

DESARROLLO DE UN BIORREACTOR DE BAJO COSTO PARA LA  
DISMINUCIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE OXÍGENO EXTERNO EN UN  
CONSORCIO ALGA-BACTERIA PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

DAYANNA JERALDIN FAJARDO CASTRO  
ANGIE DANIELA LONDOÑO SÁNCHEZ

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C.  
2020

DESARROLLO DE UN BIORREACTOR DE BAJO COSTO PARA LA  
DISMINUCIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE OXÍGENO EXTERNO EN UN  
CONSORCIO ALGA-BACTERIA PARA LA PRODUCCIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

DAYANNA JERALDIN FAJARDO CASTRO  
ANGIE DANIELA LONDOÑO SÁNCHEZ

Proyecto integral de grado para optar el título de  
INGENIERO QUÍMICO

Director  
JUAN DANIEL VALDERRAMA  
Ingeniero Químico

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C.  
2020

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Ing. Juan Camilo Cely Garzón

---

Ing. Diana Milena Morales Fonseca

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente institucional y Rector del Claustro

**Dr. MARIO POSADA GARCÍA - PEÑA**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados (E)

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Secretaría General

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Decano Facultad de Ingeniería

**Dr. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI**

Director del Programa de Ingeniería de Química

**Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ**

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos:

Esencialmente a Dios por acompañarnos en absolutamente todo el proceso que conllevó realizar este proyecto, donde hubo momentos de incertidumbre y angustia, pero, no obstante, no nos quitaron la esperanza de poder terminar satisfactoriamente con la ayuda y sabiduría que nos brindó cada día durante el proceso.

A nuestro núcleo familiar, familiares y amigos los cuales de algún modo estuvieron presentes y creyeron en nosotras aun cuando nosotras no creíamos.

Al Ph.D Juan Daniel Valderrama Rincón por su asesoramiento, paciencia, sus comentarios y correcciones durante el proceso de realización y culminación del proyecto.

Al ingeniero Andrés Valderrama por transmitirnos los conocimientos en electrónica y automatización que se requirieron a lo largo de todo el proyecto, además de su gran ayuda y motivación en cada etapa de todo el proceso.

A la Universidad Antonio Nariño, especialmente a la línea de investigación de Ingeniería de Bioprocesos del grupo de investigación GRESIA, por brindarnos el apoyo financiero, humano y equipamiento necesario para el desarrollo satisfactorio del proyecto.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	25
OBJETIVOS	28
1. MARCO TEÓRICO	29
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)	29
1.1.1 Clasificación	30
1.1.2 Propiedades	31
1.1.3 Biosíntesis PHA	31
1.1.4 Biodegradabilidad de PHA	34
1.1.5 Producción de PHA	34
1.1.5.1 Producción de PHA a partir de cultivos puros	34
1.1.5.2 Producción de PHA a partir de cultivos mixtos	35
1.1.5.3 Producción de PHA a partir de cultivos mixtos fotosintéticos	35
1.1.6 Identificación de PHA	35
1.2 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)	36
1.2.1 Biorrefinería	36
1.2.2 Proceso de producción para la síntesis de PHA Biorrefinería	36
1.2.2.1 Fermentación acidogénica para la obtención de AGV (Ácidos grasos volátiles)	37
1.2.2.2 Selección de bacterias acumuladora de PHA	37
1.2.2.3 Acumulación del Biopolímero	38
1.3 BIORREACTOR (BR)	38
1.3.1 Modo de Operación	39
1.3.1.1 Batch	40
1.3.1.2 Fed- Batch	40
1.3.1.3 Continuo	40
1.3.2 Clasificación de los bioreactores	40
1.3.2.1 Fotobiorreactor (FBR)	41
1.3.2.2 Fotobiorreactores fermentadores	41
1.3.2.3 Fotobiorreactores de placa plana	42
1.3.2.4 Fotobiorreactores tubulares	42
1.3.3 Variables a Controlar	44
1.3.3.1 Suministro de nutrientes	44
1.3.3.2 Intercambio de gases	45
1.3.3.3 Suministro de luz	45
1.3.3.4 Oxígeno disuelto	46
1.3.3.5 Temperatura	46
1.3.3.6 Agitación	47
1.3.3.7 pH	47
1.3.4 Comportamiento Hidráulico	47
1.3.4.1 Tiempos de Distribución de residencia (RTD)	48
1.3.4.2 Ensayo de trazadores	48
1.3.4.4 Curvas de crecimiento	49

2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR	54
2.1. DISEÑO CONCEPTUAL DEL BIORREACTOR	54
2.1.1 Materiales para la construcción de biorreactores	55
2.1.2 Criterios de selección	57
2.1.2.1 Resistencia a procesos de esterilización por autoclave	57
2.1.2.2 Transparencia	58
2.1.2.3 Costo	58
2.1.2.4 Químicamente inerte	58
2.1.2.5 Geometría	58
2.1.2.6 Volumen	59
2.1.2.7 Modo de operación	58
2.1.2.8 Sistema de agitación	59
2.2 CÁMARA DE INCUBACIÓN	59
2.3 SISTEMA ÓPTICO DE MEDIDA	62
2.3.1 Protocolo general de diseño de circuitos electrónicos	63
2.3.2 Recolección y almacenamiento de datos	64
2.3.3 Armazón del sensor óptico	65
2.4 DESARROLLO DEL PROTOTIPO	66
2.4.1 Prototipo en resina poliéster	66
2.4.2 Prototipo en vidrio	67
2.4.3 Prototipo en polipropileno	69
2.4.4 Montaje y ensamblaje de los prototipos diseñados	71
2.5 PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO	74
2.5.1 Prueba de resistencia térmica	74
2.5.2 Prueba de agitación y mezclado	74
2.5.3 Prueba de esterilidad	75
2.5.3.1 Sistema de agitación neumático	75
2.5.3.2 Sistema de agitación magnético	75
2.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
2.6.1. Montaje y ensamblaje del biorreactor tipo air-lift de bucle externo	75
2.6.1.1 Resina Epóxica	75
2.6.1.2 Resina poliéster pre-acelerada	76
2.6.1.3 Vidrio	76
2.6.1.4 Polipropileno	77
2.6.2 Pruebas de funcionamiento	80
2.6.2.1 Prueba resistencia térmica	79
2.6.2.2 Prueba sistemas de agitación	79
2.6.2.3 Prueba de esterilidad	80
2.7 ANÁLISIS DE COSTOS	85
2.7.1 Costos directos	85
2.7.2 Costos indirectos	87
3. SELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA Y MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONFORMACIÓN DEL CONSORCIO	91
3.1 OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS	91
3.1.1 Obtención de las bacterias productoras de PHA	91
3.1.2 Obtención de la microalga	91
3.1.3 Replicación de microorganismos	91



3.1.3.1 Cepas bacterianas productoras de PHA	92
3.1.3.2 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> sp.	92
3.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS	92
3.2.1 Protocolo de esterilización de materiales y medios de cultivo	93
3.2.2 Cámara de incubación con agitador	93
3.2.3 Suministro de nutrientes	94
3.2.4 Suministro de luz	95
3.2.5 Agitación	96
3.2.6 Medios de cultivo.	97
3.2.6.1 Siembra en medios sólidos	97
3.2.6.2 Siembra en medios líquidos	98
3.3 TÉCNICAS DE TINCIÓN PARA DETECCIÓN CUALITATIVA DE PHA	101
3.3.1 Protocolo para identificación de colonias productoras de PHA, usando Rojo de Nilo	101
3.3.2 Protocolo para confirmación de colonias productoras de PHA, usando Negro Sudán B	101
3.3.3 Tinción de Gram	100
3.4 DESARROLLO PRE-EXPERIMENTAL	103
3.4.1 Detección cualitativa de PHA de las cepas bacterianas	105
3.4.2 Evaluación cualitativa en medios líquidos	105
3.4.2.1 Evaluación del crecimiento y tiempo de acumulación de PHA en los medios de cultivo	105
3.4.2.2 Evaluación del crecimiento de microalga en los medios de cultivo	106
3.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL	106
3.5.1 Evaluación de la cuantificación de crecimiento	107
3.5.1.1 Procedimiento para realizar la curva de crecimiento microbiano	107
3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS	108
3.6.1 Desarrollo pre-experimental	108
3.6.1.1 Evaluación cualitativa en la detección de PHA	108
3.6.2 Curvas de crecimiento de cepas y medios seleccionados	116
3.6.2.1. Curva de calibración	119
4. ESTABLECIMIENTO DE PROPORCIONES DE INOCULO ALGA-BACTERIA	122
4.1 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE INCUBACIÓN Y SISTEMA ÓPTICO DE MEDICIÓN	122
4.2 PROTOCOLOS PARA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS	123
4.2.1 Preparación de microalgas	123
4.2.2 Preparación de la cepa bacteriana	124
4.2.3 Inoculación de los cultivos mixtos	125
4.2.3.1 Verificación de axenicidad de cultivos	125
4.2.3.2 Método de inoculación	126
4.2.4 Muestreo en el biorreactor	128
4.3 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE MICROORGANISMOS	129
4.3.1 Curvas de calibración	129
4.3.1.1 Curvas de calibración señal vs absorbancia.	130
4.3.1.2 Curvas de calibración absorbancia vs concentración celular	131
4.3.2 Crecimiento global de microorganismos	131

4.3.3 Crecimiento individual de microorganismos	131
4.3.3.1 Protocolo para realizar conteo celular individual	131
4.3.3.2 Cálculo de la concentración de microorganismos	133
4.4 TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA BASADA EN NEGRO DE SUDÁN B	134
4.5 ECUACIÓN DIFERENCIAL LOGÍSTICA DE VERHULST	134
4.6 PRUEBAS RESPIROMÉTRICAS	135
4.6.1 Medición oxígeno disuelto (OD) de microorganismos	135
4.7 ESTABLECIMIENTO DE PROPORCIONES DE CULTIVO	135
4.7.1 Cálculo de porcentaje inicial de cada microorganismo	136
4.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS	136
4.8.1 Prueba de funcionamiento del sistema de incubación y sistema óptico de medición.	136
4.8.2 Cinéticas de crecimiento.	137
4.8.2.1 Crecimiento global de microorganismos.	137
4.8.2.2 Crecimiento individual de microorganismos.	141
4.8.3 Curvas de producción de PHA.	144
4.8.4 Medición oxígeno disuelto (OD) de microorganismos.	147
4.8.4.1 Oxígeno disuelto en cultivos individuales de microorganismos.	147
4.8.5 SELECCIÓN DE PROPORCIONES INÓCULO ALGA-BACTERIA	151
5. CONCLUSIONES	153
6. RECOMENDACIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	157
ANEXOS	162

## LISTA DE CUADROS

	<b>pág.</b>
Cuadro 1. Principales criterios del diseño de un biorreactor.	39
Cuadro 2. Características metabólicas en función de la fuente de nutrientes.	45
Cuadro 3. Técnicas para determinar el crecimiento microbiano.	53
Cuadro 4. Criterios de selección.	55
Cuadro 5. Materiales pre-seleccionados para la construcción del biorreactor.	56
Cuadro 6. Piezas en caucho empleadas para BR en vidrio.	69
Cuadro 7. Descripción del montaje experimental de los prototipos desarrollados.	70
Cuadro 8. Tipos de nutrición en microorganismos.	95
Cuadro 9. Detección cualitativa de PHA en las cepas bacterianas.	109
Cuadro 10. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas.	111
Cuadro 11. Crecimiento de microalgas en medios de cultivo.	115
Cuadro 12. Morfología macro y microscópica de las cepas.	166

## LISTA DE ECUACIONES

	<b>pág.</b>
Ecuación 1. Tiempo de residencia teórico.	48
Ecuación 2. Determinación de cuadros pequeños totales.	132
Ecuación 3. Determinación área de cuadros totales.	132
Ecuación 4. Determinación del volumen de muestreos.	132
Ecuación 5. Concentración de células.	133
Ecuación 6. Ecuación logística de Verhuslt.	134

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de PHA.	33
Figura 2. Síntesis de PHA bajo el concepto de Biorrefinería.	37
Figura 3. Producción de PHA a partir de corrientes de desecho.	38
Figura 4. Biorreactores Air-lift	43
Figura 5. Fases de curvas de crecimiento.	49
Figura 6. Biorreactor comercial para la fermentación microbiana. escala laboratorio.	54
Figura 7. Biorreactor tipo air-lift de bucle externo o de ciclo (loop) externo.	58
Figura 8. Sistema de agitación neumático.	59
Figura 9. Sistema de agitación magnético	60
Figura 10. Cámara de incubación (vista exterior e interior).	61
Figura 11. Componentes electrónicos ( LDR y LED).	62
Figura 12. Circuito medidor (izquierda) - Circuito para visualización de datos (derecha).	62
Figura 13. Procedimiento general para elaboración de circuitos electrónicos.	64
Figura 14. Tráfico de datos.	65
Figura 15. Armazón de 16mm.	65
Figura 16. Milibiorreactor tipo air-lift.	66
Figura 17. Moldes elaborados en caucho-silicona.	67
Figura 18. Adaptación del prototipo en resina poliéster.	67
Figura 19. Cuerpo del BR modificado en vidrio.	68
Figura 20. Bucle externo BR en vidrio.	70
Figura 21. Cuerpo del BR modificado en polipropileno	69
Figura 22. Bucle externo BR en PP.	70
Figura 23. Piezas empleadas para Downcomer (Tubo en vidrio).	70
Figura 24. Diagrama de bloques. Preparación caucho-silicona.	73
Figura 25. Diagrama de bloques. Preparación resina poliéster.	74
Figura 26. Dimensionamiento del biorreactor vista tridimensional.	79
Figura 27. Dimensionamiento del biorreactor vista superior.	79
Figura 28. Dimensionamiento del biorreactor vista frontal.	80
Figura 29. Prueba cualitativa de esterilidad - Sistema de agitación neumático.	83
Figura 30. Prueba cualitativa de esterilidad - Sistemas de agitación magnético.	83
Figura 31. Control positivo para esterilidad.	92
Figura 32. Cepas sembradas por agotamiento.	92
Figura 33. Técnica de siembra en masivo Microalgas.	92
Figura 34. Montaje de cámara de incubación con agitador - Vista exterior.	93
Figura 35. Montaje cámara de incubación con agitador - Vista interior.	94
Figura 36. Sistema de agitación orbital tipo Shaker.	96
Figura 37. Circuito de velocidades.	104
Figura 38. Desarrollo pre-experimental para selección de cepas bacterianas y medios.	107
Figura 39. Desarrollo experimental para selección de cepa bacteriana y sustrato.	107

Figura 40. Cámara de incubación con sistema de agitación magnético y sensores ópticos de medida.	124
Figura 41. Preparación de las microalgas.	124
Figura 42. Preparación de la cepa bacteriana.	125
Figura 43. Transferencia de biomasa individual al medio fresco.	126
Figura 44. Transferencia y ajuste de biomasa global a biorreactores.	128
Figura 45. Sistema de recolección de muestras.	129
Figura 46. Cuantificación global e individual de los microorganismos.	129
Figura 47. Cámara Neubauer.	133
Figura 48. Medición de oxígeno disuelto de microorganismos en co-cultivo y en monocultivo.	147
Figura 49. Esquemático circuito medidor.	163
Figura 50. Esquemático circuito visualizador.	164
Figura 51. Crecimiento en agar MacConkey: se observan colonias.	169
Figura 52. Evaluación Cepa 1 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	170
64	
Figura 54. Evaluación microscópica medio acetato, cepa 1 en tinción Gram y Negro Sudán B.	166
Figura 55. Evaluación Cepa 2 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	166
Figura 56. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 2 en tinción Gram y Negro Sudán B	167
Figura 58. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 3.	
Figura 53. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 1.	168
Figura 59. Evaluación Cepa 4 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	168
Figura 60. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 4.	170
Figura 61. Evaluación Cepa 5 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	171
Figura 62. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 5 en tinción Gram y Negro Sudán B.	171
Figura 63. Evaluación microscópica medio acetato, cepa 5 en tinción Gram y Negro Sudán B.	172
Figura 64. Evaluación Cepa 6 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	175
Figura 65. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 6 en tinción Gram y Negro Sudán B.	175
Figura 66. Evaluación Cepa 8 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	
Figura 67. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 8 en tinción Gram y Negro Sudán B.	175
Figura 68. Evaluación Cepa 9 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	176
Figura 69. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 9 en tinción Gram y Negro Sudán B.	176
Figura 70. Evaluación Cepa 10 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	176
Figura 71. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 10 en tinción Gram y Negro Sudán B.	175
Figura 72. Evaluación Cepa 11 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	175
Figura 73. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 11 en tinción Gram y Negro Sudán B.	177
Figura 74. Evaluación Cepa 12 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	178
Figura 75. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 12 en tinción Gram y Negro Sudán B.	178

Figura 76. Evaluación Cepa 13 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	178
Figura 77. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 13 en tinción Gram y Negro Sudán B.	179

## LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Ensayo de trazadores, inyección en profundidad.	50
Gráfica 2. Ensayo de trazadores, inyección en superficie.	50
Gráfica 3. Monitoreo de la prueba de esterilidad. empleando el sensor óptico - sistema de agitación neumático.	82
Gráfica 4. Monitoreo de la prueba de esterilidad. empleando el sensor óptico - sistema de agitación magnético.	84
Gráfica 5. Crecimiento de cepas en medios.	112
Gráfica 6. Crecimiento de cepas en los medios de cultivo de ácido acético.	113
Gráfica 7. Tiempo de acumulación intracelular de PHA.	114
Gráfica 8. Curva de crecimiento cepa 6.	116
Gráfica 9. Curva de crecimiento cepa 10.	117
Gráfica 10. Curvas de crecimiento cepas 6 y 10.	117
Gráfica 11. Curva de crecimiento microalgas.	118
Gráfica 12. Curva de calibración cepa 6.	120
Gráfica 13. Curva de calibración microalga <i>Chlorella vulgaris</i> sp.	120
Gráfica 14. Prueba de funcionamiento de los sensores de medida ópticos.	136
Gráfica 15. Curvas de calibración señal sensores ópticos vs absorbancia (720 nm).	137
Gráfica 16. Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 1.	138
Gráfica 17. Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 1.	138
Gráfica 18. Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 2.	139
Gráfica 19. Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 2.	139
Gráfica 20. Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 3.	140
Gráfica 21. Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 3.	140
Gráfica 22. Curva crecimiento cultivo mixto 1.	142
Gráfica 23. Curva crecimiento cultivo mixto 2.	143
Gráfica 24. Curva crecimiento cultivo mixto 3.	144
Gráfica 25. Acumulación de PHA- Experimento 1.	144
Gráfica 26. Acumulación PHA- Experimento 2	145
Gráfica 27. Acumulación de PHA- Experimento 3	146
Gráfica 28. Oxígeno disuelto bacterias en monocultivo.	147
Gráfica 29. Oxígeno disuelto microalga en monocultivo.	148
Gráfica 30. Oxígeno disuelto experimento 1.	149
Gráfica 31. Oxígeno disuelto experimento 2.	150
Gráfica 32. Oxígeno disuelto experimento 3.	150
Gráfica 33. Absorbancia Vs Concentración en células/ ml.	181
Gráfica 34. Absorbancia Vs Concentración en células/ ml.	182



## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Principales monómeros implicados en la síntesis de PHA.	30
Tabla 2. Tiempos de distribución de residencia calculados, inyección en superficie.	49
Tabla 3. Tiempos de distribución de residencia calculados, inyección en profundidad.	49
Tabla 4. Dimensiones del BR.	78
Tabla 5. Condiciones de cultivo.	80
Tabla 6. Costos directos.	86
Tabla 7. Costos indirectos.	87
Tabla 8. Biorreactores comerciales.	88
Tabla 9. Composición de agar nutritivo.	97
Tabla 10. Composición de agar-alga.	98
Tabla 11. Composición del antibiótico Cloranfenicol.	98
Tabla 12. Composición del medio nutritivo.	99
Tabla 13. Composición del medio melaza.	99
Tabla 14. Composición del medio MAC-1.	100
Tabla 15. Composición del medio MAC-2.	100
Tabla 16. Composición del medio MAA-1.	100
Tabla 17. Composición del medio MAA-2.	100
Tabla 18. Composición del medio utilizado para tinción con Negro Sudán B.	101
Tabla 19. Diluciones para la curva de calibración.	119
Tabla 20. Cantidad de células contadas en Cámara Neubauer.	141
Tabla 21. Promedio de cantidad de células.	142
Tabla 22. Resumen de resultados experimentos.	144
Tabla 23. Nomenclatura cepas microbiana.	169

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Esquemático circuito medidor.	163
Anexo B. Esquemático circuito visualizador.	164
Anexo C. Determinación de polihidroxicanoatos (PHA). mediante métodos de tinción en Agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.	165
Anexo D. Curva de calibración de la cepa 6.	181
Anexo E. Curva de calibración microalga <i>Chlorella vulgaris</i> sp.	182
Anexo F. Protocolos para preparación de medios de cultivo. usados en bacterias productoras de pha (GRESIA).	183
Anexo G. Técnica basada en negro de sudan para la determinación de PHA.	185

## ABREVIATURAS

**AGV:** Ácidos grasos volátiles

**ALR:** Reactor Air-lift

**BR:** Biorreactor

**CNC:** Control numérico computarizado

**CSTR:** Reactor de tanque agitado

**D<sub>B</sub>:** Diámetro del cuerpo del reactor o Riser

**D<sub>c</sub>:** Diámetro del bucle externo o Downcomer

**DQO:** Demanda química de oxígeno

**D<sub>T</sub>:** Diámetro de la cubierta

**D<sub>TP</sub>:** Diámetro del agujero que aloja el tapón en caucho-silicona

**FBR:** Fotobiorreactor

**FUA:** Fundación Universidad de América

**GRESIA:** Grupo de Investigación en Recursos, Ecología, Desarrollo Sostenible e Ingeniería Ambiental

**H<sub>A</sub>:** Altura del empaque en caucho-silicona

**H<sub>B</sub>:** Altura del cuerpo o Riser del BR

**H<sub>D</sub>:** Altura del Downcomer

**H<sub>T</sub>:** Altura del tubo de conexión de acero inoxidable

**K:** Constante de saturación

**LDR:** Fotorresistencia

**LED:** Diodo emisor de Luz

**MAA-1:** Medio ácido acético neutralizado con mayor concentración de vinagre

**MAA-2:** Medio ácido acético neutralizado con mayor concentración de melaza

**MAC-1:** Medio ácido acético no neutralizado con mayor concentración de vinagre

**MAC-2:** Medio ácido acético no neutralizado con mayor concentración de melaza

**MM:** Medio melaza

**MN:** Medio nutritivo

**OD:** Oxígeno disuelto

**P0:** población inicial

**PE:** Poliestireno

**PET:** Polietileno

**PHA:** Polihidroxialcanoatos

**PHAMCL:** Polihidroxialcanoatos de cadena media

**PHASCM:** Polihidroxialcanoatos de cadena corta

**PLA:** Ácido Poliláctico

**PP:** Polipropileno

**PVC:** Policloruro de vinilo

**r:** Velocidad de crecimiento

**RP:** Resina poliéster

**RTD:** Tiempos de Distribución de residencia

**SBR:** Reactor secuencial por lotes

**UAN:** Universidad Antonio Nariño

**UV:** Ultravioleta

**V:** Volumen de operación.

## GLOSARIO

**ARDUINO UNO:** placa electrónica la cual se basa en una plataforma de software libre, que permite programar circuitos electrónicos.

