trabajo se reportó un cambio a $\sim 1384\text{ cm}^{-1}$.

Xu y colaboradores (2002) observaron un pequeño incremento de intensidades de las bandas cristalinas y una reducción de las intensidades de la fase amorfa cuando el PHB fue calentado por encima de los 75°C . Esto se atribuyó a que ocurra más cristalinización debido a que se mejora la movilidad de moléculas. Al calentar más allá de los 160°C , la absorbancia de las bandas cristalinas y las amorfas mostraron cambios abruptos hasta que la muestra se fusionó completamente a 180°C .

Después se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta llegar a 25°C , lo cual produjo cambios en las bandas también como se muestra en la figura 5-15. Esta figura muestra el comportamiento que sería esperado en las muestras tomadas durante el presente experimento, ya que las muestras fueron calentadas en un horno a 100°C para obtener una película que pudiera servir en la toma de muestra. La cristalinización comienza cuando se enfría a 120°C (Xu et al, 2002). Puede entonces concluirse que al calentar las muestras de PHA en el horno para obtener una película en vez de liofilizarlas como es sugerido por Kansız y colaboradores (2000) se expone el polímero a una cristalización.

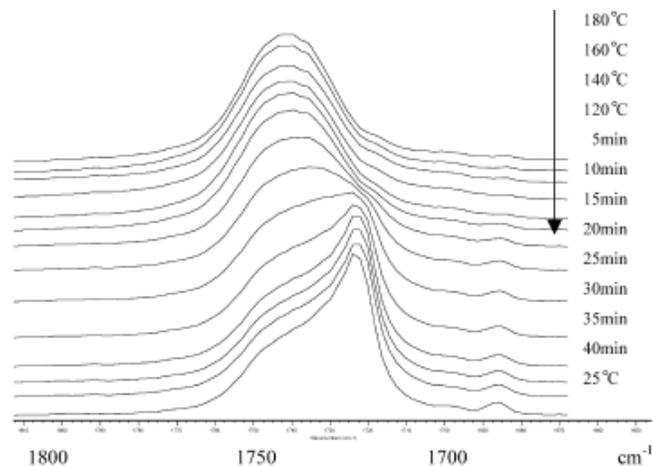


Figura 5-15 Variación de la banda en $1720\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$. $\text{C}=\text{O}$ (Xu et al, 2002).

En el presente trabajo se observan los cambios en longitudes de onda mostrados en la tabla 5-6. La banda en $\sim 1178 \text{ cm}^{-1}$ se mantiene en $\sim 1178-1180 \text{ cm}^{-1}$ en las muestras; $\sim 1131 \text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1129-1130 \text{ cm}^{-1}$ son otra banda que se mantiene constante en ambos casos; $\sim 1054 \text{ cm}^{-1}$ para el estándar y $\sim 1050-1056 \text{ cm}^{-1}$ en muestras; finalmente $\sim 978 \text{ cm}^{-1}$ en estándares y $\sim 972-976 \text{ cm}^{-1}$ en muestras.

Tabla 5-6 Análisis de cambios de longitudes de onda de bandas encontradas

Biomasa con PHA	Biomasa sin PHA	Estándares
$\sim 1732-1736 \text{ cm}^{-1}$	Ausente	$\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1637-1647 \text{ cm}^{-1}$	$\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$	Ausente
$\sim 1534-1545 \text{ cm}^{-1}$	$\sim 1540-\sim 1536 \text{ cm}^{-1}$	Ausente
Ausente	$\sim 1405 \text{ cm}^{-1}$	Ausente
$\sim 1380-1399 \text{ cm}^{-1}$	Ausente	$\sim 1379 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1300-1302 \text{ cm}^{-1}$		$\sim 1279 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1237-1242 \text{ cm}^{-1}$	$\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$	$\sim 1260 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1253-1260 \text{ cm}^{-1}$		
Ausente	$\sim 1031 \text{ cm}^{-1}$	Ausente
$\sim 1178-1180 \text{ cm}^{-1}$		$\sim 1178 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1130 \text{ cm}^{-1}$		$\sim 1131 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1129-1131 \text{ cm}^{-1}$	Ausente	$\sim 1054 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 1050-1056 \text{ cm}^{-1}$		$\sim 978 \text{ cm}^{-1}$
$\sim 972-976 \text{ cm}^{-1}$		
Ausente	$\sim 461-\sim 464 \text{ cm}^{-1}$	Ausente

Por otro lado de acuerdo a Kansiz y colaboradores (2007) los cambios espectrales más evidentes durante la cristalización del PHA se encuentran en la banda $1740-1722 \text{ cm}^{-1}$, estos cambios se dan tanto en intensidad como en posición de banda.

La banda del grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ cambia de una banda relativamente amplia centrada en 1738 cm^{-1} a una ligeramente más fuerte y mucho más pronunciada en 1722 cm^{-1} . Estas bandas se asignan a un estado amorfo y cristalino, respectivamente. También se observaron cambios entre ambas fases en las longitudes de donde en 1186 cm^{-1} y 1133 cm^{-1} ; esto no sucedió en el presente trabajo, ya que estas bandas se mantuvieron aproximadamente iguales en los estándares y en las muestras.

Se observó la banda asignada al grupo carbonilo alrededor de $\sim 1732\text{--}\sim 1736\text{ cm}^{-1}$, y ningún otro cambio significativo se observó ni en 1186 cm^{-1} ni en 1133 cm^{-1} como lo sugieren tanto Xu y colaboradores (2002) como Bayarı y Severcan (2005); para el estándar esta banda se presentó alrededor de $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$. Esto sugiere que el polímero medido se encuentra en una fase amorfa al obtenerse el espectro de infrarrojo.

Este resultado puede sugerir la razón PHB:PHV del polímero medido, ya que se ha observado (Xu et al, 2002) que mientras que el PHB tiene una temperatura de fusión de $\sim 179^\circ\text{C}$ y un grado de cristalinidad de aproximadamente 60-70%; al incorporar HV y formar un copolímero PHB:PHV la temperatura de fusión disminuye hasta un mínimo de 84°C , para un 30% de HV.

En este caso las proporciones de HB:HV obtenidos para las muestras de las que se adquirió el espectro se muestran en la tabla 5-7.

Tabla 5-7 Composición de copolímero obtenido por cada muestra

#	HB %	HV	#	HB %	HV
1	69	31	17	64	36
2	60	40	18	64	36
3	59	41	19	58	42
4	58	42	20	58	42
5	57	43	21	59	41
6	74	26	22	70	30
7	66	34	23	44	56
8	65	35	24	42	58
9	65	35	25	41	59
10	65	35	26	43	57
11	72	28	27	45	55
12	64	36	28	71	29
13	63	37	29	39	61
14	74	26	30	38	62
15	65	35	31	37	63
16	64	36	32	38	62

El valor promedio obtenido para el PHB es de 58% y del 42% para el PHV lo que indica que la proporción, en promedio, es mayor de PHB que de PHV, siendo alta la proporción promedio de PHV.

Recordando que la proporción de proporción PHB:PHV en estudios de ciclo es de 78% y 22% respectivamente; se observa que la estrategia de acumulación en fed-batch favorece la formación de un copolímero con mayor contenido de PHV lo cual mejora las propiedades físicas y mecánicas del material obtenido.

Este resultado puede alentar un estudio sobre la posibilidad de relacionar las absorbancias obtenidas en los espectros con las proporciones de PHB:PHV en las muestras y demostrar la utilidad del FTIR para dar información sobre la estructura molecular y propiedades físicas de los PHA almacenados en cultivos mixtos como se ha reportado para PHB y copolímeros como sustancias puras (Kansiz et al, 2007; Nakamoto, 1986). De acuerdo a Xu y colaboradores (2002) y con el resultado obtenido puede afirmarse que el punto de fusión del copolímero de las muestras está por debajo de 179°C y la cristalinidad es menor que 60-70% reportado para PHB puro.

Del uso del FTIR y la interpretación de bandas en este estudio se puede concluir:

1. Al no seguir la liofilización para ser congruente con la preparación de la muestra para cromatografía de gases, por los cambios de temperatura que sufre la muestra, se favorece un estado amorfo de PHA.
2. El rango de temperatura que se maneja en el procedimiento que se esta usando hace que la cristalización a un estado amorfo sea más favorable si existe alto contenido de PHV en el copolímero.
3. En las muestras hay una cierta proporción HB:HV que favorece la cristalización a un estado amorfo.

Xu y colaboradores (2002) señalan que, la naturaleza cristalina del PHB lo hace inadecuado para aplicaciones *in-vivo*, ya que las enzimas que degradan el PHB son menos eficientes sobre el polímero cristalino que en estado amorfo. Por lo que el reto microbiológico y genético es producir y aislar estos polímeros de modo que permanezcan lo más amorfo posible.

5.3.5 Pretratamiento de datos

En 7 pruebas batch en un período de 5 semanas, 33 muestras fueron colectadas y se obtuvieron 32 escaneo de cada espectro. Para cada muestra se obtuvieron de 5 a 6 espectros (replicas). La varianza entre réplicas no fue significativa y esto se ilustra en la figura 5-16.