**BIOCOMPATIBILIDAD:** ausencia de compuestos tóxicos generados durante la degradación del polímero, es decir que no tienen efectos adversos en organismos.

**CÁMARA NEUBAUER:** instrumento que consiste en una placa gruesa con forma de portaobjetos, usada para determinar el número de partículas por unidad de volumen en un medio líquido.

**CEPA:** células genéticamente similares provenientes de un cultivo y con capacidad de reproducirse de una generación a otra.

**CULTIVO MIXTO:** siembra de diferentes especies de microorganismos, donde la naturaleza de sus propiedades permite forjar relaciones simbióticas entre los mismos.

**CULTIVO:** población de células en un lugar y tiempo establecido con ciertas condiciones para la generación de biomasa o producto deseado.

**DOWNCOMER:** en un reactor tipo air-lift hace referencia a un compartimiento donde el flujo es descendente por acción de la gravedad.

**ESPECTROFOTOMETRÍA:** técnica turbidimétrica que tiene como fundamento la interacción de la luz con las especies químicas presentes en la muestra, tiene como objeto estimar el crecimiento microbiano.

**FOTOAUTÓTROFOS:** también se denominan fotosintéticos. Son seres que, para sintetizar sus biomoléculas, utilizan como fuente de carbono el CO<sub>2</sub>, y como fuente de energía la luz solar.

**FOTOHETERÓTROFO:** capacidad de un organismo para utilizar la luz y fuentes de carbono orgánico como recurso energético (respirar de forma aerobia y hacer fotosíntesis simultáneamente).

**FOTOINHIBICIÓN:** impedimento para que los organismos realicen la fotosíntesis debido al exceso de radiación.

**FOTOSÍNTESIS:** transformación de la energía solar en energía química, elaborando azúcares a partir de dióxido de carbono, agua, nutrientes y luz.

**GELIFICACIÓN:** es un proceso que se da mediante la unión de cadenas macromoleculares dando como resultado la formación de una estructura polimérica ramificada.

**INCUBADORA:** equipo que permite mantener las condiciones ambientales (humedad y temperatura) idóneas para el crecimiento de microorganismos.

**MICROALGA:** microorganismos fotosintéticos que son altamente eficientes en la producción de biomasa, siendo fuente de biomoléculas o compuestos de valor industrial.

**NODEMCU:** es una placa de desarrollo basada en ESP8266, un chip que permite la conexión a una red Wi-Fi.

**QUIMIOAUTÓTROFOS:** organismos que obtienen la energía necesaria a partir de determinadas reacciones químicas, mediante la oxidación de compuestos inorgánicos e iones.

**QUIMIOHETERÓTROFOS:** los microorganismos pueden obtener del metabolismo de un mismo sustrato orgánico tanto la energía como la fuente de carbono.

**RASPBERRY PI 3:** es un pequeño dispositivo, generalmente una placa que funciona como un microordenador, se caracteriza por su bajo costo.

**RISER:** en un reactor tipo air-lift hace referencia a un compartimiento donde el flujo es ascendente.

**TERMOSTATO:** dispositivo que regula la temperatura a partir de una fuente de calor mediante un control ON/OFF.

**TRAZADOR:** es una sustancia que posee una concentración conocida, la cual puede detectarse con facilidad; sin alterar el comportamiento hidráulico del fluido, las sustancias trazadoras pueden ser colorantes, iones, elementos radioactivos, gases inertes o sustancias químicas.

**UART (UNIVERSAL ASYNCHRONOUS RECEIVER TRANSMITTER):** comunicación asíncrona (no requiere una señal de reloj) la cual permite una comunicación punto a punto, es decir, una forma de conectar dos dispositivos entre sí.

## RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros 100% biodegradables; sin embargo, los altos costos de operación limitan su comercialización e industrialización. Generalmente, estos biopolímeros se producen a partir de cepas axénicas lo que implica mantener condiciones de esterilidad, suplir elevados requerimientos energéticos e invertir en equipos de control; lo cual representa una enorme desventaja frente a la producción de polímeros de origen petroquímico<sup>1</sup>.

Se desarrolló un biorreactor de bajo costo totalmente funcional; capaz de mantener un ambiente controlado, aséptico y biológicamente activo. Esto se logró, mediante el diseño conceptual del equipo; definiendo las características deseables del proceso para así establecer los criterios de selección (volumen, material, modo de operación, sistema de agitación, geometría, cámara de incubación y sensor óptico de medida), los cuales estuvieron en función de referentes bibliográficos y la experimentación. Tras el diseño, se llevó a cabo la construcción de diferentes prototipos, los cuales fueron sometidos a diferentes pruebas con el fin de evaluar el funcionamiento y viabilidad de los mismos. Adicionalmente, el prototipo seleccionado cuenta con un dispositivo capaz de monitorear de forma continua y automática el crecimiento celular en tiempo real mediante un sensor óptico; basado en su simplicidad y flexibilidad permite modelar curvas de crecimiento microbiano. Su costo equivalente al año vigente (2020) es de \$1'627.300(COP) con una equivalencia a \$481,09(US).

Para el establecimiento del consorcio alga-bacteria, se identificaron tres sustratos potenciales y 13 cepas bacterianas productoras de PHA, previamente aisladas de un sistema de lodos activados. La elección del sustrato y la cepa estuvo en función de las cinéticas de crecimiento y la confirmación de la acumulación del biopolímero mediante tinciones Gram y negro de Sudán. El medio seleccionado es un medio modificado; se compone de melaza, orina y ácido acético adaptado a un pH neutro (7), el cultivo mixto está conformado por la microalga *Chlorella vulgaris* sp., y la cepa 6 (nomenclatura otorgada). Con base a las cinéticas de crecimiento de cada microorganismo se establecen 3 experimentos variando la concentración de microalgas y bacterias, esto con el fin de favorecer una relación sinérgica entre las mismas, es decir, suplir los requerimientos de oxígeno de las bacterias para la oxidación de materia orgánica y amoníaco tomando el oxígeno producido por las microalgas a través de la fotosíntesis, esta estrategia presenta un gran potencial hacia un intercambio de gases oxígeno-dióxido de carbono autosostenible; reduciendo así la demanda energética intrínseca en procesos con aireación. Se obtuvo que el primer experimento se comportó de manera estable en términos de la concentración de oxígeno disuelto obteniendo un valor promedio de 5 mg/l, en el experimento 2 presentó fluctuaciones a lo largo del proceso, mientras que en el experimento 3

---

<sup>1</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jersson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. 'Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production', *Bioengineering*, 2017, p. 55 <<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>>.

la concentración permaneció en 0 mg/l. En términos de la acumulación del biopolímero, los experimentos 2 y 3 logran tras 48 horas de incubación superar la densidad óptica (0,2) del primer experimento.

**Palabras clave:** Polihidroxicanoatos, Consorcio Alga-Bacteria, Ácido Acético, Biorreactor, Sensor Óptico, Intercambio De Gases.



## INTRODUCCIÓN

Parte del crecimiento y desarrollo económico sustenta como base energética fuentes fósiles (gas, petróleo y carbón), el uso de estos recursos no renovables ha ido en aumento a un ritmo vertiginoso desde la primera revolución industrial<sup>2,3</sup>. Particularmente, el petróleo toma un rol importante tanto en la sociedad del consumo como en el crecimiento económico industrial a nivel mundial, una de sus variantes es la producción de polímeros; productos versátiles, prácticos, de bajo costo, con propiedades físicas, químicas y mecánicas que hacen de este material indispensable en diversas maneras en el mundo moderno<sup>4</sup>. Sin embargo, su alta demanda lo convierte en uno de los responsables de una de las problemáticas ambientales más preocupantes del siglo XXI, su baja tasa de degradabilidad contribuye a su acumulación y, por tanto, a su compleja disposición. Según la organización Greenpeace, el 9% del plástico total producido ha sido reciclado, el 12% es incinerado, mientras el 79% restante ha sido arrojado en vertederos o en el medio ambiente. A esto se suma, que aproximadamente al año 8 millones de toneladas de basura llegan a mares y océanos, es decir que cada segundo 250 kilos de residuos plásticos se alojan en cuerpos de agua<sup>5</sup>. Frente a la necesidad de reducir el consumo de plásticos convencionales, preservar la biodiversidad y el ecosistema marino, reducir el cambio climático, diversificar la matriz energética y reducir la dependencia del petróleo; se ha centrado la atención en la síntesis de biomateriales con miras al uso de fuentes renovables, puesto que las alternativas tradicionales (incineración, reciclaje, fotodegradación o reutilización) no erradican de forma efectiva la magnitud real del problema<sup>6</sup>.

Reducir la producción de plásticos de origen petroquímico es uno de los principales desafíos en la comunidad científica. Estudios recientes se han enfocado en nuevas rutas de producción bajo el concepto de biorrefinería, donde se contempla la manufactura de bioproductos, entre los cuales se destacan los biopolímeros; estos bioplásticos se pueden clasificar en tres categorías: sintetizados químicamente, plásticos biodegradables basados en almidón y los polihidroxialcanoatos (PHA)<sup>7</sup>. Los polihidroxialcanoatos son polímeros totalmente biodegradables, no tóxicos, biocompatibles, sus propiedades

---

<sup>2</sup> CUBILLOS, Adela y ESTENSSORO, Fernando. *Energía y Medio Ambiente: Una Ecuación Difícil Para América Latina: Los Desafíos Del Crecimiento y Desarrollo En El Contexto Del Cambio Climático*, 2011.

<sup>3</sup> BENAVIDES, Henry. 'Información Técnica Sobre Gases de Efecto Invernadero y El Cambio Climático.', *Ideam*, 2007, p. 1–102 <<https://doi.org/IDEAM-METEO/008-2007>>.

<sup>4</sup> C.P, Raqueline; MONTEIRO, Juliana A.; DO SUL Ivar y COSTA Monica F., 'Plastic Pollution in Islands of the Atlantic Ocean', *Environmental Pollution*, 2018, p. 103–10 <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.096>>.

<sup>5</sup> GREENPEACE, España. *Plásticos En Los Océanos: Datos, Comparativas E Impactos*. 2014.

<sup>6</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. 'SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO', 2013, p. 77–115.

<sup>7</sup> SERAFIM, Luísa; LEMOS, QUEIRÓS, Diogo; ROSSETI, Simona y COSTA, Lemos, María. *Biopolymer Production by Mixed Microbial Cultures: Integrating Remediation with Valorization. Recent advances in biotechnology*, Vol. 1, 2016, p. 226-264.

(elastómeras, termoplásticas, mecánicas, físicas, químicas, etc.) residen en la elección del sustrato (fuente de carbono), del microorganismo y de las condiciones de cultivo<sup>8</sup>; por lo que podrían reemplazar paulatinamente polímeros como polipropileno, poliestireno y polietileno<sup>9</sup>. Sin embargo, uno de los principales obstáculos que enfrenta esta industria es su elevado costo de producción (2 a 5 €/kg)<sup>10</sup>, lo cual repercute de forma directa en su participación en el mercado siendo esta prácticamente despreciable. Este proyecto en conjunto con el grupo de investigación GRESIA plantea como una de las posibles soluciones a esta problemática el uso de cultivos mixtos fotosintéticos en lugar de cepas puras, esta tecnología es promisoría puesto que permite la implementación de fuentes de carbono a partir de fuentes renovables, la reducción de los requerimientos de oxígeno externo a partir del intercambio de gases in situ, y por consiguiente, la disminución de los costos energéticos asociados al proceso de aireación, los cuales representan más del 50% de la demanda energética del proceso<sup>11,12</sup>.

Este sistema básicamente se centra en potencializar la simbiosis entre dos microorganismos, en este caso la microalga *Chlorella Vulgaris sp.*, y una cepa bacteriana productora de PHA mediante el diseño y construcción de un equipo (reactor tipo airlift de bucle externo) que permita mantener las condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento de los mismos. Seguidamente, se seleccionó un sustrato que pudiera asociar ambos microorganismos en un mismo medio de cultivo. De manera paralela, preliminarmente mediante una técnica turbidimétrica (espectroscopia) se monitoreó el crecimiento microbiano y algal en un medio modificado, y con el fin de evaluar la viabilidad tanto de la cepa como del alga se realizó una curva de calibración mediante el recuento celular con cámara Neubauer. Cabe mencionar que uno de los parámetros de selección tomo como referencia la acumulación del biopolímero PHA mediante técnicas de identificación rápidas basadas en Negro de Sudán y Rojo Nilo. Finalmente, se establecieron tres concentraciones con el fin de evaluar la relación simbiótica en términos de transferencia de gases (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>), lo cual fue posible constatar mediante diferentes pruebas respirométricas que consistían en introducir una sonda multiparámetro y medir el oxígeno disuelto en el seno del fluido manteniendo las condiciones ambientales. La literatura y los resultados obtenidos sugieren que aumentar la cantidad de microalgas reduce la concentración de oxígeno disuelto, mientras que si esta se ve reducida las bacterias logran mejores tasas metabólicas, y, por tanto, la producción de PHA se ve favorecida. De igual manera, se podría inferir que la acumulación del biopolímero (PHA) no es dependiente de que el medio sea aerobio; puesto que,

---

<sup>8</sup> KOLLER, Martin.; MARŠÁLEK, Lukáš; MIRANDA DE SOUSA, Miguel y BRAUNEGG, Gerhart. 'Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate ( PHA ) Biopolyesters in a Sustainable Manner', 2017, p. 24–38 <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>>.

<sup>9</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 1.

<sup>10</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit, p. 77.

<sup>11</sup> LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. 'Process for Symbiotic Culture of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Chlorella Vulgaris* for in Situ CO<sub>2</sub> Mitigation', 2018., p.2.

<sup>12</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 11.

se alcanzó mayores tasas de acumulación de PHA ante la limitación de nutrientes esenciales como  $O_2$  y  $N_2$ . Sin embargo, estos microorganismos (bacterias) pueden acumular PHA durante su crecimiento sin la necesidad de someterlos a una condición de estrés; no obstante, implica que el tiempo de síntesis del biopolímero se vea prolongado.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un biorreactor de bajo costo para la disminución de los requerimientos de oxígeno externo en un consorcio alga-bacteria para la producción de Polihidroxialcanoatos (PHA).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Construir un biorreactor de bajo costo a escala laboratorio, para el cultivo del consorcio alga-bacteria.
- Determinar las condiciones de cultivo empleando tres sustratos (ácido acético, melaza - ácido acético y glucosa) para cepas productoras de PHA que han sido previamente aisladas.
- Establecer proporciones de inóculo alga-bacteria que favorezcan el aumento de la concentración celular del cultivo en el biorreactor por medio de las cinéticas de crecimiento.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

Los polihidroxicanoatos son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunos microorganismos como bacterias, arqueas y microalgas ante la limitación de nutrientes esenciales como oxígeno, nitrógeno o fósforo y el exceso de una fuente de carbono acumulan intracelularmente en forma de inclusiones citoplasmáticas, como material de reserva (fuente de carbono y energía)<sup>13,14</sup>. El interés comercial en este polímero reside en sus características termoplásticas, no tóxicas, biodegradables, biocompatibles, insolubles en agua y su síntesis a partir de fuentes renovables de carbono<sup>15</sup>.

Los grandes desafíos que enfrenta esta industria son atribuidos a su complejo procesamiento que trae consigo bajos rendimientos; esto se ve reflejado en los altos costos de producción. Además, al comparar estos biopolímeros frente a los de origen petroquímico, estos no poseen estructuras ni propiedades consistentes y su precio en el mercado es superior<sup>16</sup>. Por tanto, recientes estudios se han enfocado en buscar estrategias que permitan reducir los costos a partir de potencializar la producción a través del proceso de fermentación mediante sustratos que tengan como origen fuentes de desecho (renovables), empleando microorganismos que tengan altas tasas de duplicación y acumulación del biopolímero; con el fin de obtener una densidad celular y un contenido de PHA considerable en el menor tiempo posible. También, se contempla la modificación genética de los microorganismos para promover la producción de PHA, puesto que algunas cepas son selectivas con los sustratos (fuentes de carbono) o simplemente el crecimiento se ve limitado por el metabolismo y las condiciones ambientales durante la fermentación<sup>17</sup>. Sin embargo, uno de los mayores problemas se encuentra en la etapa de separación y purificación, ya que los métodos empleados pueden conllevar a la degradación del polímero, generar impactos ambientales negativos, la pureza obtenida es baja, es costoso, y se emplean altos volúmenes de compuestos volátiles y tóxicos<sup>18</sup>.

---

<sup>13</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit., p. 79.

<sup>14</sup> MÉNDEZ, Daniel. 'Modelamiento Matemático y Optimización Del Proceso de Producción de Polihidroxicanoatos Empleando La Bacteria Burkholderia Cepacia B27 a Partir de Ácidos Grasos.', 2016, p. 137.

<sup>15</sup> TAN, Giin Yu Amy; CHEN, Chia Lung; GE, Liva; WANG, Lin; LI, Yanhong; ZHAO, Lei; MO, Yu et al. 'Start a Research on Biopolymer PolyHydroxyalkanoate (PHA): A Review', *Polymers*, 2014, p. 54 <<https://doi.org/10.3390/polym6030706>>.

<sup>16</sup> WANG, Ying; YIN, Jin; CHEN, Guo-Qiang.. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current opinion in biotechnology*, 2014. 30C. 59-65. 10.1016/j.copbio.2014.06.001

<sup>17</sup> ÁLVAREZ-DA SILVA, Laura, 'Bioplásticos: Obtención y Aplicaciones de Polihidroxicanoatos', 2016, p. 38.

<sup>18</sup> KYNADI, Anna y SUCHITHRA, T.V, 'Polyhydroxyalkanoates : Biodegradable Plastics for Environmental Conservation Industrial & Environmental Biotechnology', 2014 <<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4642.5682>>.

Las ventajas de este polímero frente a los otros biopolímeros existentes es que gran variedad de cepas son capaces de sintetizarlo de forma natural, tienen aplicaciones de alto valor agregado en el campo de la biomedicina (apósitos de heridas, suturas quirúrgicas, ingeniería de tejidos, etc.). Además, pueden sustituir paulatinamente a los polímeros convencionales, ya que sus propiedades son semejantes<sup>19</sup>, asimismo al ser un polímero de origen verde es atractivo para las generaciones actuales y futuras; puesto que, actúa sobre una problemática ambiental.

**1.1.1 Clasificación.** Los PHAs se clasifican de acuerdo a su composición monomérica. De esta manera, se definen como polímeros de cadena corta (PHA<sub>SCL</sub>) a aquellos que estén conformados por monómeros 3 a 5 átomos de carbono; y polímeros que se compongan por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono se conocen como PHA de cadena media (PHA<sub>MCL</sub>)<sup>20</sup>. No obstante, es posible encontrar polímeros híbridos compuestos por monómeros de cadena corta y media.

La síntesis de PHA varía con respecto al microorganismo y la fuente de carbono empleada, esta condición da lugar a homopolímeros (uniformidad en las unidades monoméricas, se obtienen en presencia de una fuente de carbono específica) y copolímeros (monómeros con diferente longitud de cadena, presencia de diversas fuentes de carbono)<sup>21</sup>. La formación de un polímero de cadena corta o mediana está relacionado con la enzima encargada de la síntesis (sintasa), esta tiene una especificidad por el sustrato, es decir que actúa sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono<sup>22</sup>.

**Tabla 1.** Principales monómeros implicados en la síntesis de PHA.

Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena (# de carbonos)	Posición del grupo hidroxilo
3HP	Ácido 3-hidroxi-propiónico	3	3
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

**Fuente:** GONZÁLEZ, Yolanda, et al. 'Síntesis y Biodegradación de Polihidroxialcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano', *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, vol. 29.1, 2013, p. 77–115 <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007&lng=en&tlng=en)>.

<sup>19</sup> ÁLVAREZ-DA SILVA, Laura. Op. Cit., p. 3.

<sup>20</sup> CASTILLO, Diego. 'Efecto Del Gen FadH1 En La Producción de PHA Conteniendo Monomeros Insaturados Por Pseudomonas Putida', 2008, p. 16.

<sup>21</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit., p. 80.

<sup>22</sup> ARCOS, Monica. DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE UN BIORREACTOR DISCONTINUO, 2007.

Otro tipo de clasificación reside en la condiciones en que los microorganismos acumulan el polímero, es decir, bajo condiciones de estrés celular (escasos de nutrientes esenciales y exceso de una fuente carbono), y ante óptimas condiciones de crecimiento donde la acumulación no se ve limitada por la ausencia o carencia de nutrientes en el medio durante la fase de crecimiento, esta última no es común<sup>23</sup>.

**1.1.2 Propiedades.** Estos polímeros difieren en sus propiedades de acuerdo a la cantidad de unidades monoméricas presentes en su estructura. Los polímeros de cadena corta se caracterizan por ser termoplásticos, rígidos, cristalinos, cuentan con altas temperaturas de fusión (180 °C); generalmente son utilizados en la manufactura de productos desechable y envasado de alimentos. Por otra parte los polímeros de cadena media presentan características elastoméricas y propiedades mecánicas inferiores; sin embargo, su aplicación es útil a procesos de alto valor agregado, como suturas quirúrgicas, implantes, aplicaciones en el campo de la ingeniería biomédica, farmacéutica, etc.<sup>24,25</sup>.

Los PHAs son biopolímeros termoplásticos, biodegradables, elastoméricos, insolubles en agua e impermeables a gases, por lo que pueden ser usados en la elaboración de todo tipo de material biodegradable. Propiedades como baja difusividad de oxígeno y la resistencia al agua los hace útiles para aplicaciones en la industria de empaques, en la industria alimentaria para el envasado de alimentos y para la fabricación de botellas para bebidas. También, dichas propiedades los hacen candidatos para otro tipo de mercados como materiales de pesca, industria agrícola, etc.<sup>26</sup>.

**1.1.3 Biosíntesis PHA.** La síntesis de diferentes monómeros se encuentra en función de la fuente de carbono, así como del tipo de microorganismo. El PHA toma un papel importante en la supervivencia de los microorganismos ante condiciones de estrés, la escasez de nutrientes actúa como un desencadenante para el cambio metabólico hacia la biosíntesis de PHA, como reserva de energía y carbono<sup>27, 28</sup>. Las vías metabólicas del microorganismo (bacteria) están directamente vinculadas con las vías que conllevan a la biosíntesis del PHA como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la  $\beta$ -oxidación, la síntesis de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, el ciclo de Calvin y la vía de la serina. En condiciones ricas en nutrientes, altas cantidades de coenzima A son producidas a través del ciclo Krebs; el cual cohibe la síntesis de PHA al inhibir la 3-

---

<sup>23</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit., p. 80.

<sup>24</sup> *Ibíd.*, p. 83.

<sup>25</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 2.

<sup>26</sup> SINGH SAHARAN, Baljeet; GREWAL Anita y KUMAR, Pardeep. 'Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments', *Chinese Journal of Biology*, 2014, p. 1–18 <<https://doi.org/10.1155/2014/802984>>.

<sup>27</sup> KOLLER, Martin.; MARŠÁLEK, Lukáš; MIRANDA DE SOUSA, Miguel y BRAUNEGG, Gerhart. Op. Cit., p. 25.

<sup>28</sup> TAN, Giin Yu Amy; CHEN, Chia Lung; GE, Liva; WANG, Lin; LI, Yanhong; ZHAO, Lei; MO, Yu et al. Op. Cit., p. 709.

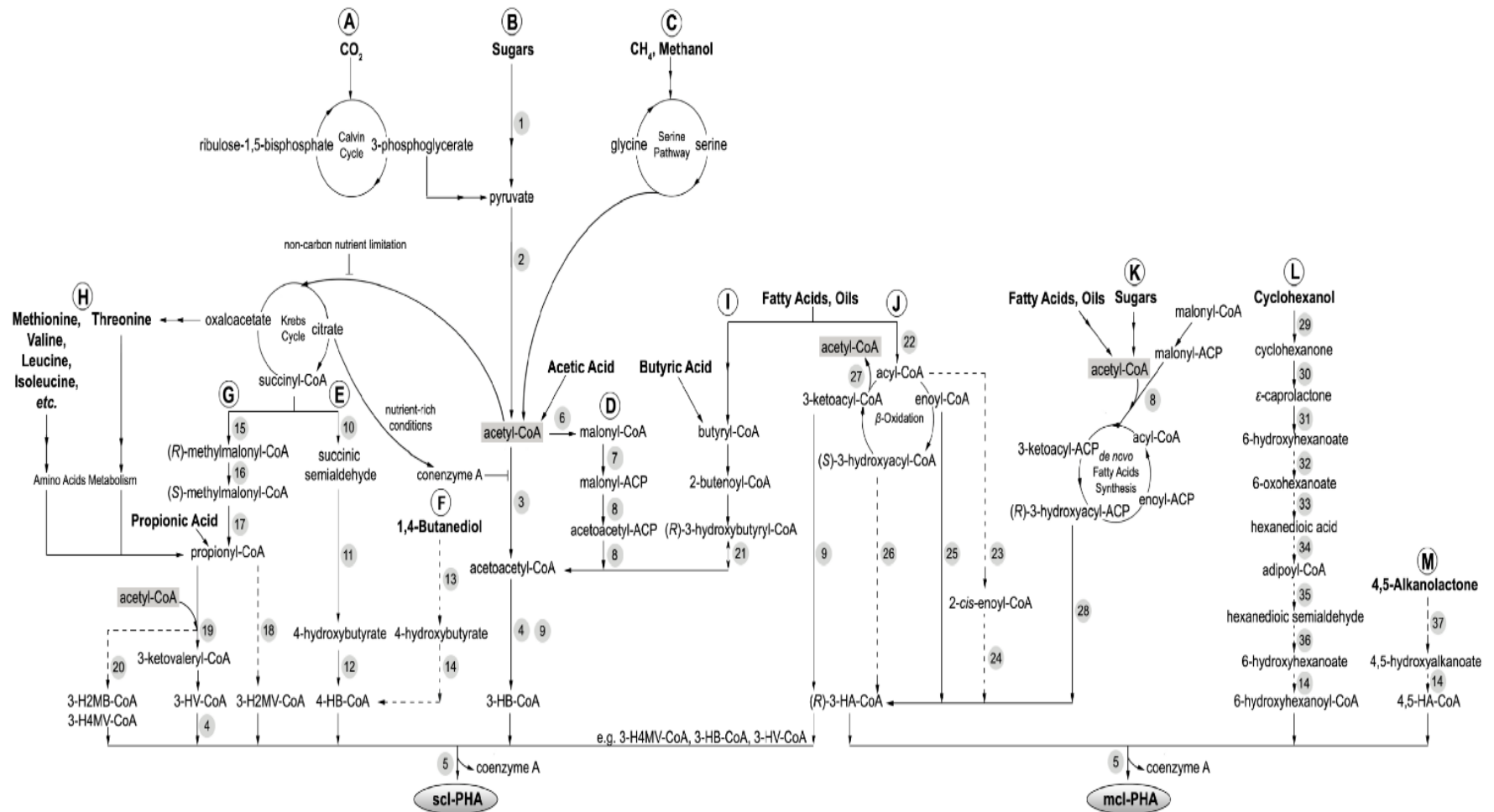
ketotiolasa (PHA) de manera que el acetil-CoA se encamina al ciclo Krebs en función de la producción de energía y el crecimiento celular (Figura 1). Por otra parte, bajo condiciones nutricionales desequilibradas (es decir, cuando un nutriente esencial como nitrógeno y fósforo es limitante en presencia de exceso de carbono), los niveles de coenzima A no son inhibitorios, lo que permite que el acetil-CoA se dirija hacia las vías sintéticas de PHA para la acumulación de PHA. Esta estrategia de regulación metabólica a su vez permite que los microbios que acumulan PHA maximicen los recursos de nutrientes en su adaptación a las condiciones ambientales<sup>29</sup>.

---

<sup>29</sup> *Ibíd.*, p. 709.



**Figura 1.** Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de PHA.



**Fuente:** TAN, G. Y. A., CHEN, C. L., LI, L., GE, L., WANG, L., RAZAAD, I. M. N., y WANG, J. Y. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. En: *Polymers*. 2014. 6(3), 706-754.

**1.1.4 Biodegradabilidad de PHA.** Los PHAs poseen propiedades termoplásticas, mecánicas y fisicoquímicas similares a las de los plásticos convencionales, lo que implica que pueden llegar a reemplazar de manera gradual plásticos como el polipropileno, polietileno y poliestireno. No obstante, su potencial radica en su biodegradabilidad; al ser sintetizados por microorganismos estos de igual manera pueden degradarlos hasta dióxido de carbono y agua bajo condiciones aerobias o hasta metano en condiciones anaerobias mediante enzimas PHA despolimerasas y PHA hidrolasas<sup>30,31</sup>. El tiempo de degradación está sujeto a factores como la naturaleza del polímero y las condiciones ambientales a las que sea expuesto<sup>32</sup>.

**1.1.5 Producción de PHA.** La producción de PHA se ha estudiado desde hace casi un siglo. Sin embargo, ha equiparado la atención de científicos e investigadores en los últimos años debido a las problemáticas ambientales generadas por la acumulación y la baja tasa de degradación de polímeros convencionales<sup>33</sup>. La producción de PHA no ha encontrado un punto de equilibrio, debido a los altos costo de la producción; el uso de sustratos de alta pureza puede representar hasta el 45% del costo total de producción<sup>34</sup>.

**1.1.5.1 Producción de PHA a partir de cultivos puros.** Actualmente la síntesis de PHA a escala industrial se basa en cultivos puros con sustratos bien definidos y en la preservación de condiciones asépticas durante la operación<sup>35</sup>. La comercialización e industrialización de estos polímeros no ha tenido éxito, debido a que su alto costo de producción es uno de los obstáculos más grandes que afronta esta industria, puesto que el precio de polímeros convencionales como polipropileno y poliestireno al año 2017 es de alrededor de US \$ 0,60-0,87 / lb, mientras que el costo del biopolímero en el mismo año supero entre 3 y 4 veces dicho valor, oscilando entre US \$ 2,25-2,75 / lb<sup>36</sup>.

---

<sup>30</sup> BAEZA, Rocío. Obtención De Polihidroxialcanoatos (PHA) Como Subproducto De Un Sistema De Tratamiento De Biomasa Adherida Y Su Incidencia En La Eliminación De Compuestos Disruptores Endocrinos Presentes En Efluentes De La Industria Papelera. 2011. ,p. 95.

<sup>31</sup> SERRANO, Julieth. 'Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros Producidos Por Microorganismos.: Una Solución Frente a La Contaminación Del Medio Ambiente', *Teoría y Praxis Investigativa*, 2010, p. 79–84 <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3702404&info=resumen&idioma=ENG>>.

<sup>32</sup> *Ibíd.*, p. 84.

<sup>33</sup> LEMOS, Ana C., y CORDOBA, Alexis M., Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial/Polyhydroxyalkanoates (PHA's) produced by bacteria and its potential application to industrial level. En: *Informador Técnico*. 2015., vol. 79, no. 1, p. 93

<sup>34</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 3.

<sup>35</sup> SERAFIM, Luísa; LEMOS, Paulo y REIS, María. Op. Cit., p. 227.

<sup>36</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 2.

Una alternativa sugiere modificar genéticamente los microorganismos con el fin transformarlos o bien potencializando su capacidad de acumular PHA, maximizando así la productividad y el rendimiento del proceso<sup>37</sup>.

**1.1.5.2 Producción de PHA a partir de cultivos mixtos.** Una alternativa que contribuiría a la reducción de costos asociados a las materias primas en la producción de PHA, es emplear cultivos mixtos, este tipo de cultivos emplea corrientes de efluentes como sustrato. Lo cual resulta ventajoso, puesto que a partir de una corriente de desecho, que no implica ningún costo se pueden obtener un producto con alto valor agregado<sup>38</sup>.

Se reporta que cuando se someten los microorganismos a periodos de abundancia y hambruna, se produce un crecimiento desequilibrado y debido a la dinámica del proceso, el metabolismo reacciona y como respuesta induce el almacenamiento de reservas internas en forma de inclusiones como fuentes de carbono y energía<sup>39</sup>.

**1.1.5.3 Producción de PHA a partir de cultivos mixtos fotosintéticos.** Nuevos estudios se han enfocado en cultivos fotosintéticos mixtos, puesto que la producción de PHA a partir de cepas fotosintéticas mixtas resulta bastante llamativa al disminuir los costos de operación, ya que no requieren de un sistema de aireación. El objetivo es establecer una relación simbiótica entre un organismo heterótrofo y un organismo autótrofo basado en el intercambio gaseoso (O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>)<sup>40</sup>. Las condiciones óptimas de operación para generar mayor acumulación de PHA requiere un régimen de abundancia e iluminación permanente<sup>41</sup>.

**1.1.6 Identificación de PHA.** Actualmente existen técnicas que permiten confirmar la presencia de los gránulos acumulados intracelularmente por los microorganismos, estas contemplan tinciones a base de colorantes como negro de Sudán, rojo de Nilo y azul de Nilo. Proporcionan alternativas rápidas, simples y económicas, ya que se basan en métodos sencillos y rápidos que permiten evidenciar la presencia del polímero<sup>42</sup>.

---

<sup>37</sup> SALAZAR, Diana P., 'Estudio Del Desarrollo Industrial En La Producción de Polihidroxialcanoatos En La Primera Década Del Siglo XXI', 2010.

<sup>38</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jerisson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. Op. Cit., p. 11.

<sup>39</sup> GARCÍA, Marta, 'PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA DE LA CERVEZA', 2015.

<sup>40</sup> LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. Op. Cit., p. 3.

<sup>41</sup> FRADINHO; REIS, M.A.M. y OEHMEN.A., 'Beyond Feast and Famine: Selecting a PHA Accumulating Photosynthetic Mixed Culture in a Permanent Feast Regime', *Water Research*, 2016, p. 428 <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.022>>.

<sup>42</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit., p. 86.

## 1.2 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

**1.2.1 Biorrefinería.** Agrupa procesos (biológicos, químicos y termoquímicos) y tecnologías que tienen como propósito transformar la biomasa en productos de interés comercial como combustibles, materiales, energía, productos químicos, etc. La eficiencia y viabilidad de una biorrefinería radica en la optimización de los recursos y reducción de residuos<sup>43</sup>.

La biomasa es el conjunto de materia orgánica de origen vegetal o animal, es considerada como una fuente de energía renovable ilimitada; producto de la fotosíntesis, que posibilita la obtención de diversos productos biológicos. Esta se puede clasificar en: biomasa de primera generación (cultivos agrícolas), biomasa de segunda generación (residuos agroindustriales) y biomasa de tercera generación (microalgas)<sup>44</sup>. La biomasa de primera generación resulta ser la más polémica puesto que afecta directamente la seguridad alimentaria, es decir que el precio de los alimentos se ve incrementado por la alta demanda para la producción de bioproductos, dando lugar a una crisis por desabastecimiento de las principales fuentes de alimentos, lo que conlleva a reemplazarla por la biomasa de segunda generación, la cual resulta ser una solución prometedora puesto que trata y aprovecha los residuos, dándoles un valor agregado. La biomasa de tercera generación aún se encuentra en desarrollo, emplea cultivos de microalgas que resultan ser económicos y útiles en diversas aplicaciones<sup>45</sup>.

**1.2.2 Proceso de producción para la síntesis de PHA bajo el concepto de Biorrefinería.** Este proceso contempla 3 etapas, la fermentación acidogénica en ausencia de oxígeno, la selección y acumulación del polímero usando como biomasa o sustrato corrientes de desecho.

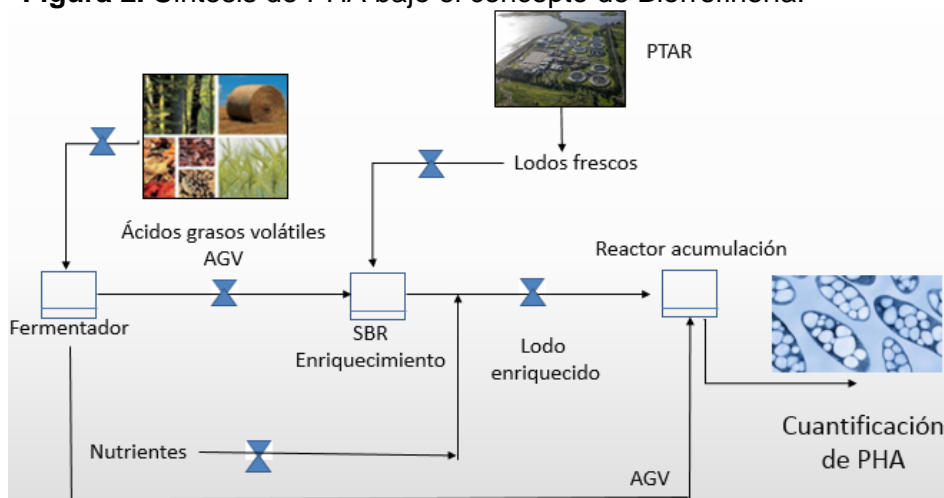
---

<sup>43</sup> PALOMINO, Angélica, 'EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ACIDOGÉNICO PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV) A PARTIR DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA DE LA INDUSTRIA CERVECERA, COMO PLATAFORMA DE BIORREFINERÍA MARÍA', 2016., p. 20.

<sup>44</sup> Coordinación de Energías Renovables y Dirección Nacional de Promoción. Energías Renovables- Biomasa. 2008.

<sup>45</sup> SALINAS, Eymar; GASCA, Victor. 'Los Biocombustibles', *El Cotidiano*, 2009, p. 75–82.

**Figura 2.** Síntesis de PHA bajo el concepto de Biorrefinería.



**Fuente:** UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO, Segundo Congreso Internacional de Desarrollo Sostenible y tercer Encuentro Internacional de Semilleros de Investigación. *Universidad Católica de Santa María, Universidad Sergio Arboleda.* 2017.

**1.2.2.1 Fermentación acidogénica para la obtención de AGV (Ácidos grasos volátiles).** Emplear como fuentes de sustrato biomasa de segunda generación, es una forma económica y viable de utilizar desechos orgánicos agroindustriales; además, reduce los altos costos de los sustratos empleados durante la síntesis de PHA en cultivos puros y de la misma manera es una alternativa que facilita la disposición de efluentes industriales. Sin embargo, al ser residuos y componerse por carbohidratos no se consideran un buen sustrato para inducir la síntesis de PHA, porque lo metabolizan en glucógeno. En esta fase, la fermentación acidogénica debe inhibir la fase metanogénica para que los AGV producidos no puedan ser consumidos, conocer la composición de los AGVs obtenidos resulta importante; puesto que, estos se alimentan como fuente carbono en el proceso de acumulación donde se lleva a cabo la síntesis del PHA, la cual está en función de la disponibilidad del tipo de AGV<sup>46</sup>.

**1.2.2.2 Selección de bacterias acumuladora de PHA.** Esta operación se da en un reactor secuencial por lotes (SBR), la alimentación del sustrato se realiza contemplando periodos de abundancia y hambruna, esta condición da lugar a la presión selectiva, la cual promueve naturalmente el crecimiento y supervivencia de aquellos microorganismos que son capaces de acumular el biopolímero, de igual manera está condición se relaciona directamente con el rol que toma el PHA como reserva de carbono y energía; impidiendo que los microorganismos que no sean capaces de producirlo no puedan utilizar dichas reservas bajo condiciones de estrés. El éxito de esta etapa, más específicamente cuando se

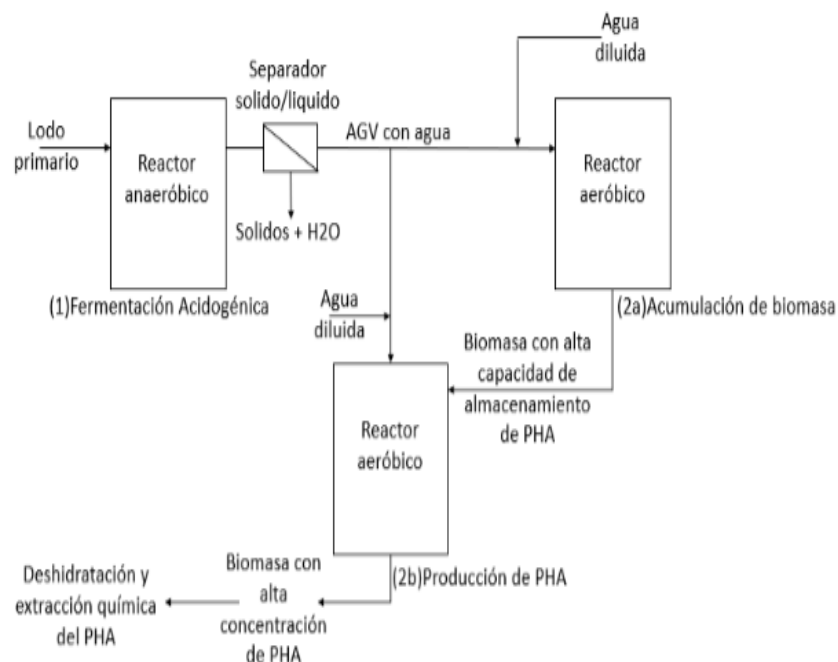
<sup>46</sup> ARCOS, Monica. DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE UN BIORREACTOR DISCONTINUO, 2007. Op. Cit., p. 23.

da la presión selectiva reside en la distribución de los tiempos de abundancia y hambruna, el cual debe ser menor a 0,21 h/h<sup>47</sup>.

La calidad del polímero está relacionada con el tipo de microorganismo o biomasa seleccionados y extraídos para el proceso de acumulación (producción o generación del biopolímero); en tal caso de que las bacterias no cumplan con la calidad requerida, los procesos de acumulación, extracción y purificación podrían verse afectados; representando sobrecostos en la operación<sup>48</sup>.

**1.2.2.3 Acumulación del Biopolímero.** El inóculo se realiza empleando el lodo producto de la selección de bacterias productoras de PHA. Esta fase tiene como fin aumentar la capacidad de almacenamiento de PHA, empleando los AGVs como fuente de carbono con trazas de azúcares obtenidos durante la primera fase, es decir la acidogénesis que dio lugar a la obtención de AGVs<sup>49</sup>.

**Figura 3.** Producción de PHA a partir de corrientes de desecho.



**Fuente:** PITTMANN, Timo y STEINMETZ, Heidrun, 'Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants', *Bioengineering*, 2017, p. 1–24 <<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020054>>.

<sup>47</sup> CHIVA, Sergio Vicent and others, *Depuración de Aguas Residuales: Digestión Anaerobia, Depuración de Aguas Residuales: Digestión Anaerobia*, 2018 <<https://doi.org/10.6035/uji.facs.2018.2>>.

<sup>48</sup> Liseth Camila Fonseca and María Fernanda Sánchez, 'EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL SUSTRATO PRINCIPAL (ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO ACÉTICO/ MELAZA) EN LA SELECCIÓN DE CULTIVO MIXTO DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHA, EN UN REACTOR AIR- LIFT', 2019., p. 31. <<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>>.

<sup>49</sup> *Ibíd.*, p. 31.

### 1.3 BIORREACTOR (BR)

Un biorreactor es un dispositivo o recipiente necesario para mantener las condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, flujo de gases, oxígeno disuelto y velocidad de agitación) a los microorganismos que se cultivan. Por tanto, el biorreactor provee un ambiente controlado que garantiza y maximiza la producción, y claramente el crecimiento de los microorganismos<sup>50</sup>. El diseño de un biorreactor implica tener en cuenta ciertos aspectos, como los que se evidencian en el siguiente cuadro.