Los 5 a 6 espectros disponibles para cada muestra fueron promediados y con los 33 espectros resultantes se realizó la calibración del modelo por PLS. Para cada espectro el rango de longitudes de onda para análisis fue entre $\sim 1900\text{cm}^{-1}$ y $\sim 900\text{cm}^{-1}$, ya que esta zona incluye todas las contribuciones del PHA (Kansiz et al, 2000) y se reduce el tiempo de cálculo en el análisis. El preprocesamiento de datos incluyó un suavizado con un filtro Savitzky-Golay de cuarto orden (polinomial) con un tamaño de ventana de 15. Este filtro realiza una regresión local polinomial sobre una distribución (tamaño de ventana) para determinar el valor de suavizado para cada punto. Una corrección de línea base se corrió después utilizando el software OMNIC (Nicolet). Durante el tomado de muestras también se corrió un algoritmo para excluir las bandas de CO_2 y de H_2O , ya que las muestras fueron preparadas sin ser liofilizadas y a pesar de haber evaporado la solución salina puede haber restos de agua que podrían enmascarar bandas de interés.

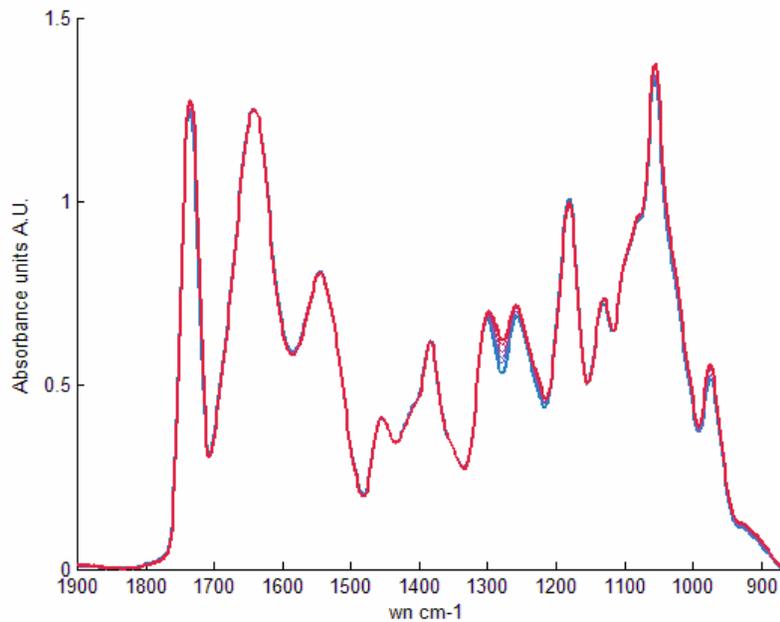


Figura 5-16 6 Réplicas del espectro de una muestra tomada de una prueba batch en $t=4$ h. La varianza entre espectros es mínima a través del rango de longitudes de onda de interés. El promedio de estos espectros replicados fue utilizado en el modelo PLS. A.U. Unidades Arbitrarias

Para compensar por las inevitables diferencias en cantidad de biomasa, cada espectro fue normalizado con respecto a las bandas amida I y amida II, ya que, como fue discutido previamente, no incluyen ninguna contribución del PHB y PHV. Esto fue hecho mediante la división del espectro completo por la media de las absorbancias en $\sim 1637\text{cm}^{-1}$, $\sim 1536\text{cm}^{-1}$ y $\sim 1587\text{cm}^{-1}$ (esta última longitud de onda corresponde al valle entre los picos amida I y amida II). Un ejemplo de los resultados después y antes del pretratamiento de datos se muestra en la figura 5-17. Nótese cómo todos los espectros de la derecha parecen coincidir en estas longitudes de onda, así como el efecto del suavizado con el filtro digital.

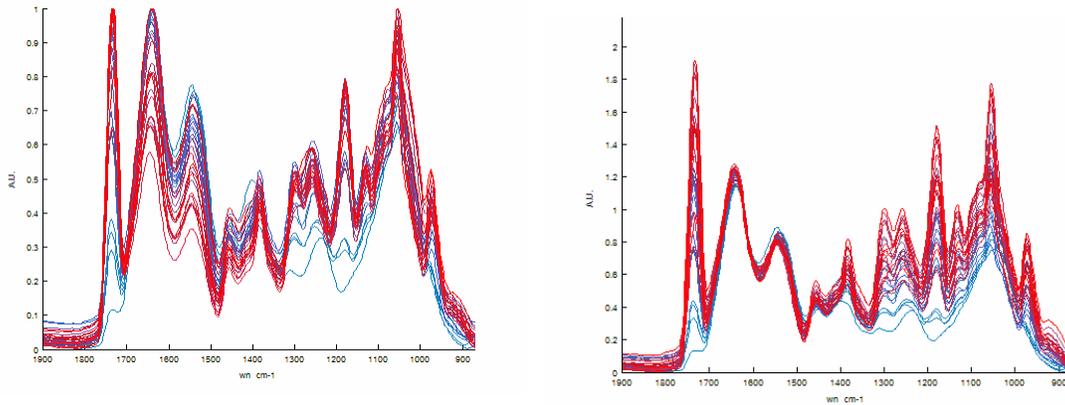


Figura 5-17 Datos sin pretratamiento A; datos con pretratamiento B

En la figura 5-18, los espectros de 3 muestras representativas pretratadas con diferentes concentraciones de PHA intracelular se presentan. Queda claro en la figura que los picos que representan PHA son de algún modo proporcionales a la concentración del PHA en la biomasa de cultivos mixtos. Sin embargo a diferencia de la CG el pico no puede declararse linealmente proporcional a la concentración del compuesto, por lo que no se puede realizar simplemente una relación lineal, y esto es porque varios picos contribuyen a un solo compuesto mientras que en la CG un solo pico representa un solo compuesto y el área bajo la curva es proporcional a la concentración del compuesto.

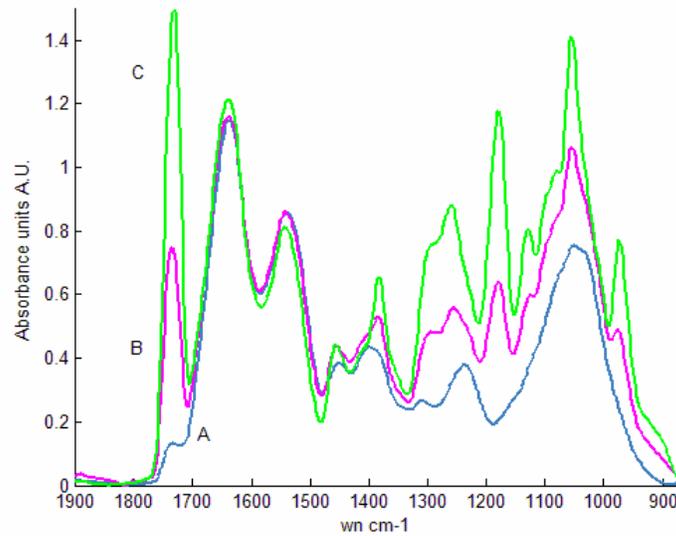


Figura 5-18 Espectros pretratados para varias muestras de pruebas de acumulación batch; A=2%, B=24% y C=58%. A.U. unidades arbitrarias.

5.3.6 Cálculo del error del análisis con CG

Para calcular y comparar el error involucrado en la técnica analítica de CG, durante dos pruebas batch se analizaron cinco depósitos de la misma muestra cada una con cinco réplicas con CG. Para estas muestras, el análisis con CG reportó un contenido de peso seco celular de PHA de 15.5%, 34.6%, 46%, 48% y 47%, respectivamente con una desviación estándar de 5.8 y un error estándar de 2.6% de PHA. La técnica FTIR propuesta debe tener al menos un nivel de exactitud similar o superior para ser considerada como una alternativa al análisis CG.

La tabla 5-8 muestra un estudio para obtener el error involucrado en la cuantificación de PHB:PHV con cromatografía de gases.

Tabla 5-8 Estudio de error involucrado en la cromatografía de gases

#Muestra	t	Réplicas por muestra CG	PHB	PHV	PHA
	horas	#	mg L ⁻¹		
1	0	A	128.2	52.4	180.6
		B	129.8	53.3	183.1
		C	128.3	52.3	180.6
		D	131.5	53.5	185
		E	148.1	57.5	205.6
2	2	A	295.3	184.2	479.5
		B	320.9	191.9	512.8
		C	325.7	195.7	521.4
		D	314.6	188.7	503.3
		E	318.1	190.4	508.5
3	4	A	508	319.5	827.5
		B	512.9	321.4	834.3
		C	493.3	310.5	803.8
		D	500	315	815
		E	495.9	311.8	807.7
4	5	A	508.7	319.5	828.2
		B	518.3	325.2	843.5
		C	521	327.2	848.2
		D	515.3	322.5	837.8
		E	505.5	315.9	821.4
5	6	A	502.8	316.4	819.2
		B	496.2	312.8	809
		C	504.9	318	822.9
		D	496.7	312.7	809.4
		E	503.8	321.2	825

De este modo para cada muestra en el tiempo t se obtienen 5 depósitos (A-E) para obtener contenido de PHB:PHV en cromatografía de gases. De la misma muestra se toman 5 depósitos para obtener su espectro en el FTIR, de las cuales se obtendrá el contenido de PHB:PHV utilizando el modelo obtenido con PLS y así poder comparar el error involucrado en ambas técnicas. Como se muestra en la tabla 5-10 los valores obtenidos de contenido de PHB:PHV con CG.

La tabla 5-9 contiene los valores obtenidos para SST y SSV para cada muestra.

Tabla 5-9 Análisis de error de determinación de SST y SSV para muestras de determinación de error de CG

	Análisis de Sólidos [mg L^{-1}]									
	t=0		t=2		t=4		t=5		t=6	
	SST	SSV	SST	SSV	SST	SSV	SST	SSV	SST	SSV
1	1.44	1.24	1.62	1.46	2.02	1.82	1.94	1.86	1.78	1.66
2	1.22	1.12	1.58	1.44	1.98	1.8	1.98	1.84	1.76	1.7
3	1.52	1.26	1.66	1.48	2.02	1.86	1.62	1.52	2.02	1.82
4					1.92	1.78				
5					1.86	1.72				
6					1.78	1.7				
Promedio	1.39	1.21	1.62	1.46	1.93	1.78	1.85	1.74	1.85	1.73
Desviación Estándar	0.16	0.08	0.04	0.02	0.10	0.06	0.20	0.19	0.14	0.08
Error estándar	0.09	0.04	0.02	0.01	0.01	0.02	0.11	0.11	0.08	0.05

Tabla 5-10 Cálculo del error involucrado en la cromatografía de gases

	PHA GC ANÁLISIS [mg L^{-1}]									
	t=0		t=2		t=4		t=5		t=6	
	PHB	PHV	PHB	PHV	PHB	PHV	PHB	PHV	PHB	PHV
A	128.2	52.4	295.3	184.2	508	319.5	508.7	319.5	502.8	316.4
B	129.8	53.3	320.9	191.9	512.9	321.4	518.3	325.2	496.2	312.8
C	128.3	52.3	325.7	195.7	493.3	310.5	521	327.2	504.9	318
D	131.5	53.5	314.6	188.7	500	315	515.3	322.5	496.7	312.7
E	148.1	57.5	318.1	190.4	495.9	311.8	505.5	315.9	503.8	321.2
Promedio	133.18	53.80	314.92	190.18	502.02	315.64	513.76	322.06	500.88	316.22
Desviación estándar	8.45	2.14	11.70	4.23	8.24	4.73	6.50	4.50	4.12	3.61
Error estándar	3.78	0.95	5.23	1.89	3.69	2.12	2.91	2.01	1.84	1.61

Para la determinación del error de la técnica se tomó el promedio de los errores estándar de las muestras obteniendo un promedio de **2.66%** para la cromatografía de gases. Este error se debe a la técnica de cromatografía de gases. Para la técnica de sólidos se obtuvo un error promedio estándar de 0.06%. Debido a que el error debido a la biomasa fue filtrado en la técnica con FTIR, no se calculó un error de la CG involucrando el error proveniente de los sólidos.

Para poder emplear como error de la técnica de cromatografía de gases el promedio de los errores estándar para las 10 muestras, es necesario verificar que las varianzas no sean significativamente diferentes. Se requiere probar la hipótesis:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 \quad H_1: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2$$

Para esto se puede utilizar la prueba de Bartlett que permite rechazar esta hipótesis nula calculando el estadístico (Vargas, 2006).

$$X_0^2 = 2.3026 \frac{(N - a) \log_{10} S_p^2 - \sum_{i=1}^a (n_i - 1) \log_{10} S_i^2}{1 + \frac{1}{3(a-1)} (\sum_{i=1}^a (n_i - 1)^{-1} - (N - a)^{-1})} \sim \chi_{a-1}^2$$

Si las varianzas son idénticas, entonces χ^2 es cero y se rechaza **H_0** , si:

$$X_0^2 > \chi_{\alpha, a-1}^2.$$

En este caso los resultados para el análisis del estadístico de Bartlett se presentan en la tabla 5-11:

Tabla 5-11 Resultados de prueba de Bartlett para probar varianzas

Muestra	Tamaño	Varianza
1	5	71.3670
2	5	4.5600
3	5	136.7820
4	5	17.8570
5	5	67.9270
6	5	22.4130
7	5	42.3080
8	5	20.2430
9	5	16.9370
10	5	13.0220

La prueba de Bartlett para igualdad de varianzas resulta en un valor del estadístico chi-cuadrada de $\chi^2 = 15.2272$ con 9 grados de libertad. Para comparación de varianzas se calcula el estadístico **F** de Fisher cuyo valor, en este caso, es **F** = 1.6919 con **GL1** = 9, **GL2** = 39. De aquí se sigue que la probabilidad asociada al estadístico chi-cuadrada es **P** = 0.0849. La probabilidad asociada para la prueba Chi-cuadrada es igual o mayor que 0.05, por lo tanto, se acepta la hipótesis nula de que las varianzas son homogéneas.

5.3.7 Calibración del Modelo

Para decidir el número de factores y, por lo tanto, el modelo utilizado para la predicción de contenido de PHA, una prueba de validación cruzada dejando un dato fuera (*leave-out-one cross-validation*) fue realizada sobre los 33 espectros. En este proceso se utilizó un programa iterativo en el que cada vez uno de los espectros de los 33 se dejaba fuera y los 32 restantes se utilizaban para el modelo de calibración de PLS, mientras que el espectro restante se usa para validar.

Para probar el buen ajuste del modelo, el error estándar de predicción (**SEP**, *Standard Error of Prediction*) fue calculado como la desviación estándar de los errores de predicción para los datos de validación (Kansız et al, 2000). El Criterio de Información de Akaike (*Akaike Information Criterion*, **AIC**) fue también calculado, el cual es un parámetro para evitar la sobre-parametrización del modelo (sobre ajuste) para definir el número ideal de componentes (**r**) para el modelo PLS. El coeficiente de regresión (**R²**) para la curva de ajuste lineal entre el valor calculado y el valor real fue calculado. Como idealmente la gráfica del valor predicho contra el valor medido debería ajustar una función identidad, **R²** indica qué tan bien los puntos ajustan a esta función identidad. Todos los análisis fueron hechos utilizando Matlab 6.5. El primer intento reveló un **SEP** mínimo de 2.66%, que se logró para **r** = 13 antes de alcanzar una sobre-parametrización. En este punto la validación cruzada predijo valores de concentración de PHA (**Ye**) con una desviación estándar promedio de $\pm 2.66\%$ del valor real de concentración de PHA (**Y**); es decir que $\%Ye = \%Y_{real} \pm 2.66\%$. El **R²** para este número de componentes fue de 0.96. En un intento para mejorar este **SEP**, los datos fueron analizados con un programa en Matlab donde se discriminaban, a elección, los espectros deseados y de este modo 5 espectros considerados como *outliers* o datos espurios se detectaron y fueron removidos para el modelado. Los 28 espectros restantes fueron utilizados para una nueva calibración.

Sin embargo, no se logró ninguna mejora en el **SEP**. Para confirmar el número óptimo de componentes para el modelo, el **AIC** y el **SEP** en conjunto fueron utilizados y los resultados se muestran en la figura 5-19. El mínimo **SEP** correlacionado con un mínimo **AIC** fue tomado como referencia para definir el número de componentes definitivo para el modelo PLS. El **AIC** refleja el ajuste general del modelo a un conjunto específico de datos, el **AIC** penaliza por la adición de parámetros, y por lo tanto, selecciona un modelo que ajuste bien pero con el mínimo número de parámetros (r); en este caso el **AIC** fue utilizado para medir el ajuste de los diferentes modelos con diferentes factores y se elige el mejor que es aquel que muestra el menor valor de **AIC**. Lo que alentó la decisión fue que el **SEP** mostró un comportamiento decreciente hasta alcanzar los 13 factores, después de los cuales comienza a subir, lo que puede significar una sobreparametrización. La gráfica 5-19(D) muestra las iteraciones de la validación cruzada para distintos factores. Para 13 factores se encontró también el mayor R^2 , el cual no pudo ser mejorado al remover *outliers* o datos espurios.