**Cuadro 1.** Principales criterios del diseño de un biorreactor.

<b>Aspectos de diseño</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Distribución uniforme de las células en todo el volumen del medio.</li> <li>- Operación y montaje sencillo.</li> <li>-BR debe diseñarse de manera que funcione asépticamente, con el fin de evitar la aparición de contaminantes en las operaciones de bioprocesos de larga duración.</li> <li>- Sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.</li> <li>- Se debe procurar que el consumo energético sea el mínimo posible.</li> <li>- Entradas para suministro de nutrientes y control de pH, oxígeno disuelto. (Opcional).</li> <li>- Estabilidad de la temperatura ante el crecimiento de microorganismo.</li> <li>- Las características del diseño deben asegurar la axenicidad del cultivo; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado e inoculado con el microorganismo deseado.</li></ul>
---------------------------	--

**Fuente:** RUÍZ, H.A.; RODRÍGUEZ, R.M; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.C y AGUILAR, C.N., 'Diseño De Biorreactores Para Fermentación En Medio Sólido', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 6, 2007, p. 33–40.

<sup>50</sup> RUÍZ, H.A.; RODRÍGUEZ, R.M; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.C y AGUILAR, C.N., 'Diseño De Biorreactores Para Fermentación En Medio Sólido', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol 6.1, 2007, p. 33–40.

### 1.3.1 Modo de Operación.

**1.3.1.1 Batch.** La operación es sencilla, se aplica usualmente para tratar bajos volúmenes, no cuentan con corrientes de entrada ni salida o biomasa. Trabajar bajo un sistema Batch facilita la operación, se trabaja en un sistema cerrado, presenta un costo inicial menor que un reactor continuo, el costo inicial es menor con referencia a un reactor continuo, es versátil, el volumen es constante a lo largo de la operación. Sin embargo, como desventajas el costo de operación es mayor que en reactores continuos, requiere un ciclo de operación complejo, etc.<sup>51</sup>.

**1.3.1.2 Fed- Batch.** Opera de forma discontinua, es decir que la alimentación se da de forma intermitente mientras no haya efluente en el sistema, la adición del sustrato de manera discontinua o desequilibrada permite mejorar rendimiento en la fermentación<sup>52</sup>. Estos sistemas son más flexibles; sin embargo, su análisis y operación resulta ser más complejo. Básicamente al término de la operación se remueve un 80 o 90% de la producción total de biomasa, la cantidad retirada es sucedida con una cantidad directamente proporcional de medio de cultivo. Se podría decir que este proceso permite una especie de restablecimiento de la fase inicial o las condiciones iniciales con un inóculo de gran tamaño; de tal manera que suprime la fase de adaptación del microorganismo al medio, favoreciendo la velocidad de crecimiento<sup>53</sup>.

**1.3.1.3 Continuo.** Es ideal cuando se trabaja con grandes volúmenes de operación, permite un riguroso control sobre la calidad del producto<sup>54</sup>. Posee un flujo de entrada y salida de nutrientes definido y constante. La alimentación debe tener relación con la cantidad de nutrientes que son empleados y retirados del equipo. Un reactor CSTR (Reactor de mezcla completa) es un tanque en el cual la masa reaccionante se agita de forma continua, lo que implica que este opera de forma ideal; en consecuencia, se podría inferir que sus propiedades son uniformes en todos los puntos del reactor<sup>55</sup>.

**1.3.2 Clasificación de los reactores.** Estos se pueden clasificar de acuerdo a su diseño y configuración.

---

<sup>51</sup> GUILERA, Javier, 'Diseño De Un Biorreactor Para La Obtención De Quitosán', 2016, p. 32.

<sup>52</sup> *Ibíd.*, p. 33.

<sup>53</sup> MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel., *DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS*, 2017, p. 14.

<sup>54</sup> *Ibíd.*, p. 14.

<sup>55</sup> GUILERA, Javier. Op. Cit., p. 32.



**1.3.2.1 Fotobiorreactor (FBR).** Es un dispositivo empleado para el crecimiento de microorganismos fotótrofos, un FBR puede operar bajo dos diseños; sistemas abiertos en el cual el medio está expuesto a la atmósfera al contar y sistemas cerrados donde el cultivo no está directamente en contacto con el ambiente. Generalmente, este tipo de biorreactores han sido diseñados en materiales como vidrio, plexiglás y policarbonato al ser traslúcidos, contar con buenas propiedades mecánicas y un considerable tiempo de vida útil. Cabe señalar que los FBR también pueden ser empleados para el cultivo de microorganismos donde su crecimiento o productividad no está limitado por una fuente lumínica<sup>56</sup>.

Una característica que afecta el diseño de este tipo de BR es la relación superficie/volumen; puesto que si esta es pequeña la incidencia de luz a través del reactor resulta ineficiente y por tanto el proceso de fotosíntesis. Es necesario emplear este tipo de BR cuando se trabaja con microorganismos que requieran una fuente lumínica para favorecer la fotosíntesis<sup>57</sup>. Los FBR pueden encontrarse en sus configuraciones más generales, tales como: fermentadores, placa plana y tubulares<sup>58</sup>.

**1.3.2.2 Fotobiorreactores fermentadores.** Este tipo de FBR operan bajo un sistema cerrado; no obstante, presenta como desventaja una baja relación área/volumen dando un indicio sobre la luz que penetra el biorreactor es limitada y por tanto el rendimiento en términos de biomasa se ve reducido; para mitigar tal efecto es necesario introducir en el seno del fluido un sistema que provea la iluminación suficiente para lograr una mayor productividad<sup>59</sup>. Estos FBR están hechos de acero, vidrio y vidrio orgánico y se aplican principalmente en cultivos a escala de laboratorio<sup>60</sup>.

Este modelo resulta ideal para trabajar bajo condiciones axénicas en la producción de metabolitos con valor agregado<sup>61</sup>. Sin embargo, presenta un sistema de agitación que podría comprometer la integridad del cultivo, dado que al emplear un componente mecánico como paletas giratorias induce que los microorganismos sufran por estrés hidrodinámico, en este caso estrés por cizallamiento<sup>62</sup>.

---

<sup>56</sup> MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 22.

<sup>57</sup> CARVALHO, Ana; MEIRELES, Luís y MALCATA, Xavier. 'Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances', *Biotechnology Progress*. 2006., p.1490-1506.

<sup>58</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., p.22.

<sup>59</sup> CARVALHO, Ana; MEIRELES, Luís y MALCATA, Xavier. Op. Cit., p. 1496.

<sup>60</sup> PŁACZEK, Małgorzata; PATYNA, Agnieszka y WITCZAK, Stanisław., 'Technical Evaluation of Photobioreactors for Microalgae Cultivation', 2017, <<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171902032>>., p. 8.

<sup>61</sup> CARVALHO, Ana; MEIRELES, Luís y MALCATA, Xavier. Op. Cit., p. 1496.

<sup>62</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., p. 22.

**1.3.2.3 Fotobiorreactores de placa plana.** Trabajan bajo el concepto de alta relación área/volumen con el fin de aprovechar de forma óptima la energía solar. Esta configuración cuenta con una serie de ventajas que se ven representadas en altos rendimientos; cuenta con una unidad de transferencia abierta que es efectiva para evitar o prevenir la acumulación de oxígeno; a pesar de ello, tal condición promueve el contacto con el entorno de manera que el medio es totalmente susceptible a contaminarse por agentes externos. Generalmente están formados por dos láminas adhesivas de material transparente (vidrio, plexiglás, policarbonato) con la longitud de la ruta de la luz que penetra a través de él <sup>63</sup>. Este equipo es relativamente de bajo costo y fácil de limpiar; sin embargo, pueden surgir dificultades en términos del mantenimiento de la temperatura. El cultivo a gran escala puede requerir el uso de varios módulos e instalación de estructuras de soporte<sup>64</sup>.

**1.3.2.4 Fotobiorreactores tubulares.** Estos tipos de FBR se pueden dividir en tres configuraciones básicas: tubulares horizontales, tubulares helicoidales y air-lift.

➤ **Fotobiorreactor tubular helicoidal.** Este tipo de reactores son construidos a partir de polietileno o tubos de vidrio, los cuales se encuentran enrollados en un armazón circular abierto, el cual está ensamblado a una columna de intercambio de gas y a un intercambiador de calor. Una bomba centrífuga transporta el medio de cultivo hasta la columna de intercambio de gas<sup>65</sup>.

➤ **Fotobiorreactor tubular Horizontal.** Generalmente su operación se da al aire libre, su orientación hacia el sol da lugar a una alta y eficiente conversión de luz, la inyección de aire o gas se lleva a cabo en las conexiones de los tubos o en una unidad especial dedicada únicamente a este intercambio de gas. Este tipo de sistemas cuentan con la ventaja de que son capaces de operar con grandes volúmenes, debido a que su probabilidad de contaminación es mínima. Como desventaja la temperatura se ve incrementada debido a que este genera una gran cantidad de calor<sup>66</sup>.

---

<sup>63</sup> CARVALHO, Ana; MEIRELES, Luís y MALCATA, Xavier. Op. Cit., p. 1495.

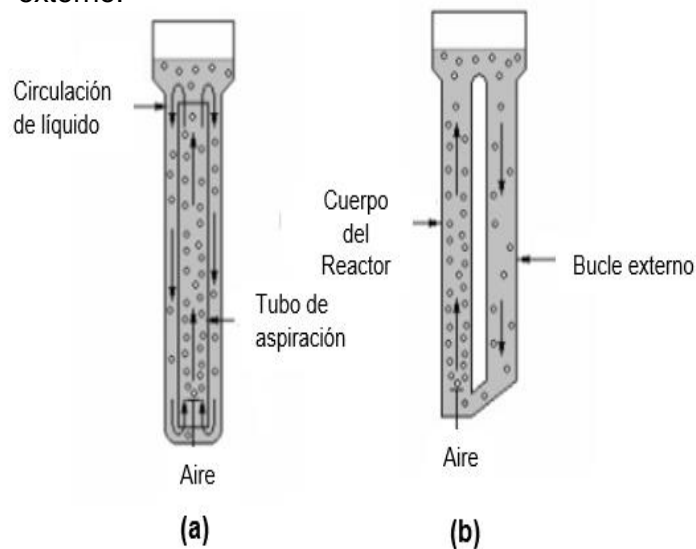
<sup>64</sup> PŁACZEK, Małgorzata; PATYNA, Agnieszka y WITCZAK, Stanisław. Op. Cit., p. 23.

<sup>65</sup> RAMÍREZ, Luis G.; JACOB-LOPES, Eduardo y QUEIROZ, Leila. 'Fotobiorreactor: Herramienta Para Cultivo De Cianobacterias', *Ciencia y Tecnología*, 2014, p. 9–19 <<https://doi.org/10.18779/cyt.v6i2.90>>.

<sup>66</sup> *Ibíd.*, p. 15.

➤ **Fotobiorreactor Air-lift.** Dispone de un sistema de agitación neumática el cual asegura el suministro de nutrientes a nivel celular, previene la sedimentación y asegura un buen intercambio de gases entre los microorganismos. Este tipo de configuración air-lift causa que el líquido circule entre dos zonas interconectadas conocidas como la zona de ascenso o riser y la zona descenso o downcomer las cuales permiten una mejor circulación de la mezcla. Otra ventaja respecto a los demás tipos de reactores es que no se generan grandes gradientes de esfuerzo de corte (cizallamiento) que causan en las células tensión mecánica en áreas donde la turbulencia es alta, pues dichos esfuerzos son homogéneos provocando menos estrés celular. Este biorreactor se puede encontrar configurado como: tipo air-lift de bucle externo o de tubos concéntricos<sup>67</sup>.

**Figura 4.** Biorreactores Air-lift: (a) tubos concéntricos o bucles internos, (b) bucle externo o de ciclo (loop) externo.



**Fuente:** SHANG-TIAN, Yang. Bioreactor Engineering. En: *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources New Technologies and Applications*. 2007. p. 135-136.

En un biorreactor de tubos concéntricos **(a)** el aire se alimenta a través de un anillo hacia la parte inferior de un tubo de aspiración central, el cual dirige la circulación de las burbujas de aire y el líquido, dichas burbujas fluyen de forma ascendente dentro del tubo; algunas de las burbujas se unen y salen por la parte superior de la columna, mientras que otras siguen el líquido desgasificado y circulan hacia abajo. Mientras que un biorreactor de bucle externo **(b)** posee un compartimento acoplado al cuerpo del reactor, el cual expulsa burbujas en la sección que está fuera del tubo de aspiración; el movimiento del gas produce un movimiento ascendente del líquido lo que induce su salida por la parte superior dejando a su paso el fluido con mayor densidad libre de burbujas recirculando

<sup>67</sup> YANG, Shang-Tian. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewal Resources - New Technologies and Applications*, 2007., p. 135-137.

en forma descendente por el bucle externo o downcomer (zona o compartimento donde la dirección del flujo es descendente). La turbulencia es generalmente mayor en el conducto ascendente que en la sección descendente<sup>68</sup>.

### 1.3.3 Variables a Controlar.

**1.3.3.1 Suministro de nutrientes.** Con el fin de satisfacer las necesidades nutritivas de los microorganismos, es necesario conocer sus exigencias nutritivas, las cuales son específicas para cada microorganismo. Estas se pueden clasificar en macronutrientes (se suministran en alta proporción) y micronutrientes (se suministran en menor proporción)<sup>69</sup>.

Las cepas capaces de sintetizar PHA usualmente lo hacen mejor con la limitación de uno o más nutrientes y un exceso de la fuente de carbono; sin embargo, se ha demostrado que cuando hay un cultivo mixto la acumulación del biopolímero se puede realizar sin limitación de algún nutriente, por lo cual esta condición no limita el crecimiento. No obstante, el uso de este tipo de cultivos es flexible con el empleo de fuentes de desecho como sustrato<sup>70</sup>.

Por otra parte, la *Chlorella vulgaris* sp., realiza fotosíntesis en presencia de luz, para formar azúcares a partir de CO<sub>2</sub> y agua. Además de absorber el CO<sub>2</sub> de su entorno, requieren nutrientes como carbono, nitrógeno y sales minerales en menor proporción como fósforo<sup>71</sup>. Sin embargo, estas condiciones no son limitantes, las microalgas pueden hacer fotosíntesis y crecer al mismo tiempo bajo diferentes fuentes de nutrientes, pero el suministro de estas determinará su metabolismo<sup>72</sup>. En el cuadro 2 se puede observar bajo qué condiciones las microalgas pueden ser autótrofas o heterótrofas o bien las combinaciones tróficas de ambas, que se traduce en mixotrofia.

---

<sup>68</sup> *Ibíd.*, p. 136.

<sup>69</sup> MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. *Op. Cit.*, p. 17.

<sup>70</sup> KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jersson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. *Op. Cit.*, p. 11.

<sup>71</sup> DÁVILA, Ana. 'Evaluación de Las Condiciones de Cultivo Autotrófico de Microalgas *Chlorella*', *Universidad de San Francisco de Quito*, 2013, p. 28.

<sup>72</sup> PÉREZ, Raúl. 'ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUA RESIDUAL USANDO UN SISTEMA INMOVILIZADO MICROALGA-BACTERIA EN CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO y MIXOTRÓFICO', 2009, p. 9-11. <[https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez\\_r.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez_r.pdf)>.

**Cuadro 2.** Características metabólicas en función de la fuente de nutrientes.

Modo de nutrición (Regímenes)	Características metabólicas				
	Fuente Energética	Fuente de Carbono	Respiración	Donador de electrones	Requerimientos de luz
<b>Autótrofo</b>					
Fotoautotrófico oxigenico	Luz	CO <sub>2</sub>	Aeróbica	H <sub>2</sub> O	Obligado
Fotoautotrófico anoxigenico	Luz	CO <sub>2</sub>	Anaeróbica	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S	Facultativo
Quimioautotrófo	N, S y Fe inorgánicos	CO <sub>2</sub>	Anaeróbica	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S	Nulo
<b>Heterótrofo</b>					
Fotoheterotrófico	Luz	CO <sub>2</sub> C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Obligado
Quimioheterotrófico	C-orgánico	C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Nulo
Mixotrófico	Luz C-orgánico	CO <sub>2</sub> C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Facultativo

**Fuente:** PÉREZ, Raúl. 'ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUA RESIDUAL USANDO UN SISTEMA INMOVILIZADO MICROALGA-BACTERIA EN CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO y MIXOTRÓFICO', 2009, p. 9. <[https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez\\_r.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez_r.pdf)>.

**1.3.3.2 Intercambio de gases.** Este es un parámetro importante puesto que cada microorganismo tendría el potencial de usar el gas producido por el otro, es decir, el CO<sub>2</sub> liberado por las bacterias es utilizado por las microalgas y asimismo del O<sub>2</sub> proporcionado por las microalgas es utilizado por las bacterias<sup>73</sup>.

**1.3.3.3 Suministro de luz.** La fuente lumínica que suministre luz al biorreactor puede ser natural, artificial o una mezcla de las mismas; sin embargo, es necesario mantener un control de esta variable puesto que cada cepa cuenta con una constante de saturación luminosa, es decir que exponer organismos fotótrofos a altos niveles de luminosidad o de luz puede provocar inhibición en el crecimiento; esta condición se conoce como fotoinhibición<sup>74</sup>, la cual es totalmente dependiente de la concentración. Cabe aclarar que la exposición de dichos organismos a niveles mínimos de luz puede producir efectos adversos en el cultivo como un reducido crecimiento y por consiguiente una densidad celular prácticamente despreciable.

<sup>73</sup> SFORZA, Eleonora; PASTORE, Martina; SPAGNI, Alessandro y BERTUCCO, Alberto. 'Microalgae-Bacteria Gas Exchange in Wastewater : How Mixotrophy May Reduce the Oxygen Supply for Bacteria', 2018, p. 1-6.

<sup>74</sup> FERNÁNDEZ, Miguel. 'Diseño , Montaje y Caracterización de Fotobiorreactores Airlift Para El Cultivo de La Microalga Chlorella Sorokiniana', 2013, p. 9.

**1.3.3.4 Oxígeno disuelto.** Este parámetro resulta esencial puesto que variedad de microorganismos necesita el oxígeno para subsistir en el medio. Por lo tanto, es un factor clave durante la síntesis de PHA. Estudios han revelado que mínimas concentraciones de OD impiden la generación de biomasa y, por tanto, la producción de PHA, mientras que elevadas concentraciones de oxígeno disuelto (próximas a la saturación) inhiben la síntesis de PHA. Las rutas propuestas para este tipo de biopolímeros señalan que gran cantidad de sustrato se inclina hacia el crecimiento celular, siempre y cuando haya un exceso de oxígeno<sup>75</sup>.

**1.3.3.5 Temperatura.** La temperatura es otra de las variables importantes en el proceso, puesto que no controlarla puede llegar a tener un efecto nocivo sobre el cultivo; afectando la composición, la velocidad de crecimiento al desnaturalizar las enzimas, proteínas y proteínas transportadoras<sup>76</sup>.

El continuo seguimiento y control de esta variable garantiza el crecimiento de los microorganismos; varios estudios han llevado a cabo sus ensayos tomando una temperatura de 30°C, no obstante, se registran reportes de otras investigaciones que han utilizado rangos entre 22°C y 37°C, independientemente de la cepa y del sustrato en bacterias productoras de PHA. Las bajas temperaturas que comprenden rangos entre 15 y 20°C reducen los costos energéticos; sin embargo, se reporta que el rendimiento de la biomasa se ve reducido conforme la temperatura decrece<sup>77</sup>.

Las microalgas son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura en el cual la viabilidad y el desarrollo de la población es óptima, aunque generalmente varía con la especie, en el caso de la *Chlorella vulgaris* sp., el crecimiento logarítmico u exponencial se encuentra en un intervalo de 15°C a 25°C<sup>78</sup>. Para un consorcio formado por microalgas y bacterias, la influencia de la temperatura es el resultado de todos los microorganismos.

---

<sup>76</sup> AGATÂNGELO Joaquim y DOS SANTOS, Eduardo. 'Microorganismos de Interés En Seguridad Alimentaria Con Modelos Matemáticos', *Universidad Autonoma de Barcelona*, Tesis Doct.Facultad de Veterinaria, 2007, p. 1–282.

<sup>77</sup> MONTAÑO, Liliana. Modelado Matemático De La Acumulación De Polihidroxialcanoatos (PHA) En Cultivos Mixtos Durante El Tratamiento De Aguas Residuales. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011, p. 17.

<sup>78</sup> GARCÍA, Rafael. 'Producción de Biomasa de Microalgas Rica En Carbohidratos Acoplada a La Eliminación Fotosintética de CO<sub>2</sub>', *Cosejo Superior de Investigación Científica*, 2011 <<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340812.x>>.

**1.3.3.6 Agitación.** La agitación es un proceso esencial puesto que fomenta la transferencia de gases y calor, mezcla ideal (homogénea), una distribución óptima de nutrientes, homogeneización de la temperatura y pH; además, evita que se precipiten o sedimenten las células. Para inducir el movimiento del fluido bien sea líquido o gaseoso es necesario someterlo a una fuerza mecánica, esta fuerza implica la ruptura del flujo laminar dando a lugar un flujo turbulento, este puede transmitirse por medio de dispositivos como paletas giratorias o rotatorias, hélices, tornillo de Arquímedes, deflectores, bombas centrifugas, inyección de aire (air-lift), etc.<sup>79</sup>.

La elección del sistema de agitación es importante puesto que los esfuerzos por corte y cizalla podrían representar daños en la célula; para minimizar este efecto se puede implementar un sistema air-lift<sup>80</sup>.

**1.3.3.7 pH.** Esta variable toma gran importancia en la síntesis de PHA, puesto que cada cepa o microorganismo crece de forma óptima en un determinado valor de pH; no obstante, es posible que crezcan dentro de un rango bajo ciertos límites de tolerancia. No tener este parámetro en cuenta puede afectar negativamente el cultivo, produciendo daños en la membrana citoplasmática e inhibición de la actividad tanto enzimática como en las proteínas transportadoras<sup>81</sup>. Diferentes estudios han evaluado la influencia del sustrato, la temperatura y el conjunto de estas variables. Generalmente, se emplea un rango muy amplio que puede tomar valores entre 2.0 y 11.0, sin embargo, un pH neutro es frecuentemente usado en las diferentes investigaciones<sup>82</sup>.

### **1.3.4 Comportamiento Hidráulico.**

**1.3.4.1 Tiempos de Distribución de residencia (RTD).** Si se desea estudiar el comportamiento real en un reactor desde el punto de vista hidrodinámico, es necesario establecer el comportamiento real del flujo. Es decir, determinar el tiempo en el cual los elementos diferenciales del fluido permanecen en el reactor desde el momento en el que ingresan hasta que dejan el equipo. La idealidad del proceso puede verse afectada por cortocircuitos, recirculaciones y zonas muertas en la unidad<sup>83</sup>. El tiempo de distribución o de residencia teórico ( $\tau$ ) se define como la relación entre el volumen o capacidad total del equipo (V) y el flujo o caudal de alimentación (Q).