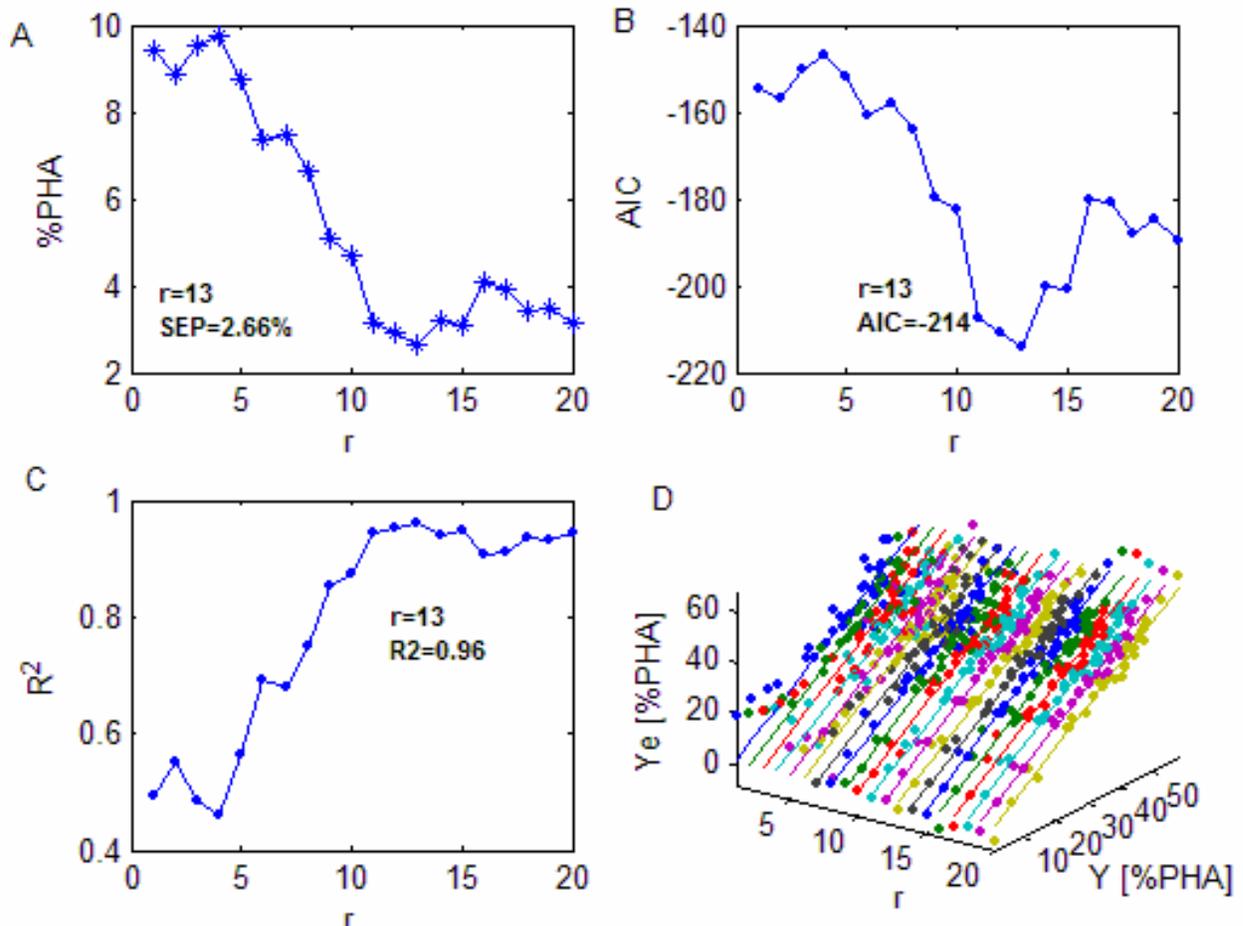


Figura 5–19 Determinación del número de componentes para usarse en el modelo PLS. (A) El SEP (expresado como %PHA) para cada r probado, con un mínimo en $r=13$. (B) El AIC para cada r . (C) El coeficiente de regresión graficado contra r , $R^2=0.96$. (D) Una gráfica de validación cruzada.

Después de la determinación de un número de factores para el modelo mediante validación cruzada, la matriz \mathbf{B} y el vector \mathbf{b} son calculados usando los 32 espectros (con la ecuación (4-12)), proporcionando un modelo final para predicción del contenido de PHA en biomasa de cultivos mixtos. La gráfica resultante de la predicción del contenido de PHA contra el contenido medido de PHA se presenta en la figura 5-20.

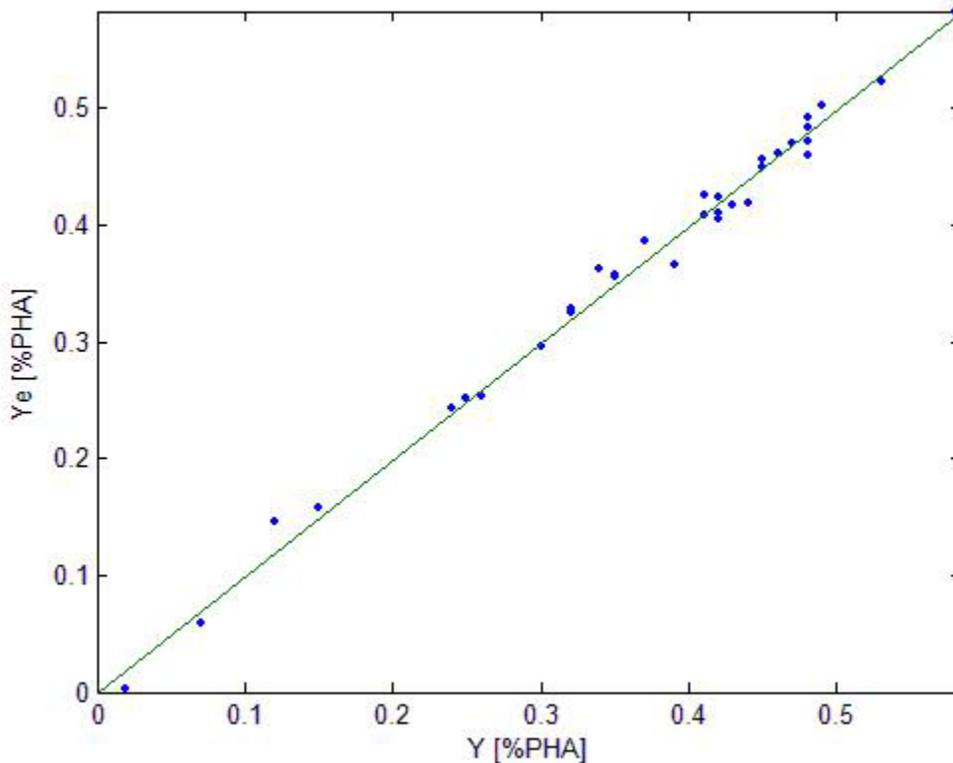


Figura 5–20 Modelo de predicción optimizado para contenido de PHA en biomasa de cultivos mixtos. La gráfica es para $r=13$ y esto resulta con un SEP=2.66% y una $R^2 = 0.96$.

5.3.8 Predicción del contenido de PHA

Para validar el modelo de predicción, dos pruebas adicionales fueron realizadas. La primera involucró dejar 4 espectros del modelo de calibración y después se utilizó el modelo para predecir el contenido de PHA de estos cuatro espectros. Esto se hace con Matlab mediante un programa hecho a la medida para que la elección y cantidad de éstos pueda hacerse aleatoria o por elección. Esto se hizo con los espectros que se usaron para la calibración.

Esta prueba se realizó con la mayor cantidad de combinaciones de espectros posibles obteniéndose resultados similares al mostrado (tabla 5-12 y figura 5-21). La segunda prueba utilizó el modelo para predecir el contenido de PHA de 13 muestras nuevas y por lo tanto no utilizadas en el modelo de calibración (Tabla 5-13 y figura 5-22). El contenido de PHA de estas muestras se conoce por CG para comparar con los resultados obtenidos con el modelo. La tabla 5-12 muestra uno de los resultados para la primera prueba descrita mientras la tabla 5-13 muestra los resultados para la segunda prueba.

Tabla 5-12 Resultados comparando el valor real y el valor predicho con el modelo para el contenido de PHA en muestras seleccionadas que se dejaron fuera del modelo.

#Muestra	1	2	3	4
Y [%PHA]	32	12	30	53
Ye [%PHA]	32.87	16.53	30.06	53.01
E [Y-Ye %]	0.87	4.53	0.06	0.01

Los resultados indican que el modelo es, en general, capaz de predecir con relativa exactitud el contenido de PHA de muestras removidas del modelo. El error que puede considerarse muy grande (4.53%) y que puede verse en la muestra #2 es causado, con mayor seguridad, por el bajo contenido de PHA en esta muestra. Se puede ver en la figura 5-21 que la mayor parte de las muestras para calibración están en el rango de 30%-50%. Debido a que no se consideraron un gran número de muestras para contenidos de PHA por debajo del 30%, el modelo tiene una calibración no tan buena por debajo de 30% de contenido de PHA y por lo tanto puede no ser tan capaz de predecir el contenido de PHA de la biomasa. Como se observa en la gráfica de distribución de errores, para todos los valores se obtiene un error igual o menor al 2.66% calculado excepto para la muestra #2 donde el error es de 4.53%.

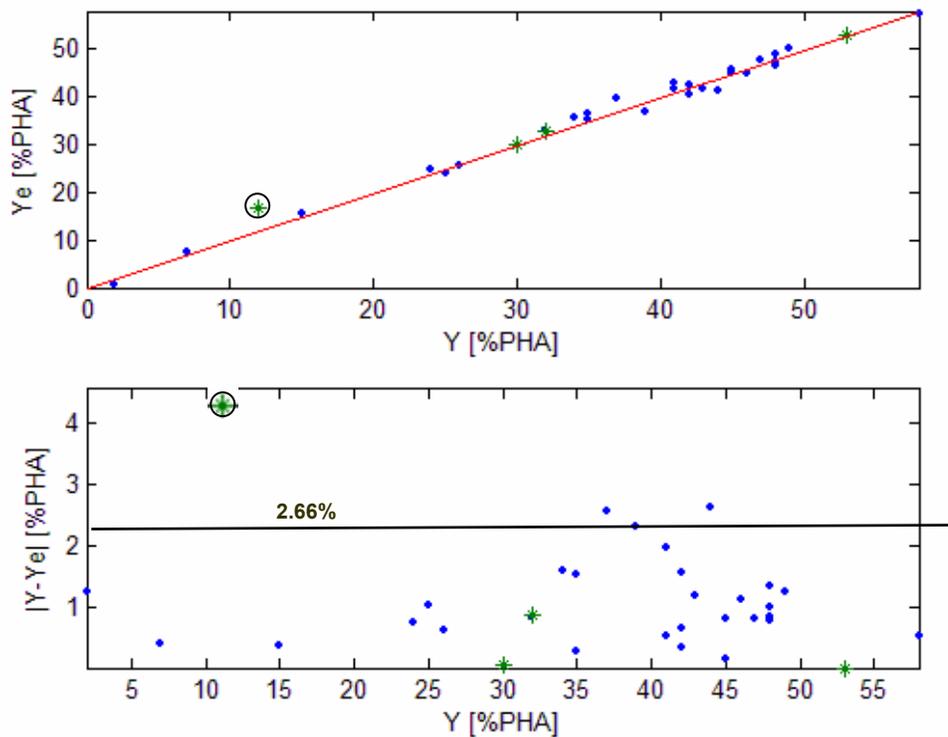


Figura 5-21 Prueba para el modelo con 4 predicciones de espectros dejados fuera al modelar:

* valores predichos para los espectros dejados fuera, * predicciones para los espectros incluidos. Y- PHA medido; Ye-PHA predicho.

Tabla 5-13 Contenidos de PHA predichos para muestras no usadas en la calibración del modelo.

Muestra #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Y [%PHA]	6.8	3.2	5.6	8.6	14.13	18	29.12	3	32.5	34.5	36.3	38.9	42.6
Ye [%PHA]	7.8	1.54	26.2	13.29	14.81	19.6	39.63	43	31.6	33.9	32.6	40.7	47.2
E [Y-Ye %]	1	1.66	21.12	4.69	0.68	1.6	10.48	13	0.9	0.6	3.7	1.8	4.6

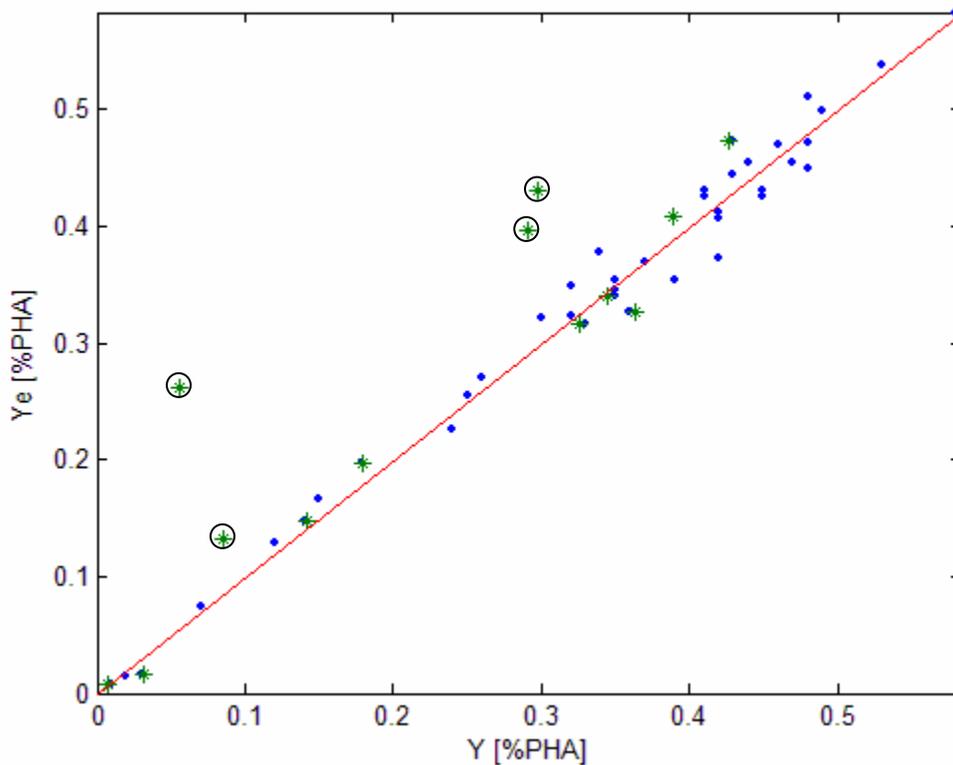


Figura 5-22 Pruebas para el modelo con 13 nuevos espectros. * Valores predichos para los datos nuevos. · Predicciones para los espectros incluidos. Y- PHA medido; Ye-PHA predicho.

Los resultados, una vez más, indican que el modelo es capaz de predecir con exactitud el contenido de PHA en biomasa de cultivos mixtos.

En los resultados, 7 muestras están muy por debajo del error esperado de predicción de 2.66% del modelo de predicción, 3 muestras (#4, #11, #13) están por arriba del 2.66% esperado sin una diferencia significativa; mientras que las 3 muestras resaltadas en la tabla están considerablemente fuera el rango esperado de error. Se revisó la preparación de muestra de estas muestras y se encontró que las muestras resaltadas en la gráfica pasaron por el mismo proceso de preparación salvo que éstas fueron congeladas y analizadas al día siguiente debido a la no disponibilidad del equipo de FTIR. Las películas obtenidas no fueron secadas ni se hizo un intento por retirar el agua de las mismas. Estas condiciones son compartidas por estas cuatro muestras, por lo que se puede asumir que el error fuera de rango es debido a que estaban contaminadas con agua durante el proceso de obtención del espectro. Las bandas encontradas en estas muestras son muy acentuadas y provienen de vibración y rotación de la estructura que aparece en moléculas de gas y no en líquidos ni sólidos.

Cuando los espectros son tomados correctamente minimizando el vapor de agua y tomando un espectro de referencia con las mismas características, como se hizo en las demás muestras, no se presentan este tipo de problemas. Sin embargo sería posible hacer su corrección mediante la sustracción del espectro de vapor de agua de cada uno de los espectros manualmente. Estos resultados fuera de rango para el error calculado se deben pues a problemas experimentales en cuanto a preparación de muestra se refiere. Esto resultó en picos de PHA inhibidos por el ruido de las moléculas del agua presentes.

Estos resultados demostraron la importancia del proceso de preparación de muestra para obtener resultados de buena calidad y confiables. La muestra #4 está por debajo del rango <30% que mostró, en la primera prueba de validación, no poder proporcionar resultados exactos, pero el 4.69% de error encontrado en esta muestra no es significativamente diferente del visto anteriormente.

Los resultados de las pruebas de validación indican que el modelo de predicción desarrollado en este trabajo es bueno. El promedio de error de 2.66% es comparable al visto en el análisis de CG para PHA intracelular en cultivos mixtos. No se probó ninguna otra técnica alternativa y por lo tanto no es posible determinar qué tan exacto es el método FTIR, ya que depende de los resultados de la CG para desarrollar el modelo de predicción utilizado. La robustez del modelo ha sido parcialmente probada mediante el uso de dos fuentes de biomasa (2 distintos reactores), pero aún se requiere mayor investigación sobre un rango más amplio de biomasa para entender completamente qué efectos traería esto sobre el modelo.

Una vez que se toma en cuenta que la biomasa estudiada no es un cultivo puro, cuyo origen es de dos reactores distintos (pero con funcionamiento similar) con diferencias entre las comunidades microbianas durante el periodo de estudio y el polímero estudiado es una combinación de PHV y PHB, el nivel resultante de error en el modelo de predicción de FTIR es muy pequeño al ser comparado con la complejidad del sistema estudiado. A pesar de esto, se puede decir que la técnica de FTIR es al menos tan buena como la usual de CG para análisis de PHA intracelular en cultivos mixtos, y tiene el potencial de ser mucho más flexible con mucho menos tiempo para preparación de muestra. Tiene el potencial de aplicar el método como una técnica analítica en línea para cultivos mixtos, lo que permitiría modelar y optimizar en tiempo real los parámetros involucrados en la acumulación-degradación de PHA contribuyendo a la reducción de costos y por lo tanto a su consecuente producción a gran escala. Un punto muy importante es que se evita la producción de desechos peligrosos (grandes cantidades de solventes) obtenidos en la CG ya que aquí solo se necesita una mínima preparación de muestra y la única sustancia involucrada es una solución isotónica de NaCl.

5.4 Fase IV

5.4.1 Modificaciones al reactor de enriquecimiento selectivo

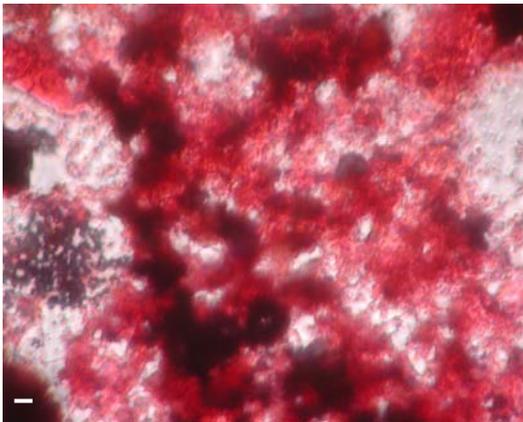
La experimentación al regresar al LIPATA consistió en un replanteamiento del reactor de enriquecimiento selectivo. Se modificó la configuración de los ciclos SBR hasta quedar de 6 horas y con el funcionamiento descrito en el apartado 3.5.

El reactor se estabilizó y dejó de producir filamentos, con lo cual se logró evitar la falta de sedimentabilidad y el consecuente lavado del reactor que sucedía antes de la estancia de investigación. La composición de la alimentación fue modificada suprimiendo el ácido láctico y conservando el ácido acético y el propiónico, ya que no se tenía el estándar adecuado para su cuantificación.

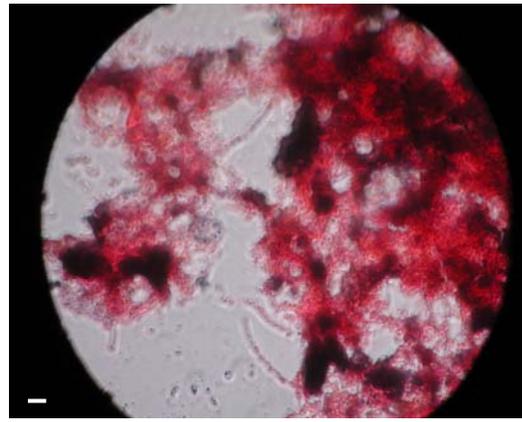
Se modificó también la concentración de la alimentación de 8.5 gDQO L^{-1} hasta 750 mg L^{-1} después de dilución, es decir de 3 gDQO L^{-1} en cada ciclo. Esto hizo que el enriquecimiento selectivo fuera favorecido al no tener altas cargas orgánicas en el reactor que impedían la aclimatación del inóculo a las condiciones de ayuno y abundancia, esto aunado a los cortos tiempos de ciclo (2 horas) en donde obviamente no existía ningún ayuno y el poco PHA que se pudo detectar cualitativamente era debido al bajo tiempo de retención celular más que a la dinámica de ayuno-abundancia que ha demostrado ser la mejor estrategia de selección de cultivos mixtos capaces de almacenar PHA.