---

<sup>79</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., p 30.

<sup>80</sup> FERNÁNDEZ, Miguel., Op. Cit., p 15.

<sup>81</sup> SÁNCHEZ, Iván. "Producción De Bioplásticos Polihidroxialcanoatos (Phb) a Partir De Lixiviados De Basura Orgánica". 2016.

<sup>82</sup> *Ibíd.*, p. 13.

<sup>83</sup> SANTACRUZ, Carolina, 'Aplicación de Modelos Para La Evaluación Hidrodinámica de Un Sedimentador de Alta Tasa', 2005, p. 5-15.

**Ecuación 1.** Tiempo de residencia teórico.

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

**Fuente:** Universidad nacional autónoma de México. Ingeniería ambiental. [Sitio WEB]. México: La entidad. [Consultado el 12 agosto, 2019]. Disponible en: <http://132.248.9.34/ptb2005/01177/0343336/0343336.pdf>.

**1.3.4.2 Ensayo de trazadores.** Con el fin de evaluar el comportamiento hidráulico en un reactor y determinar los tiempos de distribución de residencia (RTD) en el mismo, resulta ideal emplear un ensayo de trazadores. Este consiste en implementar una técnica conocida como estímulo-respuesta; donde se genera una señal o un estímulo en el flujo de entrada con la finalidad de inducir una respuesta en el efluente del reactor por medio de la adición de una sustancia trazadora con una concentración inicial conocida, básicamente permite determinar en un lapso la distribución de la concentración del trazador en función del tiempo<sup>84,85</sup>.

**Figura 5.** Técnica de estímulo-respuesta en una unidad de tratamiento.



**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 22.

El DTR depende del tipo de flujo y de la forma de inyección del trazador. Fogler plantea dos metodologías para la inyección de este:

- 1) Por Escalón: Aplicando esta metodología a la entrada se puede observar un cambio en la concentración del trazador, es decir que su estado estacionario fue modificado de manera abrupta.
- 2) Por pulso: Vertiginosamente se inyecta cierta cantidad del trazador en la corriente de entrada del reactor. Posteriormente, se registra la concentración en la salida dando como resultado una curva de la concentración en función del tiempo<sup>86</sup>.

<sup>84</sup> Ibid., p 45

<sup>85</sup> Marroquin, Jorge. Op. Cit., p. 19.

<sup>86</sup> FONT VICENT, Enrique, 'Estudio Del Comportamiento Hidrodinámico de Un Reactor Biológico Con Sistema de Aireación Superficial Con Turbinas de Eje Vertical', 2014, p. 24.



- 3) De acuerdo a los estudios planteados en el proyecto de grado “Desarrollo de biorreactores controlados aplicables al estudio de cultivos de microorganismos de interés comercial” plantea el ensayo de trazadores por triplicado para biorreactores tipo air-lift de bucle externo en un lapso de 24 horas; empleando como sustancia trazadora colorante verde limón e inyectando por pulso en la corriente de alimentación, obtiene los siguientes resultados<sup>87</sup>:

**Tabla 2.** Tiempos de distribución de residencia calculados, inyección en superficie.

Reactor	V (mL)	v (mL/min)	RTD Teorico (min)	RTD exp (min)	Error relativo
1	144	0,20	720	674	6,4%
2	148	0,21	694	702	1,2%
3	148	0,21	716	713	0,4%

**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. ‘DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL’, 2019, p. 61.

**Tabla 3.** Tiempos de distribución de residencia calculados, inyección en profundidad.

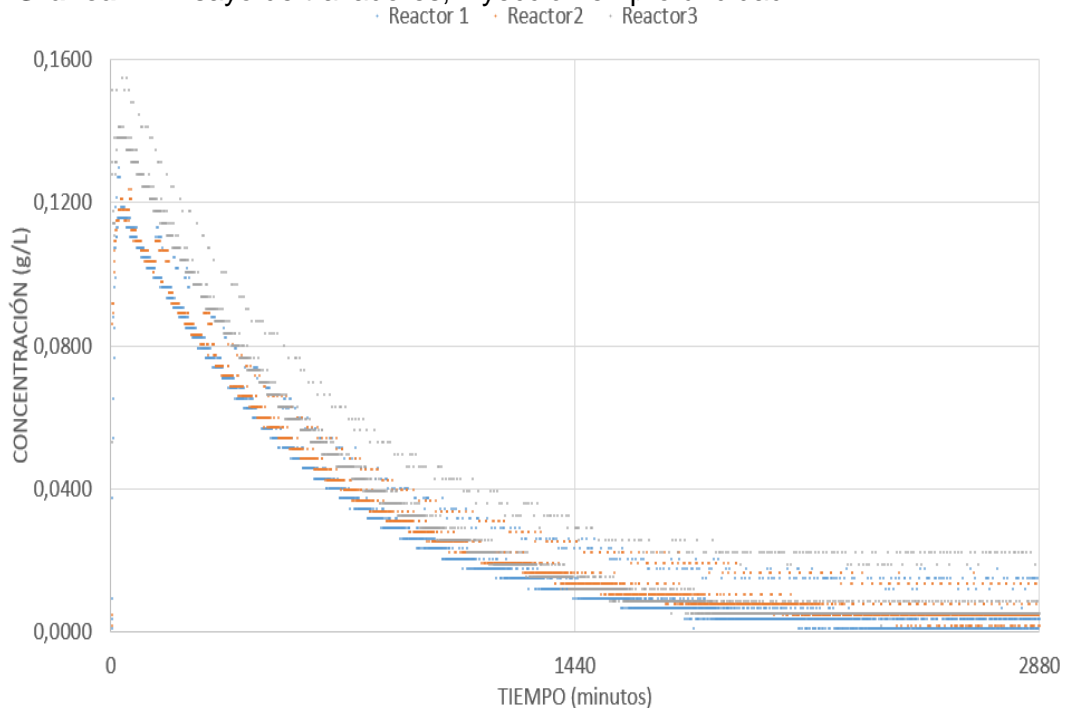
Reactor	V (mL)	v (mL/min)	RTD Teorico (min)	RTD exp (min)	Error relativo
1	145	0,21	702	635	9,5%
2	143	0,20	698	704	0,9%
3	148	0,21	716	676	5,6%

**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. ‘DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL’, 2019, p. 61.

De acuerdo a la tabla 3 y 4, se puede constatar que el error relativo entre RTD teórico y el RTD experimental varía entre un 0,4% y 9,5% en ambos experimentos, lo cual es un gran indicio para verificar la idealidad del reactor. Concluyendo que este opera bajo la modalidad de CSTR (reactor de tanque agitado) presentando ausencia de problemas de tipo hidráulico como cortocircuito, recirculación y zonas muertas.

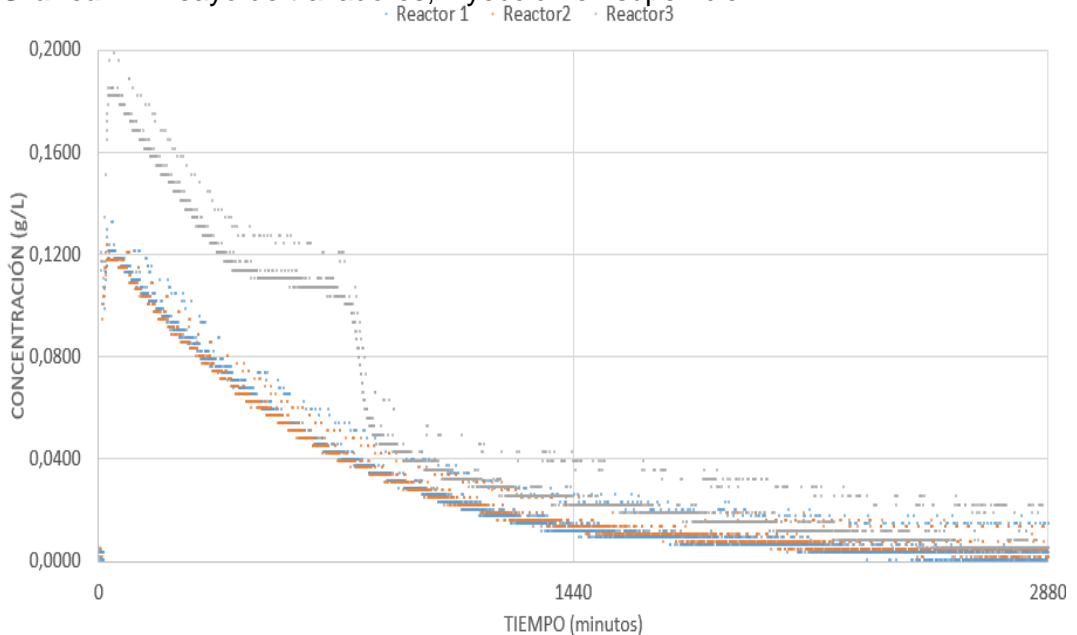
<sup>87</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., 19.

**Gráfica 1.** Ensayo de trazadores, inyección en profundidad.



**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 62.

**Gráfica 2.** Ensayo de trazadores, inyección en superficie.



**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 62.

Como segundo indicador la geometría o el comportamiento de las gráficas resulta ser un punto clave para determinar la idealidad del sistema, es decir que

un pulso inicial estilo delta de Dirac seguido de un decrecimiento exponencial indica la mezcla perfecta en el biorreactor<sup>88</sup>.

**1.3.4.4 Curvas de crecimiento.** Al estudiar el crecimiento microbiano, más específicamente sus fases y la manera de establecer el comportamiento de las mismas, la obtención de metabolitos de interés, resultados ante cambios químicos o físicos u otros aspectos que se encuentran directamente relacionados con el aumento de la densidad celular o el crecimiento poblacional en función del tiempo, se conoce como cinéticas de crecimiento<sup>89</sup>. Donde es posible dilucidar el número de células viables por mililitro de medio (líquido) de cultivo, en este tipo de ensayos se mantiene un volumen y una cantidad de nutrientes limitados<sup>90,91</sup>.

El crecimiento bacteriano se representa de forma gráfica, donde es posible diferenciar cuatro fases por medio de una curva que relaciona el tiempo y la concentración celular.

➤ **Fase de latencia o adaptación.** Se define como el intervalo de tiempo entre la inoculación del microorganismo y la fase exponencial. Esta se caracteriza por ser una fase de donde la población microbiana se adapta al nuevo medio e induce la síntesis de enzimas para activar el metabolismo celular. El tiempo de duración está ligado al cambio entre el ambiente o el medio actual y el anterior, es decir que microorganismos que hayan sido sometidos a procesos de refrigeración o desecación tenderán a tener mayores tiempos de latencia. Adicionalmente la duración de esta fase implica factores como el pH, la temperatura, estado y tamaño del inóculo y disponibilidad de nutrientes<sup>92</sup>.  $\mu = 0$ .

$\mu =$  Velocidad específica de crecimiento ( $t^{-1}$ ) Fase exponencial.

➤ **Fase exponencial.** En esta etapa es posible evidenciar un crecimiento exponencial de la población microbiana y un aumento significativo en la actividad metabólica de las células; sin embargo, durante ese periodo tienden a ser susceptibles a condiciones adversas, es decir alteraciones en el medio a causa de agentes físicos o químicos.

$\mu = \mu_{\text{máx}}$ .

---

<sup>88</sup> FONT VICENT, Enrique. Op. Cit., p. 32.

<sup>89</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., p. 32.

<sup>90</sup> *Ibíd.*, p. 32.

<sup>91</sup> BIKANDI, Joseba. 'Cinética de La Fase Exponencial de La Curva de Crecimiento Microbiano', *Departamento de inmunología, microbiología y parasitología facultad de farmacia*, 2014, p. 8.

<sup>92</sup> AGATÂNGELO Joaquim y DOS SANTOS, Eduardo. Op. Cit. 28.

➤ **Fase estacionaria.** Esta comprende el lapso en el cual se presenta el agotamiento de los nutrientes esenciales, la acumulación de metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos para el microorganismo, un crecimiento críptico, es decir que la tasa de muerte microbiana es compensada con el crecimiento de nuevas células (balanceando la población), también se puede apreciar un descenso en la actividad metabólica y un incremento nulo en el número de células<sup>93</sup>.

$$\mu = 0.$$

➤ **Fase de muerte o declinación.** Ante el agotamiento o la escasez de nutrientes y condiciones ambientales adversas para el crecimiento óptimo se da a lugar la lisis celular obteniendo que la tasa de muerte celular es mayor a la de crecimiento.

$$\mu < 0.$$

**Figura 5.** Fases de curvas de crecimiento



**Fuente:** TORTORA Gerard J., FUNKE Berdell R., CASE Christine L. 2007. Introducción a la microbiología. 9a. ed. Pearson Educations., United states, 931p.

➤ **Técnicas de recuento de microorganismos.** Las poblaciones microbianas se suelen medir a través de métodos directos e indirectos, los cuales permiten cuantificar las células viables (vivas) y totales (vivas y muertas); Sin embargo, ciertas técnicas no permiten discernir cuando las células dejan de ser viables, por lo que se sugiere realizar una curva de calibración que relacione un método directo e indirecto.

<sup>93</sup> TORTORA Gerard J., FUNKE Berdell R., CASE Christine L. Introducción a la microbiología. 2007. 9ª. edición. Pearson Educations. United states., 931p.

· **Cuadro 3.** Técnicas para determinar el crecimiento microbiano.

<b>Determinación del Número de células</b>	<b>Vivas y Muertas</b>	<b>Recuento en cámara</b>
		<b>Recuento indirecto en portaobjetos</b>
		<b>Contador automático de partículas</b>
		<b>Nefelometría</b>
<b>Vivas</b>	<b>Recuento en medio sólido</b>	
	<b>Filtración sobre membrana</b>	
<b>Determinación de la masa celular</b>	<b>Directos</b>	<b>Determinación de peso seco</b>
		<b>Estimación de proteínas</b>
	<b>Indirectos</b>	<b>Turbidimetría</b>
		<b>Acumulación de metabolito</b>
		<b>Consumo de un nutriente</b>

**Fuente:** APELLA, María; ARAUJO, Paula. Microbiología de agua. Conceptos básicos. *Centro de Referencia para Lactobacilos y Universidad Nacional de Tucumán*. 2012., p. 12.

Las técnicas turbidimétricas son comúnmente usadas debido a su practicidad, precisión y la obtención de datos de manera vertiginosa con un elevado grado de exactitud<sup>94</sup>. Sin embargo, la relación entre la turbidez y el recuento celular en términos de células viables tiende a perder precisión a lo largo del desarrollo del muestreo o la experimentación, puesto que la muerte de la población no se traduce en la pérdida de la turbidez del cultivo. Por lo que se sugiere realizar una curva de calibración que relacione un método directo e indirecto. Por otra parte, la técnica que involucra medir peso húmedo resulta ser una medida inexacta que tiende a tener un porcentaje de error bastante alto, mientras que la determinación de peso seco tiende a tener un mayor grado de exactitud, pero la implementación de esta técnica tiende a ser laboriosa y compleja con respecto a la anterior, y además propende a perder precisión cuando se trata de muestras con concentraciones y volúmenes pequeños. Los métodos directos por microscopía presentan irregularidades en el recuento, ya que no es posible distinguir de manera precisa las células viables y no viables.

La selección del método está en función de la sensibilidad y precisión requerida, propiedades del medio de cultivo y los microorganismos empleados, confiabilidad del método, velocidad en la obtención y procesamiento de datos.

<sup>94</sup> Marroquin, Jorge. Op.Cit., p. 34.

## 2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR

Este capítulo abarca el diseño conceptual del biorreactor y su construcción donde diversos parámetros resultaron ser puntos claves para el desarrollo del mismo, conforme al diseño y geometría se realizaron diversos prototipos donde factores como la manipulación del material (resistencia ante impactos), tiempo de desarrollo o consecución, transparencia y estabilidad dimensional del material ante procesos de esterilización por autoclave definieron la elección mismo. Además, se realizaron diversas pruebas para comprobar la viabilidad, funcionalidad y eficacia del prototipo construido. Por otra parte, se fabricó una cámara de incubación; la cual permitió mantener las condiciones ambientales a lo largo de la operación y un sistema de medida óptico, que monitoreo en tiempo real el crecimiento celular de los microorganismos cultivados.

Finalmente, se realizó un análisis de costos donde se pudo evidenciar los materiales implicados en el proceso y asimismo contrastar el prototipo con modelos comerciales

### 2.1 DISEÑO CONCEPTUAL DEL BIORREACTOR

El diseño se estableció bajo los siguientes parámetros: Biorreactor (volumen, material, modo de operación, sistema de agitación, geometría), cámara de incubación y sensor óptico.

**Figura 6.** Biorreactor comercial para la fermentación microbiana, escala laboratorio.



**Fuente:** CLEAVER SCIENTIFIC. Biorreactor de laboratorio para la fermentación microbiana. [Sitio WEB]. Londres, UK. [Consultado 15 de enero 2020]. Disponible en: <https://www.medicaexpo.es/prod/cleaver-scientific/product-105242-754703.html>.

Inicialmente, se definieron ciertas características deseables en función de las condiciones de operación, crecimiento y cultivo de los microorganismos:

**Cuadro 4.** Criterios de selección.

<p><b>Principales criterios de selección</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Bajo volumen de operación.</li> <li>➤ Integración de un sensor óptico que permita modelar cinéticas de crecimiento.</li> <li>➤ Permite incorporar otros instrumentos de medida.</li> <li>➤ Material transparente o semitransparente.</li> <li>➤ Funcionamiento bajo condiciones asépticas.</li> <li>➤ Resistencia térmica (procesos de esterilización por autoclave).</li> <li>➤ Montaje y operación sencilla.</li> </ul>
<p><b>Parámetros de crecimiento</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Suministro de nutrientes.</li> <li>➤ Intercambio de gases.</li> <li>➤ Suministro de luz.</li> <li>➤ Oxígeno disuelto.</li> <li>➤ Agitación y mezcla.</li> <li>➤ Temperatura.</li> <li>➤ pH.</li> </ul>

**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 46.

**2.1.1 Materiales para la construcción de biorreactores.** Gran variedad de materiales ofrece características que pueden resultar útiles a la hora de construir un BR, estas garantizan el correcto funcionamiento del equipo y el sostenimiento de las condiciones de operación. Los materiales comúnmente empleados son: polietileno (PET), acero inoxidable, policloruro de vinilo (PVC), polipropileno (PP), resina epóxica (RE), resina poliéster (RP), vidrio de borosilicato, entre otros.

De acuerdo a la literatura y referentes bibliográficos se identificaron 4 posibles materiales para la construcción del biorreactor, donde se evidenciaron propiedades y características propias de cada material.

**Cuadro 5.** Materiales pre-seleccionados para la construcción del biorreactor.

<b>Material</b>	<b>Descripción</b>
<b>Resina epóxica</b>	<p>Es un tipo de polímero que posee en su estructura dos o más grupos conocidos como epoxi u oxirano. Estos se pueden ubicar en forma de anillo, en los extremos o en el medio de la cadena como grupo funcional<sup>95</sup>.</p> <p>Las resinas epoxi cuentan con gran variedad de ventajas; sus propiedades mecánicas y térmicas son superiores a otro tipo de resinas, el proceso de curado comprende un rango entre 0°C y 180 °C (entre mayor sea la temperatura de curado, la resina tendrá una resistencia al calor superior), no produce subproductos durante la reticulación del polímero, posee una excepcional resistencia química en presencia de un medio alcalino, su estabilidad dimensional resulta ideal ante condiciones que impliquen altas temperaturas y humedad, etc.<sup>96</sup>.</p>
<b>Resina poliéster</b>	<p>Es un polímero termoestable, el cual se suministra en estado líquido que al reaccionar con un catalizador produce una reacción exotérmica endureciéndose de forma permanente; siendo intratable debido a sus propiedades mecánicas, lo que indica que al producirse un cambio químico impide que esta vuelva a su estado inicial. Es bastante frágil por lo que puede romperse o fisurarse con el mínimo impacto.</p> <p>Dicho monómero está directamente relacionado con el proceso de curado, ya que este cumple con la función de permitir que se lleve a cabo el cambio de estado de líquido a sólido de la resina, esta reacción es conocida como reticulación del polímero, donde las cadenas moleculares del poliéster se unen formando una red tridimensional; obteniendo un polímero insoluble que no se funde. El proceso de gelificación resulta ser bastante lento por lo que es necesario la adición de un</p>

<sup>95</sup> PALUVAI, Nagarjuna; MOHANTY, Smita y NAYAK, Sanjeev. Synthesis and Modifications of Epoxy Resins and Their Composites: A Review. Polymer-Plastics Technology and Engineering. 2014. 1723-1758. 10.1080/03602559.2014.919658.

<sup>96</sup> WANG, Ru-Min; ZHENG, Shui-Rong; ZHENG, Ya-Ping. Polymer Matrix Composites and Technology, Woodhead Publishing Series en Composites Science and Engineering. 2011, p. 1-548.



**Cuadro 5.** (Continuación).

<b>Material</b>	<b>Descripción</b>
	catalizador <sup>97</sup> . Tras el proceso de curado, se tiene un polímero 100% sólido, y con cierta tendencia a ser transparente. Además, cuenta con una alta resistencia a ambientes químicos agresivos y una excelente estabilidad dimensional <sup>98</sup> .
<b>Polipropileno (PP)</b>	Es un polímero termoplástico, se caracteriza por su dureza, resistencia y sobre todo por su capacidad de soportar altas temperaturas (150°C) sin sufrir cambios en sus propiedades físicas y químicas. Es un material que cuenta con baja toxicidad, alta resistencia a impacto, fallas por fatiga o flexión, corrosión, inerte, resistencia química a condiciones de humedad y calor sin alterar la estabilidad dimensional, baja absorción de agua, bajo costo y reutilizable <sup>99</sup> .
<b>Vidrio</b>	Se compone principalmente de sílice en un 70%, 10% de óxido de boro, 8% de óxido de sodio, 1% de óxido de potasio y 1% de óxido de calcio <sup>100</sup> .  Es un material inorgánico de alta dureza, frágil, transparente, amorfo. Cuenta con una alta resistencia química, mecánica y térmica (resistencia al choque térmico), bajo coeficiente de expansión térmica, inerte, alta de temperatura de fusión (1300-1500°C) <sup>101</sup> .