5.4.2 Tinciones

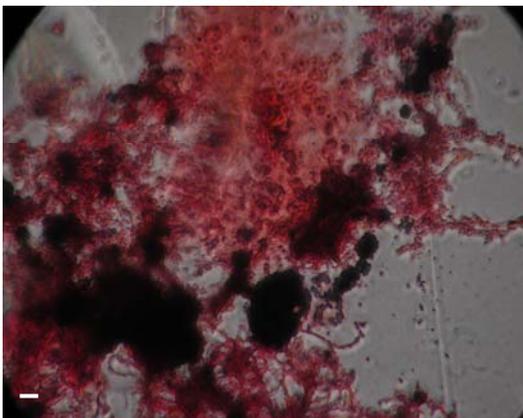
Por otro lado se implementó la técnica de tinción con negro de Sudán y safranina para hacer detecciones cualitativas más rápidas que las que se hacían con azul de Nilo y que requerían de altos tiempos de preparación y observación en microscopio, además de que es específica para PHB. Después de estabilización del reactor se siguió un perfil de tinciones para comprobar la producción de PHA en el reactor ya que la sedimentabilidad era buena y se quería comenzar el seguimiento con estudios de ciclo y experimentos batch. En las fotografías 5-10 a 5-13 se encuentran los resultados de tinciones para el reactor de enriquecimiento selectivo considerado como estable.



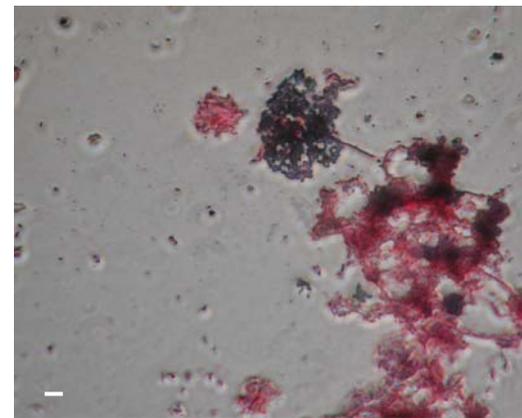
Fotografía5-10 Tinción con negro de Sudán, a 1 semanas de arranque de reactor con nuevas condiciones



Fotografía5-11 Tinción con negro de Sudán, a 2 semanas de arranque de reactor con nuevas condiciones



Fotografía5-12 Tinción con negro de Sudán, a 3 semana de arranque de reactor con nuevas condiciones



Fotografía5-13 Cúmulo de gránulos de PHA; se observan formas de cocos y bacilos acumulando, pocos filamentos presentes

Barra, 2.0 μm

5.4.3 Cromatografía de gases

La observación de las tinciones permitió continuar con la experimentación y se comenzaron estudios de ciclo y pruebas batch. La técnica de cromatografía de gases fue montada y se obtuvieron picos satisfactorios para el estándar adquirido ya que anteriormente solo se tenía PHB puro. Para esta fase se adquirió el estándar de PHB:PHV (92:8) de Sigma Aldrich.

La preparación de muestra se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado de métodos analíticos utilizando en lugar de liofilización la exposición de muestras a 110°C por un día para evaporar toda el agua presente y obtener biomasa seca. De acuerdo a lo realizado en la AWMC se utiliza un metanol acidificado con 3% de H₂SO₄ en lugar de 20% que se había estado utilizado sin buenos resultados. Se utilizó benzoato de sodio (100mg L⁻¹) en la misma solución de metanol acidificado en lugar de agregarlo por muestra como se hacía antes. El benzoato de sodio sirve para realizar las curvas de calibración y se agrega para compensar errores de inyección independientes de la técnica de preparación de muestras.

Se realizó la detección de compuestos en el cromatógrafo adecuadamente obteniendo 3 picos característicos del compuesto analizado. En 2.56 min se obtiene el pico característico para PHB; en 3.4 min se obtiene el pico representativo del PHV y en el tiempo 5.04 min se obtiene el pico del benzoato de sodio en todas las pruebas.

Para obtener los resultados de las muestras de biomasa se realiza una curva de calibración con 4 estándares preparados en función del contenido de PHA esperado en las muestras. En este caso, se preparaban estándares de 1, 2, 4 y 7 mg para cubrir un amplio rango mientras se conocía el contenido esperado en las muestras.

Para la cromatografía de gases se realiza una curva de calibración cada vez que se toman muestras.

5.4.4 FTIR y cuantificación de PHA

La técnica desarrollada de cuantificación de PHAs con infrarrojo fue puesta en práctica, se obtuvo un nuevo software para el espectrofotómetro. El espectrofotómetro utilizado no es de punta de diamante si no que es un espectrofotómetro en el cual, la muestra se coloca en una placa rectangular y sobre ella incide el rayo, por lo que la metodología difiere para obtener el espectro en cuanto a la cantidad necesaria de muestra. El espectrofotómetro será utilizado de acuerdo a Jarute y colaboradores (2004) para intentar la obtención en línea de los espectros debido a su configuración para lo cual se requiere el diseño y configuración de un sistema apto para ello. No fue posible tener resultados suficientes para el presente estudio. Sin embargo las primeras pruebas fueron satisfactorias, problemas por resolver son la cantidad de muestra necesaria para cubrir toda la placa y el tiempo de sedimentación del licor mezclado antes de obtener el espectro.

5.4.5 Control del reactor

Se equipó el reactor con sensores de OD y pH para lectura en línea durante todo el ciclo del reactor y se acopló a un control cuyas salidas van hacia una PC donde se corre un software de monitoreo en plataforma LabView. Este software permite monitorear el OD y el pH durante todo el tiempo, además de que permite controlar el apagado y encendido de las bombas, duración de etapas y secuencia de las mismas y se puede ver el flujo de aire. En cuanto al volumen de aire es importante mencionar que el software permite su programación para mantiene el oxígeno disuelto dentro de valores de referencia y así poder intuir cuando ha terminado la fase acumulación. Algunas pantallas se observan en las figura 5-23

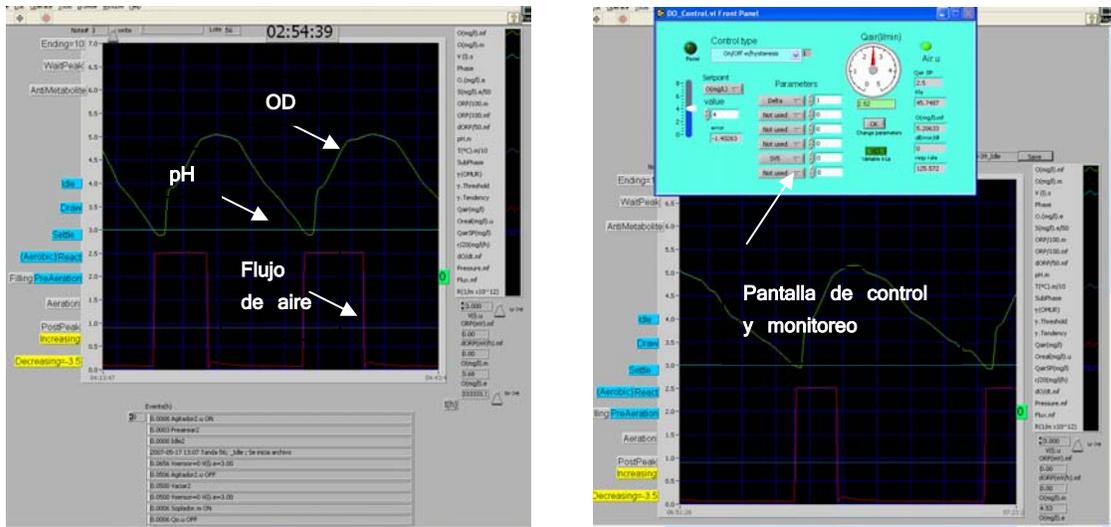


Figura 5–23 Pantallas de software de control

5.4.6 Muestreo de PHA

Los resultados para estudios de ciclo y batch de esta etapa fueron exploratorios y sirvieron de base para la continuación del proyecto. Las últimas actividades realizadas consistieron en apoyo con la determinación de PHA en el cromatógrafo y experimentación mínima que correspondió a la realización de muestreos de PHA durante la variación de flujo de aire en el reactor para determinar si esto fomentaba la acumulación de PHA o no tenía ningún efecto como parámetro de control. Esta experimentación se describió en el apartado 3.5.

Las muestras de PHA fueron tomadas en un estudio de ciclo normal y en uno con control de aire como se muestra en la pantalla 5-23 izquierda, se realizaba un apagado y prendido del aire cada vez que el valor de OD se encontraba por encima de un valor de referencia (variable de 3 mg L^{-1} hasta 5 mg L^{-1}); también se realizaron experimentos donde se mantenía el OD dentro de una franja de valores un límite inferior (normalmente de 3 mg L^{-1}) y un límite superior (generalmente de 5 mg L^{-1}).

La figura 5-24 muestra un experimento donde se mantuvo controlado el OD mediante el flujo de aire de entrada, en este caso se aplico un flujo de 2.5 [vvm] y los valores máximo y mínimo de OD de experimentación fueron de 5 mg L^{-1} y 3 mg L^{-1} respectivamente.

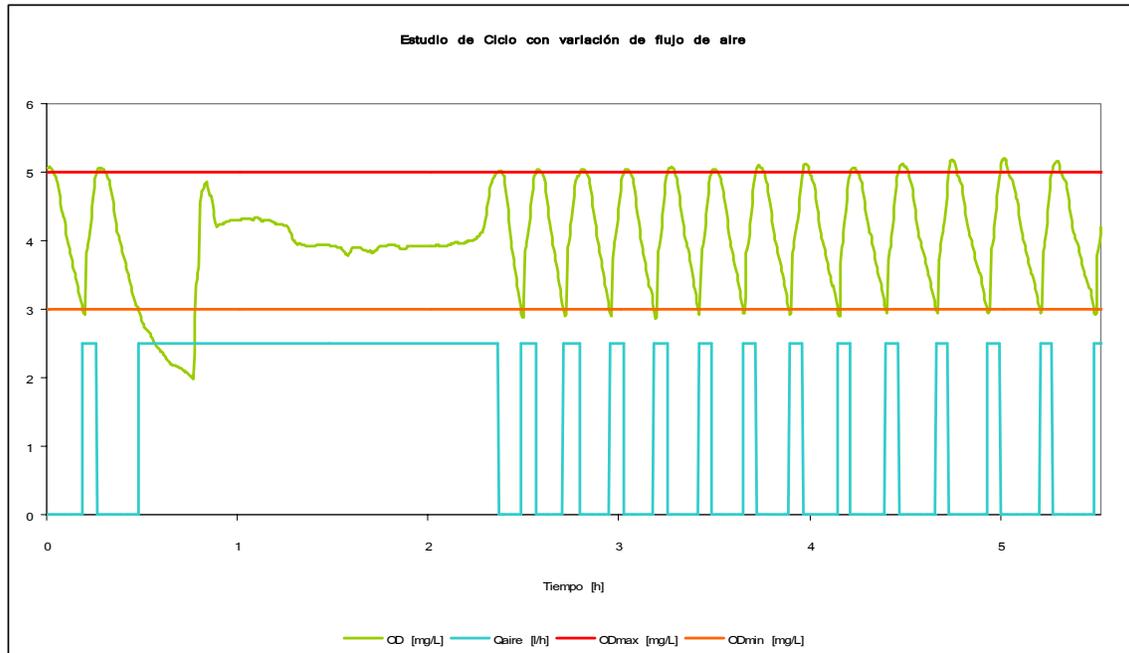


Figura 5–24 Ciclo del reactor de enriquecimiento selectivo

Se observa que al inicio del ciclo existe una súbita y pronunciada bajada de OD al proporcionar el sustrato por lo que de acuerdo a lo estudiado se asumiría que el consumo de sustrato ha terminado antes de una hora, primero con una alta tasa y después una tasa constante hasta cerca de las 2.7 horas donde el OD comienza a subir, y el control de flujo de aire comienza intermitentemente, un acercamiento a una de estas curvas observadas se muestra en la figura 5-25. Al principio se atribuyó el comportamiento de la curva únicamente al apagado y encendido del aire, sin embargo en un acercamiento a una de las curvas observadas se observaron dos cambios de pendiente característicos en cada una (figura 5-25).

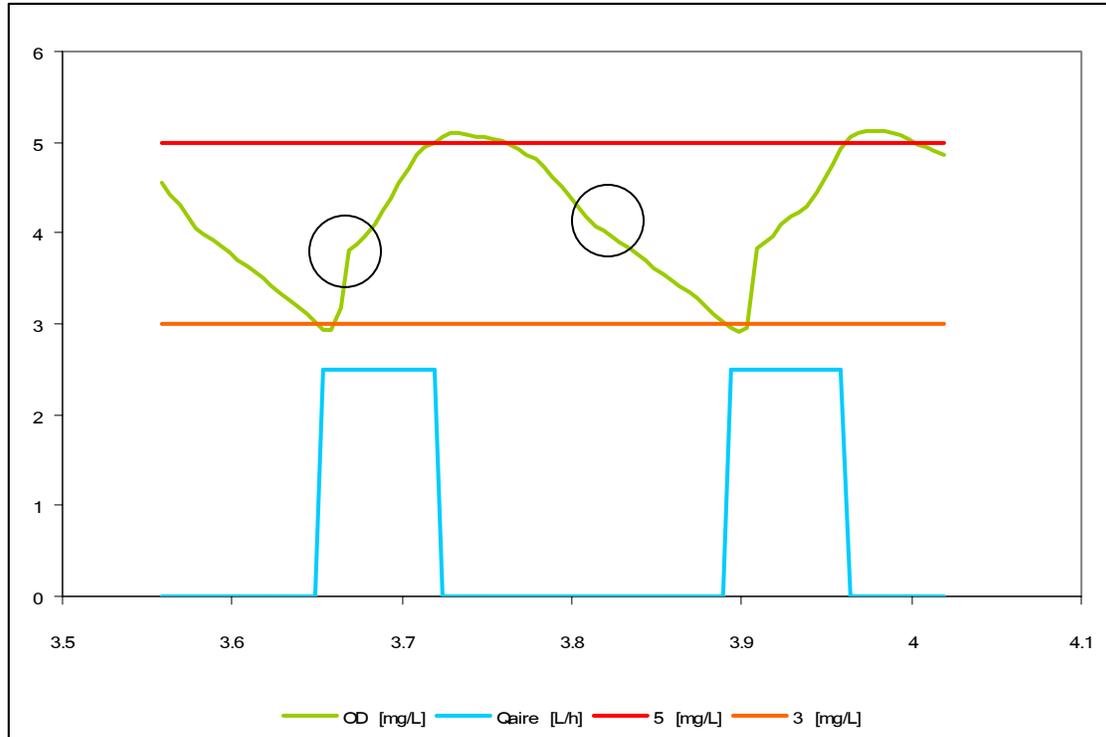


Figura 5–25 Acercamiento a curva observada durante el control de la aireación en el SBR

Aunque el alcance de este último estudio fue muy limitado debido al tiempo de experimentación disponible, se tomaron muestras de PHA en estos cambios de pendiente y se compararon con aquellos obtenidos durante un estudio de ciclo normal sin control de flujo de aire para saber si el control de aire afectaba en algún sentido la acumulación alcanzada de PHA, aunque los resultados quedan fuera del alcance de este estudio se obtuvo un 10% de peso seco celular de acumulación de PHA para $t=2.78$ h en el estudio de ciclo normal y una acumulación de 22% de peso seco celular en el tiempo $t=2.68$ (cuando existe el cambio de pendiente en la gráfica) al controlar el flujo de aire. Aunque se trata de un resultado aislado, se observó un aumento del PHA acumulado lo que puede alentar una investigación sobre el uso del control de flujo de aire para fomentar la acumulación de PHA. Por último se realizó una única prueba batch con los lodos provenientes del reactor de enriquecimiento selectivo una acumulación del 40% fue lograda en peso seco celular para este único experimento, este valor es bajo comparado con el obtenido en el AWMC (58% como máximo) a pesar de utilizar sustrato sintético.

Estos resultados son únicamente un antecedente para continuar la siguiente etapa del trabajo de investigación sobre acumulación de polihidroxicanoatos en el LIPATA.

6 CONCLUSIONES

Los lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales son capaces de acumular PHAs al ser sometidos a condiciones de alimentación dinámica aerobia o períodos de ayuno y abundancia de sustrato. El estudio del sistema de producción de PHA con cultivos mixtos permitió obtener suficiente conocimiento para encaminar la investigación hacia la optimización del proceso. La experimentación en ambos centros logró proponer los parámetros de control del proceso que son claves. Estos fueron: la concentración inicial de AGVs, la composición del influente que hizo patente la necesidad de la prefermentación del mismo, el oxígeno disuelto como parámetro de control para fomentar la acumulación máxima de polímero, el no control del pH, ya que se observó una mayor acumulación cuando no se controlaba que cuando se hacía, la agitación, que es importante dentro del reactor ya que la biomasa tiende a adquirir una consistencia que se adhiere a las paredes del reactor, y finalmente la aireación, que debe ser suficiente para lograr el consumo de sustrato al inicio de la reacción y poder dejar períodos largos de ayuno que fomenten la selección de microorganismos capaces de acumular el PHA.

Se comprobó que se puede utilizar un sustrato sin costo como fuente de carbono, el agua residual de una planta enlatadora de jugos y conservas de frutas obteniendo acumulaciones de PHA en cultivos mixtos de hasta 73% en peso seco celular por una parte, y por la otra se pudo observar los procesos de acumulación y degradación de PHA con un sustrato sintético de bajo costo utilizando una mezcla de ácidos grasos volátiles.

La cromatografía de gases requiere de extensos tiempos de preparación de muestra y lectura. Como consecuencia, no se puede tener resultados inmediatos que permitan tomar decisiones en línea sobre el proceso, lo cual hace que los tiempos de experimentación sean prolongados y el modelado tradicional basado en la obtención de grandes colecciones de datos sea difícil. Además la técnica produce efluentes de desechos tóxicos (solventes). Esto llevó a la búsqueda de técnicas alternativas con resultados confiables pero con menor tiempo de proceso y basada en la tecnología PAT (Process Analytical Technology) cuyas bases sugieren realizar un seguimiento en línea del proceso para que se puedan tomar decisiones en línea y con ello optimizar el proceso.