**Fuente:** elaboración propia.

**2.1.2 Criterios de selección.** Para determinar el material más apropiado para el biorreactor fue necesario evaluarlo bajo los siguientes parámetros:

**2.1.2.1 Resistencia a procesos de esterilización por autoclave.** Mantener condiciones asépticas en el BR conlleva someterlo a una temperatura de 120 °C y una presión de 15 psi durante mínimo 20 minutos, por lo cual el material seleccionado debe contar con características termoestables.

<sup>97</sup> PARK, soo-Jin; SEO Min-Kang. Interface science and composites. Academic Press. 1ª. Ed. Vol. 18, 2011, 854p.

<sup>98</sup> BENDEZÚ, Jose H., Introducción a las resinas de poliéster y afines. Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central UNMSM. 2012., p. 2-6.

<sup>99</sup> Propiedades del polipropileno, (consultado 10 de junio 2019). Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/propiedades-del-polipropileno-2671066.htm>

<sup>100</sup> FERNÁNDEZ, María M., 'CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS DE VIDRIOS Y RECUBRIMIENTOS EXPUESTOS AL AMBIENTE ESPACIAL: EFECTOS DE LA RADIACIÓN GAMMA'.2015., p. 30.

<sup>101</sup> ALFONSO, Carlos., 'Análisis De Diferentes Clases De Vidrio, Para La Elaboración De Una Ayuda Gráfica Como Soporte Tecnico, Que Considere Sus Características Térmicas, Físicas Y Ópticas', 2018, p. 68.

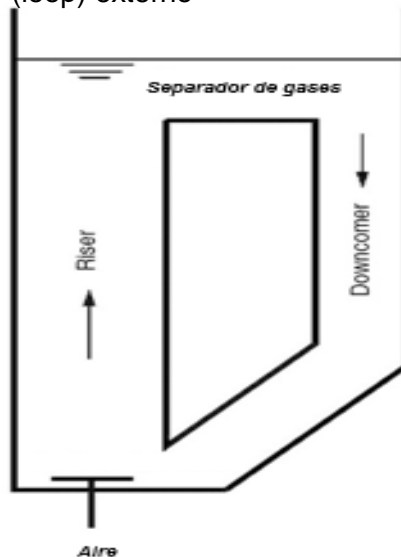
**2.1.2.2 Transparencia.** El proceso de fotosíntesis de las microalgas demanda el suministro de una fuente lumínica, lo que indica que entre más opaco sea el material la cantidad de luz que reciba o atraviere el biorreactor se verá disminuida y por ende se verá afectado tal proceso. Además, esta característica permite monitorear el comportamiento del cultivo de forma visual facilitando su estudio.

**2.1.2.3 Costo.** La propuesta plantea el desarrollo de un biorreactor de bajo costo, por tanto, la elección del material está en función de lograr un diseño competente, viable, estético, que logre simular y equipar características propias de un biorreactor comercial con tecnología de punta.

**2.1.2.4 Químicamente inerte.** Los materiales químicamente inertes no generan reacciones que puedan afectar la integridad del cultivo.

**2.1.2.5 Geometría.** Según la literatura, la configuración más afín a las variables de diseño y de cultivo de los microorganismos obedece a un reactor tipo air-lift de bucle externo, su diseño al no abarcar motores eléctricos simplifica su construcción, facilita el mantenimiento, disminuye el consumo energético, favorece la transferencia de gases, logra patrones de flujo definidos, minimiza el riesgo de contaminación al ser un sistema cerrado, se obtienen bajos niveles de esfuerzos cortantes que promueven el crecimiento microbiano sin causar efectos negativos sobre el cultivo. Además, tal configuración permite integrar el sistema de medida óptico al bucle externo del reactor.

**Figura 7.** Biorreactor tipo air-lift de bucle externo o de ciclo (loop) externo



**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 25.

**2.1.2.6 Volumen.** Un bajo volumen de operación implica un menor requerimiento de nutrientes y optimiza el comportamiento hidráulico en el biorreactor, logrando una mezcla completa o ideal en el sistema. El volumen está relacionado con las dimensiones del equipo, en este caso el modelo seleccionado cuenta con una capacidad máxima de 300 ml, este volumen está directamente relacionado con lograr una condición ideal, es decir que se comporte bajo la modalidad de un reactor CSTR.

**2.1.2.7 Modo de operación.** El control del proceso se realizó por lotes, esta metodología permite una operación sencilla, facilita el mantenimiento, minimiza posibles alteraciones del proceso, reduce costos energéticos, la demanda de materias primas y la probabilidad de contaminación del cultivo puesto que la participación humana es prácticamente nula, ya que este es únicamente alimentado al inicio de la operación y permanece cerrado durante todo el proceso.

**2.1.2.8 Sistema de agitación.** Se desea que a partir de este sistema se garantice una distribución homogénea de los nutrientes, calor, suministro de gases a nivel celular, exposición a una fuente lumínica, transferencia de gases, etc. Donde la composición y temperatura del medio tienda a ser uniforme en todos los puntos del reactor. Se contemplaron dos sistemas de agitación, los cuales son descritos en los siguientes apartados.

➤ **Agitador neumático.** Este sistema de agitación consiste en una bomba sumergible tipo pecera; esta cuenta con las siguientes especificaciones: un voltaje aplicable de 5.5 - 12V, un caudal: 200 L/h, peso de 0.1 kg y sus dimensiones corresponden a 39x38x28mm. El cable de alimentación de la bomba fue adaptado por medio de un conector Molex separando la clavija del dispositivo de forma que pudiera atravesar la cubierta del biorreactor sin ser afectado el funcionamiento del mismo. Con el propósito de mantener hermético el recipiente se incorporó un empaque en caucho-silicona al cable de alimentación, evitando la exposición del cultivo con el medio ambiente.

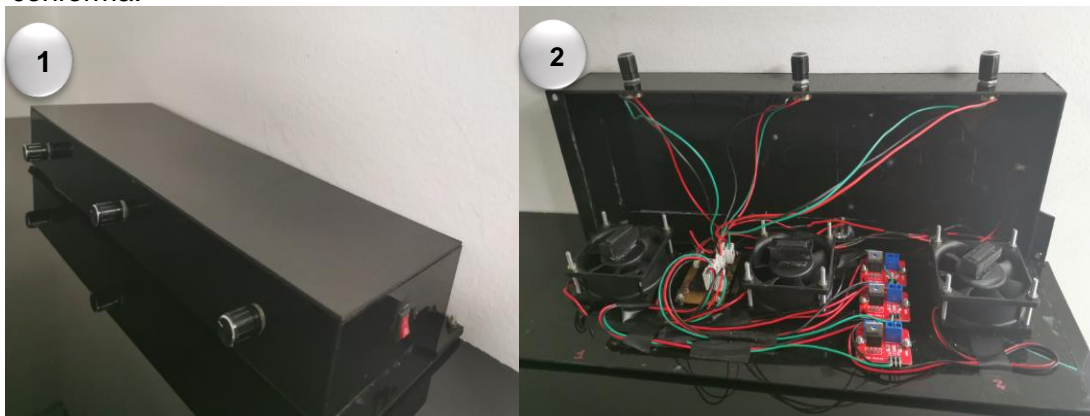
**Figura 8.** Sistema de agitación neumático - Bomba sumergible tipo pecera.



**Fuente:** Elaboración propia.

➤ **Agitador magnético.** Es un instrumento electrónico que tiene como principio la utilización de un campo magnético, capaz de mezclar de forma automatizada y simultánea diferentes medios, sustancias, soluciones, etc. Este montaje contempla un diseño moderno de bajo costo recubierto en acrílico negro. Cuenta con 3 puestos constituidos por 3 ventiladores de 5x5 cm - Voltaje de 0.15 V, 3 barras magnéticas de 6x20 mm en teflón, 3 moldes en PLA (fijados a cada ventilador) que albergan en su interior 3 bloques imantados cerámicos de 9.5x22x47mm, 3 potenciómetros de 10k, un interruptor on-off, un led rojo de 3mm que funciona como indicador de encendido o puesta en marcha, un terminal Jack 2.5 mm que permite la conexión de un adaptador de 12V. Cada ventilador cuenta con un módulo Mosfet IRF520, el cual se encarga de adecuar el voltaje. Adicionalmente, se encuentra otro circuito, el cual lee la referencia de los potenciómetros y envía a cada módulo una señal de referencia para ajustar el voltaje; regulando así la velocidad de agitación mediante un control electrónico. Por último, este dispositivo presenta un bajo consumo de energía permitiendo una jornada de trabajo continua ideal para uso en el laboratorio.

**Figura 9.** Sistema de agitación magnético. Donde (1) hace referencia a la parte externa del agitador y en la figura (2) se evidencia el montaje electrónico que lo conforma.



Fuente: elaboración propia.

## 2.2 CÁMARA DE INCUBACIÓN

Favorecer las condiciones de crecimiento de los microorganismos implica el suministro de una fuente lumínica y la regulación de la temperatura; por consiguiente, resulta adecuado llevar a cabo la construcción de una cámara de incubación, la cual aloja en su interior 3 prototipos funcionales y además permite incorporar otros instrumentos de medida (sensor de medida óptico, sonda multiparámetro, luxómetro, etc.). Básicamente este sistema tiene como principal objetivo mantener las condiciones ambientales que promueven el crecimiento y la obtención de una mayor cantidad de biomasa, ya que los prototipos construidos no cuentan con la tecnología para hacerlo por sí mismos.

Esencialmente, la cámara de incubación consiste en adaptar una caja en poliestireno expandido (EPS) (22x23x15cm) a las condiciones de operación del cultivo. Este material cuenta con una conductividad térmica reducida y al

componerse casi en su totalidad por aire en reposo, resulta ideal para mantener la temperatura en su interior. Tal cámara, cuenta con un termostato Digital W1209, el cual se encarga de medir la temperatura mediante una sonda y regular la temperatura dentro de la incubadora mediante un control on-off, es decir, que si la temperatura se encuentra por encima del setpoint el cordón de resistencia (el cual transmite energía al sistema en forma de calor) se apagará hasta llegar a la temperatura deseada y viceversa. Este circuito permite adecuar o modificar la variable de proceso al valor deseado, en este caso 26°C (temperatura óptima de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* sp). La presencia de microalgas demanda una fuente lumínica; por consiguiente, fue necesario implementar un sistema de luces LED (blancas), estas se fijaron de forma paralela en las paredes de la cámara y mediante un luxómetro fue posible establecer una intensidad lumínica aproximadamente de 2000 Luxes. Sin embargo, el uso de dichas luces incrementó considerablemente la temperatura del sistema; en consecuencia, fue necesario implementar 2 ventiladores de 5x5 cm - Amperaje de 0.15 V en las paredes laterales de la cámara, logrando así normalizar u homogeneizar la temperatura de operación.

**Figura 10.** Cámara de incubación (vista exterior e interior).



**Fuente:** elaboración propia.

Como se puede evidenciar la cámara cuenta con todo el equipamiento asociado al sensor de medida óptico, además cuenta con 4 interruptores que permiten de manera simplificada apagar o encender el sistema de Luces LED, ventiladores, termostato y el sistema en general.

### 2.3 SISTEMA ÓPTICO DE MEDIDA

Puesto que se desea modelar cinéticas de crecimiento mediante el monitoreo continuo de la operación de los biorreactores; se desarrolló un sistema óptico, el cual se encarga de medir la cantidad de luz que atraviesa una parte del reactor, en este caso la medición se efectuó por medio de un diodo LED de luz roja y una fotorresistencia (LDR), ambos componentes cuentan con un diámetro de 5mm.

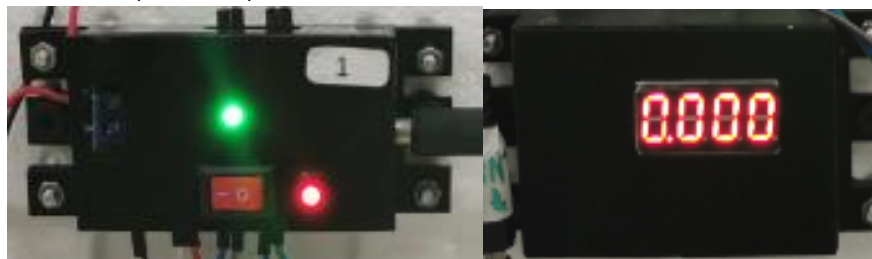
**Figura 11.** Componentes electrónicos ( LDR y LED).



**Fuente:** elaboración propia.

Este sistema está compuesto por dos circuitos, uno permite la visualización de los datos a partir de un display de 7 segmentos y 4 dígitos, mientras el otro permite el registro y captura de los datos midiendo el cambio de resistencia en la fotorresistencia siendo proporcional a la cantidad de luz que recibe, este asigna valores entre 0 y 999 (el cero es un indicador ante la ausencia de luz y 999 indica la saturación de la fotorresistencia). Es decir, que cada biorreactor cuenta con un par de circuitos, el que recibe y realiza las medidas, y el que permite visualizarlas a través del display. Adicionalmente hay un circuito al cual van conectados los circuitos medidores, este cumple con la función de compilar todos los datos y guardarlos. El protocolo de diseño de los circuitos empleados se encuentra en el siguiente apartado, y en el **ANEXO A** y **ANEXO B** es posible contemplar los esquemas de los circuitos mencionados.

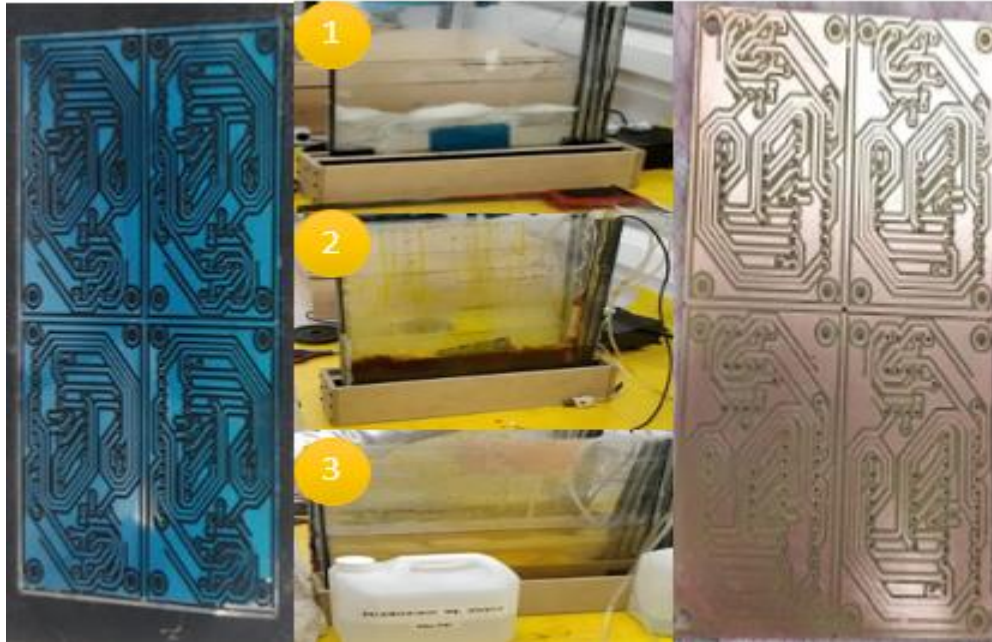
**Figura 12.** Circuito medidor (izquierda) - Circuito para visualización de datos (derecha).



**Fuente:** elaboración propia.

**2.3.1 Protocolo general de diseño de circuitos electrónicos.** El diseño de un circuito impreso o baquela requiere una placa fenólica, esta puede ser fabricada en fibra de vidrio o baquelita (polímero termoestable) y recubierta con láminas de cobre permitiendo así el paso de corriente. La placa empleada es fabricada a partir de fibra de vidrio (referencia FR4), está es previamente limada con el fin de retirar todo tipo de impureza, ya sea partículas de grasa o cualquier agente que pueda afectar la adhesión de la pintura a la placa. Posteriormente, empleando un compresor de aire se aplica pintura fotosensible y se deja secar, seguidamente una máquina con tecnología CNC (Control numérico computarizado) es programada para perforar los agujeros de algunos componentes del circuito y además secciona la parte de la placa donde se encontrará el circuito electrónico. A continuación, se fija un negativo del circuito (impresión en acetato del diseño) a la placa ya cortada y se expone a luz ultravioleta durante 15 minutos, con el fin de que la forma del circuito quede impresa sobre esta. Luego, la baquela es sometida a un proceso para retirar la pintura y el cobre que no hace parte del circuito mediante un sistema de cuatro cubetas con diferentes sustancias químicas, las cuales cuentan con un sistema de burbujeo que promueven la agitación y la oxigenación acelerando el proceso, puesto que entre menos tiempo la placa esté inmersa en dichas soluciones la calidad del circuito se verá incrementada. La primera cubeta está compuesta por carbonato de sodio donde es sumergida en un lapso de 30 minutos; esta sustancia actúa como agente relevador removiendo la pintura que no quedó directamente expuesta a la luz; la pintura restante se encuentra fija a los caminos del circuito, enseguida la baquela es introducida en una solución de cloruro férrico por 30 minutos con el objeto de disolver el cobre que no quedó cubierto por la pintura. Finalmente, se deposita en una solución de hidróxido de sodio en un periodo de 1 o 2 horas para de retirar la pintura restante del circuito; dejando a su paso los caminitos de cobre que lo conforman. La siguiente figura contempla el procedimiento de manera simplificada.

**Figura 13.** Procedimiento general para elaboración de circuitos electrónicos. Donde (1) hace referencia a la cubeta que contiene carbonato de sodio, la cubeta (2) contiene una solución de cloruro férrico y la última cubeta (3) deposita en su interior hidróxido de sodio.



**Fuente:** elaboración propia.

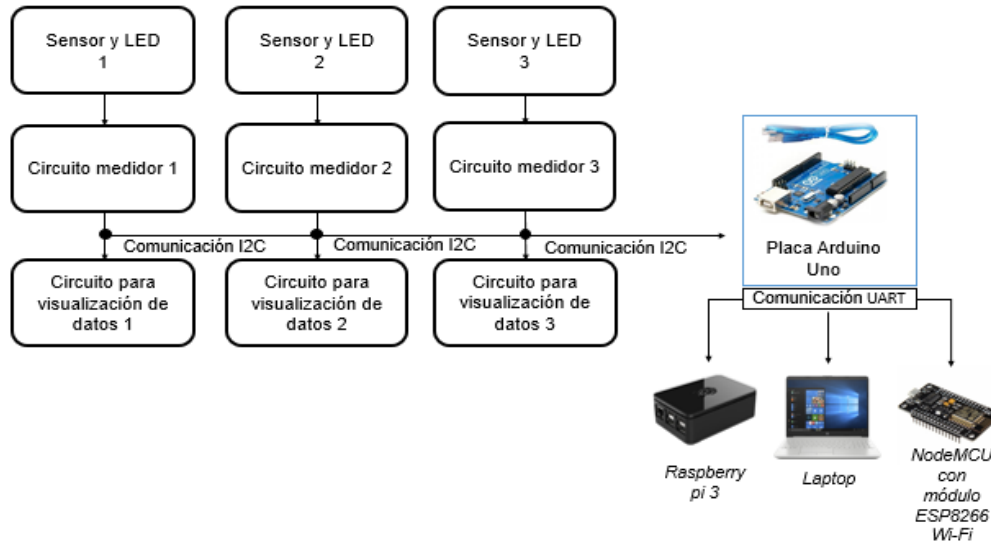
Concluido el diseño del circuito se realiza el montaje superficial de los microcomponentes por medio de una soldadura en pasta, seguidamente se introduce la baqueta en un horno durante 10 minutos con el objeto de fundir la soldadura superficial y fijar los microcomponentes. Por último, se sueldan los componentes superficiales haciendo uso de un cautín y estaño. Cabe aclarar que los diseños fueron provistos por el ingeniero electrónico Joaquín Andrés Valderrama, son diseños propios, no comerciales los cuales hacen parte de los procesos de investigación del grupo GRESIA.

**2.3.2 Recolección y almacenamiento de datos.** Este sistema se basa en un protocolo de comunicación I2C (circuito interintegrado), el cual se compone por un maestro y tres esclavos. El maestro de la comunicación es una tarjeta electrónica basada en una plataforma de software y hardware libre que permite la programación de circuitos electrónicos y recibe como nombre Arduino UNO Rev3; se basa en un microcontrolador ATmega328P (el cual es capaz de realizar tareas secuenciales). En contraste, los esclavos son los circuitos medidores. Cada sensor lee el valor de la fotorresistencia el cual puede variar entre 0-5V, esta toma el valor del voltaje obtenido y le asigna un nuevo valor entre 0 y 999. El circuito mide y promedia 25 valores por segundo, cada 10 segundos el maestro ordena el valor de la última lectura realizada por los circuitos y envía el valor de las lecturas a los circuitos de visualización, además cada 5 minutos nuevamente el Arduino ordena los valores de las lecturas a los esclavos para enviarlos al sistema de recolección de datos que bien puede ser un computador, una Raspberry pi 3 o un NodeMCU con módulo ESP8266 (permite conexión a Wi-Fi). Cabe resaltar que el maestro antes ordenar los datos en ese lapso (5



minutos) envía un comando que apaga la luces LED durante 15 segundos, es decir que la lectura y envío de los datos se realiza durante la ausencia de luz total, puesto que la luz interfiere en la lectura de la fotorresistencia. Finalmente, las luces son encendidas para continuar con el funcionamiento normal del proceso.

**Figura 14.** Tráfico de datos.

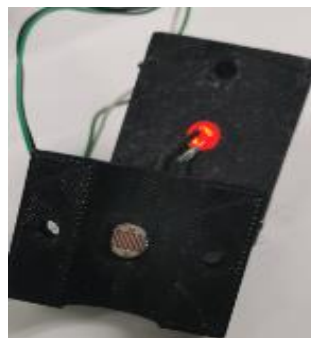


**Fuente:** elaboración propia.

Cabe señalar que los equipos empleados para la recolección de datos variaron conforme a la operación de los reactores; puesto que, tendían a tener fallas y los datos no eran almacenados o compilados. No obstante, los equipos más frecuentemente utilizados fueron la Raspberry pi 3 y un ordenador (laptop).

**2.3.3 Armazón del sensor óptico.** El armazón es un diseño en 3D, comprende dos piezas impresas en PLA en forma de abrazadera; cada una cuenta con un compartimento dispuesto a albergar la FDR y el LED, asimismo cuenta con un orificio en los extremos de cada pieza, los cuales permiten ensamblar (tornillos milimétricos con una longitud de 5 cm) y desmontar las piezas en caso ser necesario. Cabe aclarar que todas las piezas en PLA mencionadas en este documento fueron producto del diseño del PhD. Juan Daniel Valderrama.

**Figura 14.** Armazón de 16mm.



**Fuente:** elaboración propia.

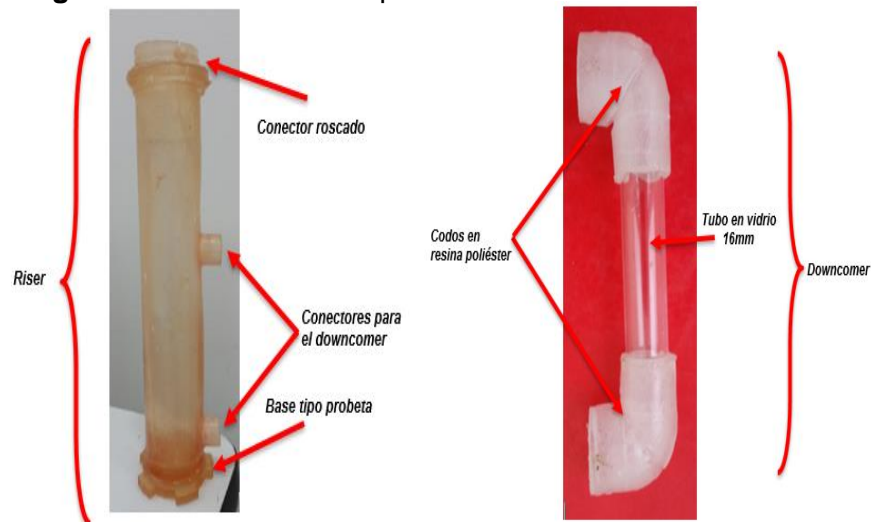
El sensor óptico es ubicado en el bucle externo del reactor, el cual consiste en una pieza de vidrio de 16 mm de diámetro interno, la elección de este material se basó en sus características termoestables, dureza y transparencia. La ubicación estratégica del dispositivo permite evitar posibles variaciones en la toma de datos por la presencia de burbujas en el cuerpo de reactor.

## 2.4 DESARROLLO DEL PROTOTIPO

De acuerdo con la literatura, conocimientos técnicos y diferentes pruebas de funcionamiento se llevó a cabo el desarrollo y selección del prototipo más adecuado. A continuación, se describen las metodologías para cada diseño.

**2.4.1 Prototipo en resina poliéster.** Este modelo hizo parte de previos estudios por GRESIA, el cuerpo del reactor, cubierta, conectores, codos y base (tipo probeta) son totalmente fabricados en resina poliéster.

**Figura 15.** Milibiorreactor tipo air-lift.



**Fuente:** MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 49-50.

Se tuvo como pretensión replicar el modelo descrito. Sin embargo, las dimensiones que este contempla no permitían alojar el sistema de agitación descrito anteriormente en el apartado 2.1.2.8.1 y 2.1.2.8.2; en consecuencia, se realizaron nuevos moldes en caucho-silicona para el cuerpo del BR mediante tubos PVC e impresiones en 3D.

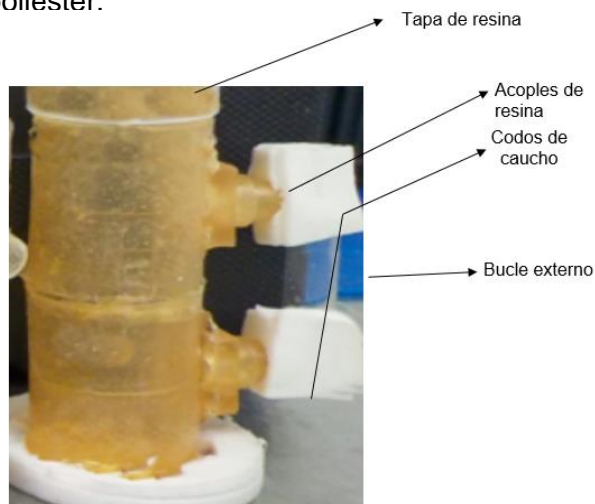
**Figura 16.** Moldes elaborados en caucho-silicona. Donde (1) se refiere a la pieza en PLA empleada para realizar los moldes en caucho-silicona del cuerpo del biorreactor, mientras (2) y (3) son el resultado final de los moldes.



**Fuente:** elaboracion propia.

El cuerpo del reactor involucra la unión de dos piezas idénticas en resina, las cuales previamente se han sometido a un proceso de curado; producto de la reacción con el catalizador. Al momento de acoplar el cuerpo con el bucle externo precisa la elaboración de dos piezas adicionales integradas directamente al riser durante el curado de la resina para lograr un mayor grado de adhesión. El bucle externo está conformado por 2 piezas en caucho-silicona y un tubo en vidrio de 16 mm de diámetro.

**Figura 17.** Adaptación del prototipo en resina poliéster.

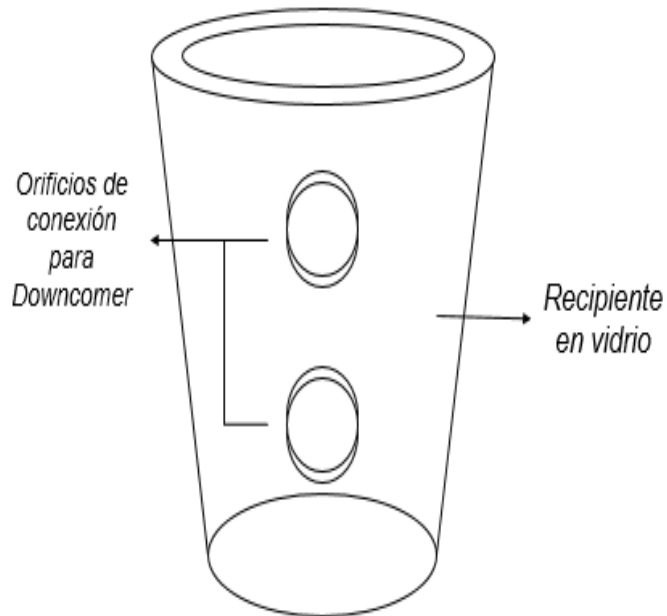


**Fuente:** elaboración Propia.

**2.4.2 Prototipo en vidrio.** Este BR consiste en un recipiente de vidrio comercial con una capacidad de 328 ml medidas de 7.5cm de diámetro superior x 7.5cm diámetro de base x 8.2cm de alto, el cual constituye el cuerpo del reactor o riser (Figura 19). Adicionalmente, se compone de un conector roscado y una cubierta en resina poliéster ubicada en la parte superior del biorreactor con el objeto de sellar y mantener la hermeticidad en este, dos acoples en caucho silicona, dos mangueras siliconadas que conectan el riser al bucle externo (Figura 20), este

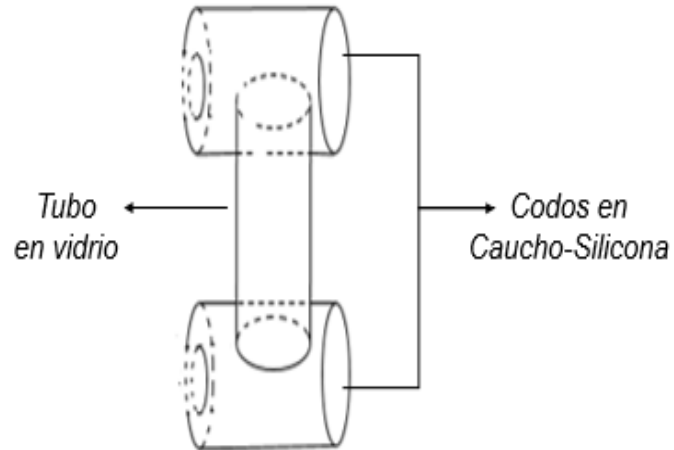
último de igual manera está compuesto por un tubo en vidrio de 16 mm de diámetro; al cual se adaptaron dos empaques de caucho-silicona para evitar fugas y asimismo mantener fijo el sistema.

**Figura 18.** Cuerpo del BR modificado en vidrio.







Fuente: elaboración propia

**Figura 19.** Bucle externo BR en vidrio.



Fuente: elaboración propia.

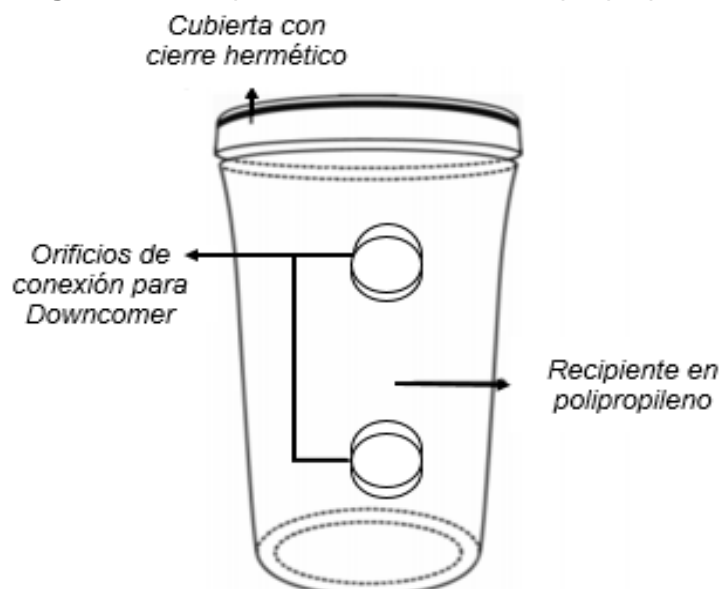
**Cuadro 6.** Piezas en caucho empleadas para BR en vidrio.

Componente del Biorreactor	Molde en PLA	Pieza en Caucho-silicona
Codos		
Empaques		

Fuente: elaboración propia.

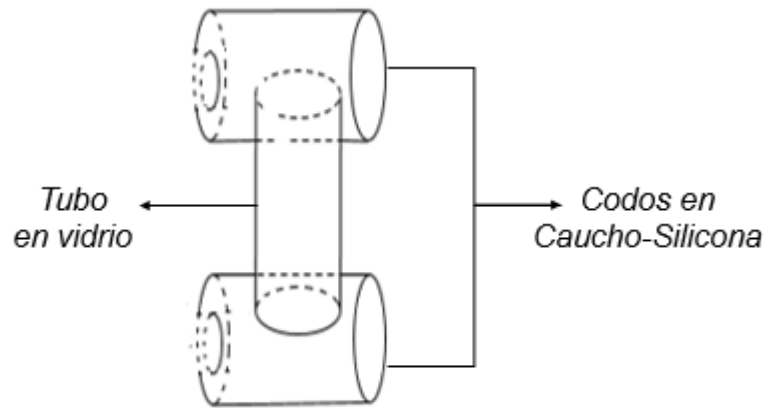
**2.4.3 Prototipo en polipropileno.** Se empleó un modelo comercial en polipropileno (7,3x8x9cm), este cuenta con una capacidad de 300 ml, el cual constituye el cuerpo del reactor o riser (Figura 21), además integra una cubierta que permite el cierre hermético, se compone por dos acoples en caucho silicona, dos tubos en acero inoxidable que conectan el riser al bucle externo (Figura 22), este último de igual manera está compuesto por un tubo en vidrio de 16 mm de diámetro; al cual se adaptaron dos empaques de caucho-silicona para evitar fugas y asimismo mantener fijo el sistema. Las características de este material facilitan el ensamble del Downcomer al BR sin comprometer la integridad del mismo.

**Figura 20.** Cuerpo del BR modificado en polipropileno



Fuente: elaboración propia con base en MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel., DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS, 2017, p. 29.

**Figura 21.** Bucle externo BR en PP.



**Fuente:** elaboración propia.

**Cuadro 4.** Piezas en caucho empleadas para BR en polipropileno.

Componente del Biorreactor	Molde en PLA	Pieza en Caucho-silicona
Codos		
Empaques		
Tapón		

**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 22.** Piezas empleadas para Downcomer (Tubo en vidrio), conexiones (Tubos en acero en inoxidable) y barra magnética en teflón.



**Fuente:** elaboración Propia.

**2.4.4. Montaje y ensamblaje de los prototipos diseñados.** En el siguiente cuadro es posible evidenciar de una manera más amplia y explícita el montaje de los prototipos desarrollados.

**Cuadro 7.** Descripción del montaje experimental de los prototipos desarrollados.

<b>Prototipo</b>	<b>Descripción – Montaje y ensamblaje</b>
<p style="text-align: center;"><b>Resina poliéster pre-acelerada</b></p>	<p>Básicamente, este prototipo se compone casi en su totalidad por resina (riser, cubierta, conector roscado, base tipo probeta, conectores para downcomer) por lo que el proceso de moldeo de las piezas tanto en resina como en caucho-silicona resulta complejo y laborioso; puesto que, inicialmente la mayoría de moldes en silicona eran elaborados a base de cilindros en PVC o polímeros que se asimilaran a la geometría deseada. Se pudo evidenciar que los moldes fabricados; esencialmente los que eran de mayor tamaño, la mezcla de caucho-silicona no se distribuía de manera uniforme producto del diseño de la tubería o de filtraciones de la silicona en la parte inferior del molde; como resultado, la pieza final presentaba porosidad y desmoldarla podía comprometer la integridad de la misma, ya que el coeficiente de rozamiento entre los materiales es bastante alto; en consecuencia, fue necesario seccionar el molde. Por tal razón, se realizó una transición en los moldes utilizando un nuevo material (PLA) que simplificara dicho proceso. Sin embargo, el diseño del molde que hace referencia al cuerpo del biorreactor no abarca la totalidad del volumen, sino que solo comprende cierta parte (aproximadamente 150 ml); lo cual implica ensamblar dos piezas idénticas (una de las piezas se debe encontrar durante el proceso de curado o reticulación del polímero y la otra en un estado compacto para lograr un buen acople entre ellas). De igual manera para realizar el montaje de las demás piezas en resina se aplicaba el mismo procedimiento para poder fijarlas al cuerpo de BR.</p> <p>Por otra parte, el bucle externo o downcomer fue desarrollado a partir de moldear piezas en caucho-silicona, las cuales conforman los codos del biorreactor; estos a su vez están diseñados de tal forma que puedan incorporar un tubo en vidrio de 16 mm de diámetro. En el siguiente apartado se especifica de manera clara la técnica empleada para moldear los polímeros mencionados.</p>

**Cuadro 7. (Continuación)**

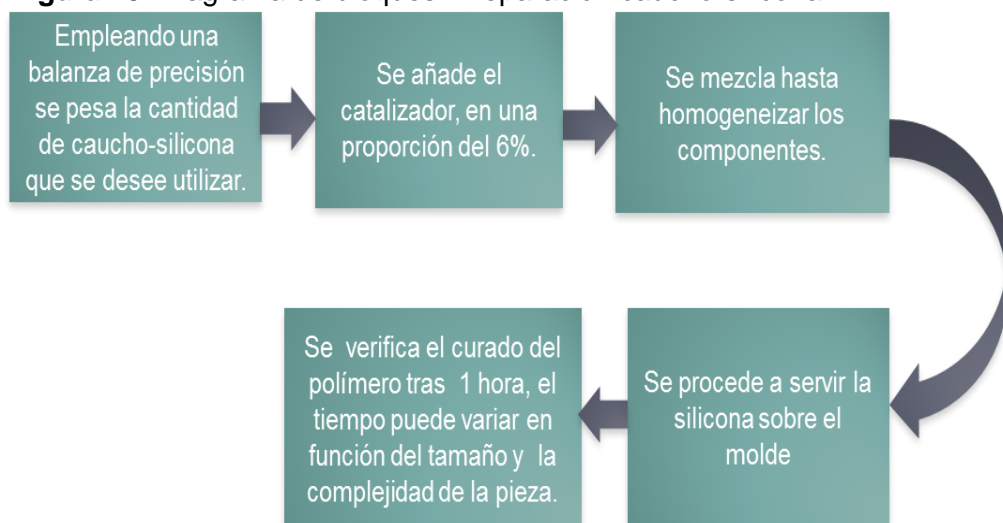
<b>Prototipo</b>	<b>Descripción – Montaje y ensamblaje</b>
<b>Vidrio</b>	<p>Este modelo incorpora un recipiente en vidrio el cual es destinado a conformar el cuerpo del BR, adaptarlo a la geometría requiere realizar dos orificios en la superficie de tal manera que permitan acoplar el bucle externo al riser. Este proceso implica emplear un taladro con una broca especial para vidrio, se debe tomar precaución puesto que la diferencia de temperatura entre la superficie del vidrio y la broca puede provocar la ruptura del mismo; por lo que se procuró taladrar cada cierto tiempo y realizar pausas para atomizar la superficie con agua tanto del recipiente como de la broca; aproximadamente 20 ciclos durante la apertura de cada orificio, con el fin de evitar un choque térmico. El riser incorpora dos mangueras siliconadas que permiten el flujo entre el downcomer y el cuerpo del BR, estos conductos de conexión o conectores demandan adaptar empaques en uno de sus extremos con el propósito de evitar fugas y mantener la hermeticidad en el sistema. Del mismo modo el downcomer está conformado bajo la misma metodología que el prototipo anteriormente descrito.</p> <p>En contraste, en la parte superior se implementó un sistema de sello (comprende la cubierta y un conector roscado) fabricado en resina poliéster, donde inicialmente se dispusieron dos moldes impresos en PLA, en los cuales se moldeó en caucho-silicona y finalmente se sirvió la resina sobre el molde en silicona para obtener las piezas.</p>
<b>Polipropileno</b>	<p>Este diseño contempla un recipiente en polipropileno como cuerpo del BR. De igual manera resulta necesario realizar dos orificios en la superficie del recipiente con el objeto de ensamblar el downcomer y permitir el flujo entre las zonas interconectadas a partir de conductos manufacturados a base de acero inoxidable; a los cuales se adaptaron empaques en caucho-silicona a fin de mantener fijo y hermético el sistema.</p> <p>Este prototipo maneja la misma metodología que los biorreactores anteriormente descritos para el desarrollo del sistema externo (piezas como codos y un tubo en vidrio de 16 mm de diámetro), lo que difiere de este prototipo a los que lo anteceden es el sistema de sello, puesto que ya viene incorporado al recipiente; por tanto, no es necesario realizar ningún molde u empaque para su construcción.</p>

**Fuente:** elaboración propia.



**2.4.4.1 Metodología para el desarrollo de piezas en caucho-silicona y en resina poliéster.** La elaboración de las piezas tanto en resina como en caucho-silicona de los diferentes prototipos requirieron moldes impresos en 3D a base de ácido poliláctico (PLA). Si se desea realizar piezas en caucho-silicona es necesario emplear una balanza de precisión para pesar el caucho de acuerdo a la cantidad que se desee utilizar e inmediatamente se añade el catalizador que será proporcional al 6% de la cantidad total de caucho-silicona empleado; posteriormente, se mezcla hasta homogeneizar por completo y se sirve sobre el molde en PLA. Finalmente, se deja secar a temperatura ambiente y se procede a desmoldar la pieza, este material permite que se mantengan sujetas y totalmente herméticas las uniones. Cabe señalar que las piezas en caucho tienen una resistencia térmica que puede alcanzar los 200°C<sup>102</sup>.

**Figura 23.** Diagrama de bloques. Preparación caucho-silicona.



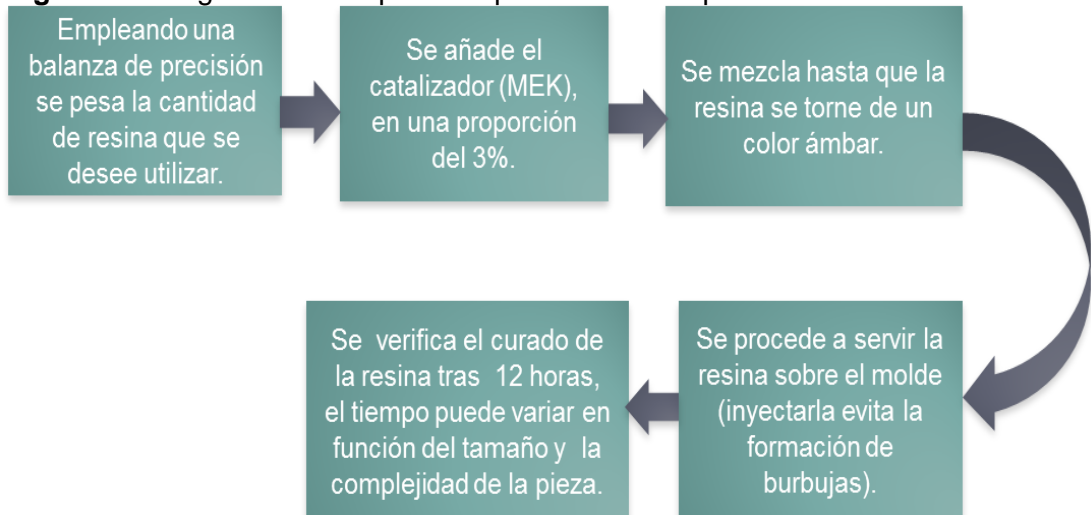
**Fuente:** elaboración propia.

Para realizar piezas en resina poliéster se moldea inicialmente en caucho y posteriormente se sirve la resina para obtener la pieza; esto reside en que la resina al solidificarse por completo tiende a adherirse al recipiente que la contiene impidiendo desmoldarla y por consiguiente conlleva a la fractura de la pieza. Este proceso de igual manera requiere emplear una balanza de precisión donde se pesa el polímero y se añade el catalizador al 3% de acuerdo a la cantidad empleada, inmediatamente se mezcla hasta que la resina se torne de un color ámbar (indicador de la mezcla homogénea entre la resina y el catalizador), consecutivamente se inyecta sobre el molde con el fin de evitar burbujas en su interior. El proceso de curado da lugar a una reacción exotérmica (libera calor); la cual permite que la mezcla llegue a una temperatura crítica donde la resina se solidificara rápidamente, al finalizar esta fase se procede a desmoldar la pieza cuidadosamente.

<sup>102</sup> MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. Op. Cit., p. 29.

El tiempo de endurecimiento o polimerización del caucho-silicona y la resina están en función del tamaño y la complejidad de cada pieza. Este procedimiento se realizó para todas las piezas involucradas en este documento.

**Figura 24.** Diagrama de bloques. Preparación resina poliéster.



**Fuente:** elaboración propia.

## 2.5 PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO

Con el fin identificar fallas o posibles defectos en el prototipo seleccionado, se realizaron varias pruebas de funcionamiento para así evitar resultados desfavorables durante la operación. A continuación, se describen cada una de estas.