La técnica propuesta fue el uso de la espectrofotometría con infrarrojo junto con el algoritmo estadístico de los mínimos cuadrados parciales (FTIR-PLS). Esta técnica obtuvo una reducción en el tiempo de preparación y obtención de resultados desde 8-24 horas hasta 30-40 minutos.

Además demostró ser una técnica al menos comparable con la de CG reportando un error de predicción de nuevos valores de 2.66%, por lo cual se concluyó que es una técnica al menos tan buena como la cromatografía de gases. La nueva técnica no solo reduce el tiempo de preparación y procesamiento de muestra, también permite eliminar los efluentes de desechos peligrosos de la técnica de CG (solventes). Además permite dirigirse hacia una técnica de seguimiento en línea de la dinámica de sistemas. En términos de optimización de proceso resulta ser una técnica altamente valiosa ya que de una forma rápida es posible conocer la concentración del polímero, algo que se busca en la mayor parte de los procesos industriales con fines de ahorro de energía, material y, por supuesto, costos. Además se montaron técnicas de detección cualitativa de PHA (negro de Sudán y azul de Nilo), que permitieron tomar decisiones sobre el estado del reactor, por ejemplo al observar organismos filamentosos conteniendo paquetes de PHA en su estructura. Esta técnica pudo utilizarse además para determinar de manera rápida el grado de cristalinidad del polímero muestreado por el análisis de bandas. El control de la aireación puede ser un parámetro de control que fomente la acumulación de PHA como se exploró parcial y someramente en la última fase de experimentación. Los datos obtenidos se utilizarán para validación del modelo que se obtendrá en investigaciones posteriores.

7 BIBLIOGRAFÍA

Anderson, A., Williams, D., Taidi, B., Dawes, E., Ewing, D. (1992). "Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*". *FEMS Microbiology Reviews* **103**:93-102.

Bayari, S., Severcan, F. (2005). "FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV)". *Journal of Molecular Structure* **744-747**: 529-534.

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.

Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T. (2007). "Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater". *Bioresource Technology* **99**:509-516.

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

Biby, D. "Degradable polymers". Texto en red s.f. (sin referencia). *Internacional Card Manufacturers Association [en línea]*.
<<http://www.icma.com/info/polymers.htm>> [Consulta 2 de Febrero, 2006].

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 & Biotechnology* **6**: 29-37.

Burdon, K. (1946). "Fatty acid material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations". *Journal of Bacteriology* **52**:665-678.

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

Chen, D., Tang, C., Chan, K., Tsui, C., Yu, P., Leung, M., Uskokovic, P. (2007). "Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBV/HÁ nanocomposite". *Composites Science and Technology* **67**: 1617-1626.

- 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.
- Davis, S., Abrahms, M., Brault, J. (2001). "Fourier Transform Spectrometry", 1era Ed. Academic Press, 262 pp.
- 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.
- Doi, Y. (1990). "Microbial Polyesters". 1era Ed. New York: VCH. 156 pp.
- 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.

Doyle, C., Tanner, E., Bonfield, W. (1991). "In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite". *Biomaterials* **12**:841–847.

Geladi, P., Kowalski, B. (1986). "Partial least-squares regression: a tutorial." *Analytica Chimica Acta* **185**: 1-17.

Gómez, J. , Rodrigues, M., Allí, 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. (en prensa) "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.

Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G., Huang, W. (1999). "A rapid method for detecting polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy". *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**:523-526.

Jarute, G., Kainz, A., Schroll, G., Baena, J., Lendl, B. (2004). "On-Line Determination of the Intracellular Poly(α -hydroxybutyric acid) Content in Transformed *Escherichia coli* and Glucose during PHB Production Using Stopped-Flow Attenuated Total Reflection FT-IR Spectrometry". *Analytical Chemistry* **76**:6353-6358.

Kalia, V., Raizada, N., Sonakya, V., (2000). "Bioplastics". *Journal of Scientific & Industrial Research* **59**: 433–445.

Kansız, M., Billman-Jacobe, H., McNaughton, D. (2000) "Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics". *Applied and Environmental Microbiology* **66**:8:3415-3420.

Kansız, M., Domínguez-Vidal, A., McNaughton, D., Lendl, B. (2007). "Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for monitoring and determining the degree of crystallization of polyhydroxyalkanoates (PHAs)". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**:1207-1213.

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 & Bioengineering* **43**: 892-898.

Kim, B., Chang, H. (1995). "Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysate by *Alcaligenes eutrophus*". *Biotechnology Techniques* **9**: 311-314.

Kim, B., Chang, H. (1998). "Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*". *Biotechnol Letters* **20**: 109-112.

Kim, S., Kim, P., Lee, H., Kim, J. (1996). "High production of poly-*b*-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation". *Biotechnol Letters* **18**: 25-30.

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., Yim, K., Chang, H., Chang, Y. (1994a). "Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Escherichia coli*". *Journal of Biotechnology* **32**: 203-211.

Lee, S., Chang, H. (1994b). "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. (1998). "Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*". *Polymer Degradation and Stability* **59**: 387-393.

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.

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.

Lenz, R., Marchessault R., (2005). "Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology". *Biomacromolecules* **6**:1-8.

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.

Marcotte, L., Kegelaer, G., Sandt, C., Barbeau, J., LaXeur, M. (2006). "An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples". *Analytical Biochemistry* **361**: 7-14.

Meek, T. (1998). "An introduction to spectroscopy, atomic structure and chemical bonding". 1era Ed. Cave Hill Campus, Barbados: University of the West Indies.

Meesters, K. (1998). "Production of poly-3-hydroxyalkanoates from waste streams". Design Report, Delft University of Technology.

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

Nakamoto, K. (1986). "Infrared and Raman Spectra". Cuarta Edición. Nueva York: J. Wiley-Interscience.

Ni, J., Wang, M. (2002). "In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite". *Materials Science and Engineering* **20**:101-109.

Oda, Y., Asari, H., Urakami, T., Tonomura, K. (1999). "Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polycaprolactone by Filamentous Fungi". *Journal of fermentation and bioengineering* **80**:265-269.

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.

Oliveira, R. (1998). "Supervision, Control and Optimization of Biotechnological Processes Based on Hybrid Models". Doctoral Thesis. Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.

Ostle, A., Holt, J. (1982). "Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate". *Applied and Environmental Microbiology* **44**:238-241.

Page, W., Comish, A. (1993). "Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate". *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 4236-4244.

Pal, S., Patra, A., Paul, A. (2007). "Studies on intracellular degradation of polyhydroxyalkanoic acid-polyethylene glycol copolymer accumulated by *Azotobacter chroococcum* MAL-201". *Journal of Biotechnology* **132**: 325-330.

Paris, I., Janoly-Dumenil, A., Pacib, A., Mercier, L., Bourget, P., Brion, F., Chaminade, P., Rieutord, A. (2006). "Near infrared spectroscopy and process analytical technology to master the process of busulfan paediatric capsules in a university hospital". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1171-1178.

Punrattanasin, W. (2001). "The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics". Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Environmental Science and Engineering.

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.

Reusch W. (1999). "Spectroscopy" *Virtual Textbook of Organic Chemistry* [en línea].
<<http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>>
[Consulta 2 de octubre 2007].

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 & 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., 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., 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.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). "Generación de residuos sólidos urbanos por tipo de residuo" [en línea]. *Compendio de estadísticas ambientales de SEMARNAT*
<http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_04/sitio_wf/Reportes/D3_RESIDUOS/D3_RESIDUOSPO1/D3_RSMO1_03.htm>. [Consulta 18 de mayo, 2007].

Scherer, T., Clinton, R., Lenza, R., Goodwinc, S. (1999). "Hydrolase activity of an extracellular depolymerase from *Aspergillus fumigatus* with bacterial and synthetic polyesters". *Polymer Degradation and Stability* **64**:267-275 .

Serafim, L., Lemos, P., Oliveira, R., 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.

Sridewi, N., Bhubalan, K., Sudesh, K. (2006). "Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem". *Polymer Degradation and Stability* **91**:2931-2940.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1992). American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). In: Greenberg, A.E., Trusell, R.R., Clesceri, A.E. 17th ed. American Public Health Association, Washington, DC.

Steinbüchel, A. (2005). "Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts". *Current Opinion in Biotechnology* **16**:607-613.

Steinbüchel, A., Fächtenbusch, B. (1998). "Bacterial and other biological systems for polyester production". *Trends in biotechnology* **16**:419-427.

Strobel, H., Heineman, W. (1989). "Chemical Instrumentation: A systematic approach". Third Edition. Nueva York: J. Wiley Interscience.

Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000). "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters". *Progress in Polymer Science.*, **25**:1503-1555.

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

Vaiopoulou, E., Melidis, P., Aivasidis, A. (2007). "Growth of filamentous bacteria in an enhanced biological phosphorus removal system". *Desalination* **213**:288-296.

Vargas, A. (2006). "Apuntes de Análisis estadístico y diseño de experimentos". Posgrado de Ingeniería UNAM.

Wang, F., Lee, S. (1997). "Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3703-3706.

Wong, H., Lee, S. (1998). "Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey by high density cultivation of recombinant *Escherichia coli*". *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 30-33.

Xu, J., Guo, B., Yang, R., Wu, Q., Chen, G., Zhang Z. (2002). "In situ FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates". *Polymer* **43**:6893-6899.

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 & 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.