**2.5.1 Prueba de resistencia térmica.** Esta prueba consiste en someter los diferentes equipos previamente aforados con agua destilada a su máximo volumen a condiciones de humedad, presión y temperatura elevada; el tiempo de operación comprende aproximadamente 1 hora, una temperatura de 120°C y una presión de 15 psi. Tales condiciones permiten descartar posibles filtraciones u alteraciones producto de la contracción o dilatación de los materiales.

**2.5.2 Prueba de agitación y mezclado.** La elección final del sistema de agitación está sujeta a los resultados obtenidos en las pruebas de esterilidad reportados en los apartados 2.6.2.3.1 y 2.6.2.3.1. De manera preliminar, con cada sistema se realizó una prueba de mezclado que radica en aforar con agua el biorreactor adicionando un colorante de contraste (Fucsina de Gram).

**2.5.3 Prueba de esterilidad.** Trabajar bajo condiciones asépticas implica el control de las variables que puedan llegar afectar el proceso, la axenicidad desempeña un rol importante en la conservación de las condiciones del cultivo. Con el objeto de constatar esta condición, se empleó el sensor de medida óptico y el sistema recolector de datos, el cual monitoreo durante cinco días el comportamiento del proceso en los diferentes sistemas de agitación

mencionados en los apartados 2.1.2.8.1 y 2.1.2.8.2, cabe aclarar que dicha prueba se realizó manteniendo una temperatura de 37°C, agitación e iluminación constante. Este estudio se efectuó por triplicado al modelo seleccionado, siendo los prototipos construidos previamente aforados y esterilizados con 300 ml de medio nutritivo.

Al finalizar la prueba se tomó una muestra de cada BR; estas fueron inoculadas o sembradas en un medio de cultivo sólido (nutritivo) y fueron incubadas en un periodo de 24 horas a 37°C.

**2.5.3.1 Sistema de agitación neumático.** Debido a que este dispositivo no es posible someterlo a un proceso de esterilización por autoclave. Es conveniente introducir por separado el dispositivo junto con la cubierta del biorreactor en una solución de alcohol al 70% (bactericida) durante mínimo una hora, la bomba se mantuvo en operación durante ese lapso para eliminar posibles trazas de elementos presentes en su interior. Con el fin de mantener condiciones asépticas en el biorreactor las bombas son introducidas dentro de los mismos en la cabina de flujo laminar (previamente sometida a un proceso de radiación ultravioleta).

**2.5.3.2 Sistema de agitación magnético.** Se emplea una barra magnética en teflón, la cual es introducida en el prototipo. Posteriormente, este es sometido a un proceso de esterilización por autoclave y tras dicho proceso se sitúa en el sistema de agitación contemplado en el apartado 2.1.2.8.2.

## 2.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

**2.6.1. Montaje y ensamblaje del biorreactor tipo air-lift de bucle externo.** Conforme al diseño y geometría se realizaron diversos prototipos donde factores como la manipulación del material (resistencia ante impactos), practicidad, tiempo de desarrollo o consecución, transparencia y estabilidad dimensional del material ante procesos de esterilización por autoclave definieron la elección mismo.

**2.6.1.1 Resina Epóxica.** Se caracteriza por ser un polímero bicomponente (está compuesto por la resina "A" y un endurecedor "B") termoendurecible, este cuenta con propiedades mecánicas superiores frente a otro tipo de resinas, al ser acreedora de estas características puede atribuirse su elevado costo, el cual puede ascender dependiendo del acabado y el grado de transparencia de la resina.

De manera preliminar se moldearon en este material piezas de geometría cilíndrica, con el propósito de evaluar la estabilidad dimensional ante procesos de esterilización por autoclave, luego de finalizar el proceso de curado. Sin embargo, tras someter la pieza al autoclave, no soportó la dilatación y se fisuró, se asume que la geometría de la pieza es la causante puesto que, al introducir una pieza con una geometría plana, esta sale intacta. Asimismo, el proceso de curado se da tras 24 horas y la dureza final se obtiene tras 5 días, lo que implica que el tiempo de desarrollo de todas las piezas es extenso, la mezcla de los

componentes es crítica puesto que el acabado final puede verse afectado; además, es propenso a accidentes lo que puede comprometer la integridad de la pieza al ser un material frágil, su poder de adhesión es superior lo que impide desmoldar la pieza con facilidad. Por tanto, este material no resulta adecuado para efectuar la construcción del BR, ya que el montaje requiere cierto nivel de destreza, tiempo para lograr calidad en el acabado y como se mencionaba anteriormente es inestable ante altos niveles de humedad, temperatura y presión.

**2.6.1.2 Resina poliéster pre-acelerada.** Es un material viscoso de color rosa tenue en su estado líquido, se torna de un tono ámbar claro cuando este se polimeriza. El diseño del prototipo comprende elaborar piezas en resina, lo que implica moldear cada una de ellas mediante moldes elaborados a base caucho-silicona. Este proceso contempla un tiempo de desarrollo considerable, puesto que la técnica empleada para servir la resina y poder distribuir la mezcla de manera uniforme es inyectarla mediante una jeringa; por esta razón, no se pueden preparar grandes cantidades a causa de que tiende a endurecerse rápidamente producto de la catálisis, lo que conlleva a repetir esta secuencia reiteradas veces hasta completar la pieza. Cabe mencionar que el proceso de acople entre las piezas compromete la estructura del prototipo presentando rugosidad, irregularidades (los conectores para downcomer no se encuentran alineados), cúmulos de resina en las zonas de adhesión, etc. Asimismo, retirar la pieza del molde conlleva tener cierto cuidado, ya que este material es bastante frágil, lo que significa que el mínimo impacto puede provocar la ruptura de la pieza; este aspecto resulta importante debido a que tiene una relación directa con la vida útil del equipo, ya que está sujeto a posibles accidentes asociados a la manipulación durante la alimentación, limpieza, montaje, etc.

Tras completar el prototipo se procedió a esterilizarlo empleando el autoclave, se pudo constatar que no sufre deformación alguna o fisura en las paredes; aunque tiende a perder transparencia tomando un tono más opaco. Se esperó que tras varios ciclos de esterilización el material recuperara su aspecto transparente; sin embargo, el resultado no fue el esperado, ya que la resina tomó una apariencia significativamente opaca con respecto a la inicial. En conclusión, este prototipo no resulta ideal en términos de tiempo, puesto que de igual manera requiere tener cierto nivel de destreza en el manejo de este polímero para poder prever anomalías o imperfectos durante el montaje y el acabado, además no solo comprende elaborar las piezas en resina sino que como primera medida se requiere elaborar los moldes en caucho-silicona, además la fragilidad del material es una de las variables que podría implicar construir de nuevo el prototipo en caso de fractura. Finalmente, este material tiende a absorber agua ocasionando opacidad y pérdida de transparencia, esta característica resulta indeseable al trabajar con microorganismos fotótrofos, dado que obstruye el paso de luz hacia el reactor.

**2.6.1.3 Vidrio.** La manipulación de este material requiere ser meticuloso, ya que presenta ciertas limitaciones en cuanto a su resistencia mecánica y frente a

cambios bruscos en la temperatura, lo que significa que está sujeto a sufrir daños adversos en su estructura sino se toman ciertas precauciones.

Una de las partes críticas del proceso es la apertura de los orificios en la superficie del recipiente, debido a que está expuesto a cambios de temperatura constantemente; siendo susceptible a un choque térmico o la generación de fisuras que debiliten la superficie. Si se evidencia que el vidrio está vencido y se somete a un proceso de esterilización por autoclave el recipiente terminará por fracturarse. De la misma manera se presentaron contratiempos en el desarrollo del sistema de sello, puesto que los moldes en caucho-silicona presentaban rugosidad y porosidad debido a que no se distribuía la mezcla de manera uniforme producto del diseño en PLA, además los moldes en 3D y el poder de adhesión de estos polímeros dificultaban desmoldar las piezas con facilidad por consiguiente el acabado de las piezas tanto en resina como en caucho-silicona era bastante regular. Cabe señalar que las mangueras siliconadas empleadas como conductos de conexión se deformaron al pasar por el autoclave.

Llevar a cabo todo el montaje de este modelo demanda tiempo, la elaboración del sistema de sello propuesto no resultó efectivo y no llegó a consumirse por las irregularidades en las piezas obtenidas. Diseñar un nuevo sistema que pueda adaptarse a las dimensiones del reactor conlleva tiempo, por tal razón se decidió hacer la transición hacia un prototipo a base de polipropileno.

**2.6.1.4 Polipropileno.** Este material se destaca por su versatilidad, su relación costo/beneficio, balance rigidez/impacto, alta resistencia química, su resistencia al impacto facilita el mantenimiento y limpieza del mismo, su resistencia a la corrosión influye en la durabilidad del equipo, el ser químicamente inerte evita reacciones adversas que puedan afectar a los microorganismos que se cultivan.

El montaje de este prototipo es bastante sencillo puesto que el recipiente incorpora como tal el sistema de sello optimizando los tiempos, además las propiedades mecánicas de este material permiten que se pueda adaptar a la geometría (BR air-lift de ciclo loop externo) sin alterar la integridad del mismo.

Finalmente, se comprobó que el material cumplía con todos los criterios de selección descritos en el numeral 2.1.1, por consiguiente, este material resulta ser el más adecuado para llevar a cabo el desarrollo del BR. El prototipo seleccionado cuenta con instrumentos que permiten monitorear y controlar de forma continua las variables del proceso proporcionando condiciones óptimas a los microorganismos que se cultivan.

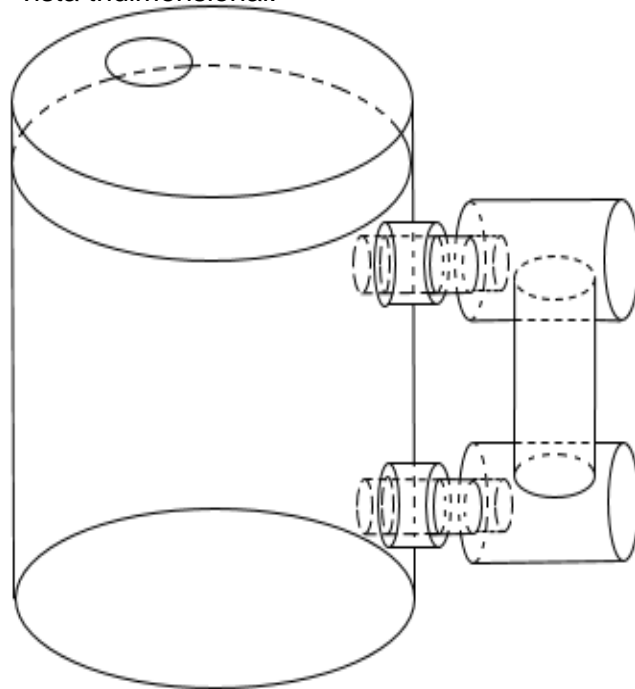
A continuación, se muestra una tabla con las dimensiones del BR seleccionado:

**Tabla 4.** Dimensiones del BR.

<b>Abreviaturas</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Valores</b>
$v$	Volumen de operación	300 cm <sup>3</sup>
$D_B$	Diámetro del cuerpo del reactor o Riser	7,3 cm
$H_B$	Altura del cuerpo o Riser del BR	11cm
$D_c$	Diámetro del bucle externo o Downcomer	1,5 cm
$H_D$	Altura del Downcomer	5 cm
$D_T$	Diámetro de la cubierta	8 cm
$D_{TP}$	Diámetro del agujero que aloja el tapón en caucho-silicona	1,5 cm
$H_A$	Altura del empaque en caucho-silicona	1,5 cm
$H_T$	Altura del tubo de conexión de acero inoxidable	3 cm

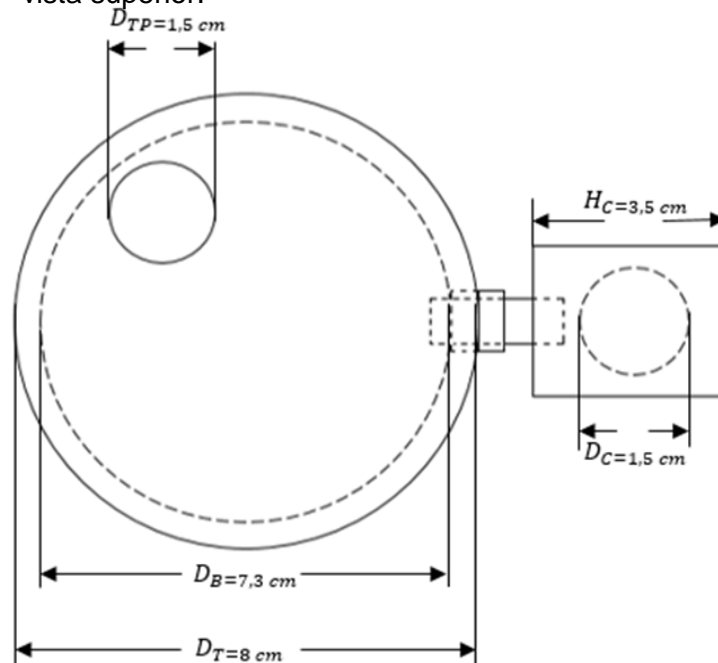
**Fuente:** elaboración propia.

**Figura 25.** Dimensionamiento del biorreactor vista tridimensional.



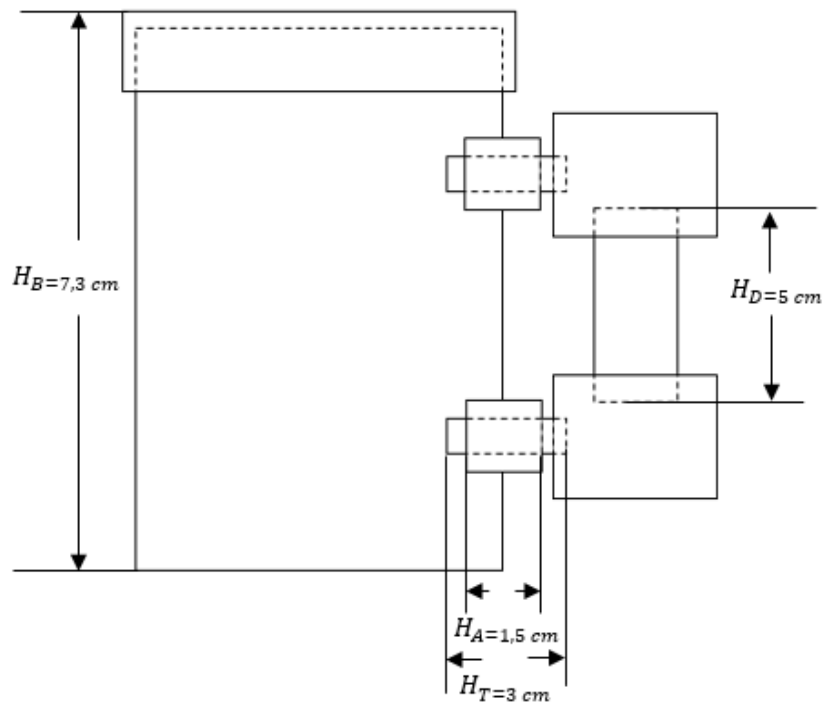
Fuente: elaboración propia.

**Figura 26.** Dimensionamiento del biorreactor vista superior.



Fuente: elaboración propia.

**Figura 27.** Dimensionamiento del biorreactor vista frontal.



**Fuente:** elaboración propia.

Las condiciones de cultivo se establecieron de acuerdo a referentes bibliográficos que favorecen el crecimiento de los microorganismos.

**Tabla 5.** Condiciones de cultivo.

Parámetros de crecimiento	Valores
Temperatura	26°C <sup>103</sup>
Iluminación	2000 Luxes <sup>104</sup>
pH	7 <sup>105</sup>
Esterilización	Autoclave (T=120°C; P=15 psi)

**Fuente:** elaboración Propia.

Estas condiciones se deben mantener durante la operación del consorcio, a excepción del pH, puesto que el proceso de fotosíntesis altera dicho valor.

**2.6.2 Pruebas de funcionamiento.** Estas pruebas corroboran el correcto funcionamiento del prototipo construido reflejando el sostenimiento de las condiciones de operación sobre las cuales se quiere trabajar. Básicamente, se desea comprobar que el BR tolera condiciones donde se ve expuesto a altas temperaturas, presiones y humedad; asimismo, se evaluaron los sistemas de agitación propuestos y se realizaron pruebas de agitación y mezclado que corroboraran el flujo entre las zonas interconectadas (riser y downcomer); esto con el propósito de constatar si el BR opera bajo la modalidad CSTR.



**2.6.2.1 Prueba resistencia térmica.** Tras más de 40 ciclos en el autoclave el material ha demostrado un buen rendimiento; pues su estabilidad dimensional se mantiene intacta, no sufre fisuras, deformaciones u alteraciones en su composición o estructura producto de la contracción y dilatación del material.

**2.6.2.2 Prueba sistemas de agitación.** Con el fin de estudiar la dinámica del proceso en términos de transferencia de masa, se rectificó si la manera en que el colorante se difundía en el prototipo seleccionado era adecuada. Un indicador, es el tiempo; puesto que un corto tiempo de igualación de las concentraciones tanto en el cuerpo de reactor como en el bucle externo del mismo indica una buena transferencia de masa. Se cronometró el tiempo y se obtuvo que el sistema de agitación neumático tardó 10 mientras que el sistema de agitación magnético tomó 15 segundos.

De igual manera se verificó de forma cualitativa y tomando como referencia el proyecto “Desarrollo de biorreactores controlados aplicables al estudio de cultivos de microorganismos de interés comercial” que el biorreactor tipo air-lift de ciclo (loop) externo junto con el sistema de agitación magnético logran patrones de flujo definidos. Se presume que este BR se comporta de forma ideal, es decir un sistema perfectamente agitado con una composición uniforme en todos los puntos del reactor. Visualmente, se evidenció que el flujo circula de forma constante entre las zonas interconectadas; en el bucle externo o downcomer la dirección del flujo es descendente mientras que en el riser es de forma ascendente; como lo reporta la literatura<sup>103</sup>.

**2.6.2.3 Prueba de esterilidad.** Se tiene como propósito demostrar que en conjunto el BR y los sistemas que lo componen son capaces de mantener un ambiente controlado y libre de microorganismos que puedan afectar los resultados y el desarrollo del proceso, esta variable es elemental si se desea trabajar con cultivos puros o axénicos. La prueba se realiza bajo las mismas condiciones de operación en los sistemas de agitación previamente descritos, los resultados se reportan a continuación.

**2.6.2.3.1 Sistema de agitación neumático.** Tras 5 días de incubación, de manera cualitativa se pudo apreciar (figura 29) un considerable cambio en la turbidez del medio lo que indica una posible contaminación por la presencia de una carga microbiana significativa en el BR.

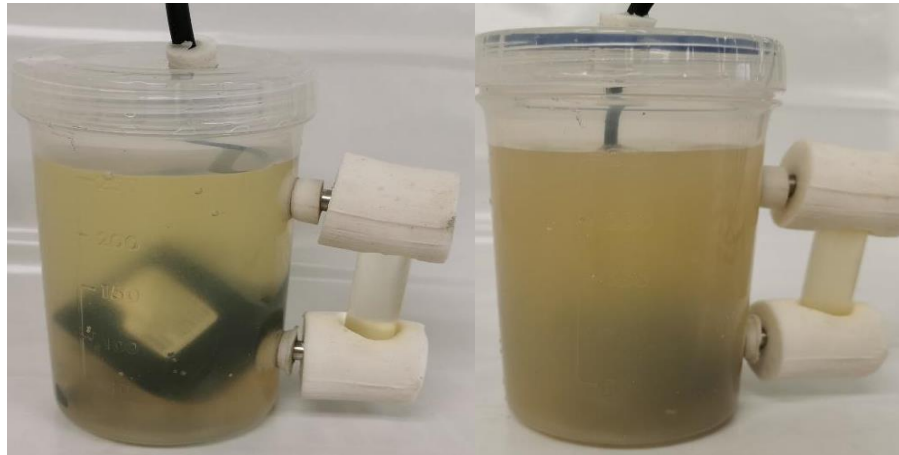
---

<sup>103</sup> MARROQUIN, Jorge. Op.Cit., p. 62.

**Figura 28.** Prueba cualitativa de esterilidad – Sistema de agitación neumático.

(a) Antes de operación.

(b) Después de operación.

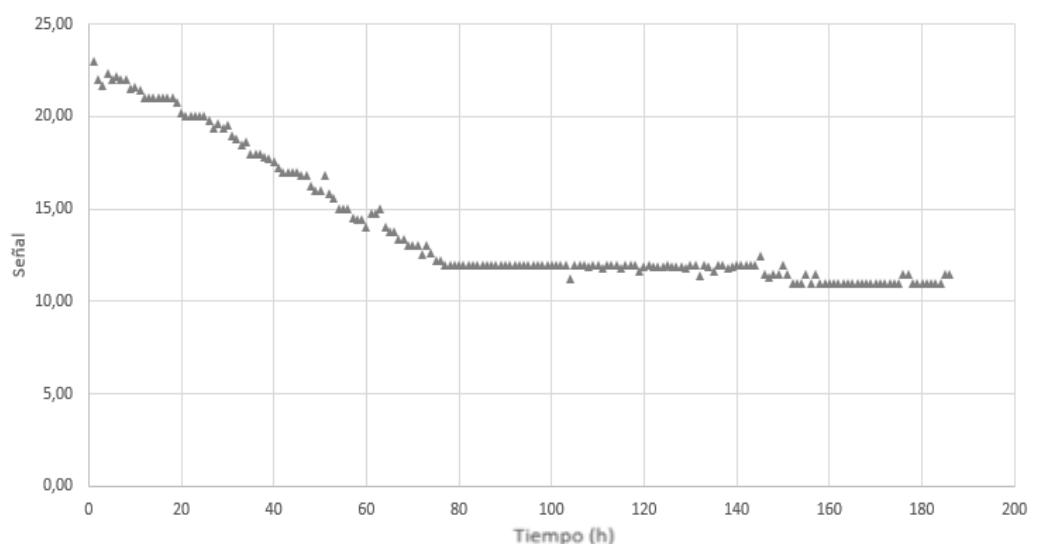


**Fuente:** elaboración propia.

La manipulación de la bomba puede comprometer la asepsia del cultivo; aumentando la probabilidad de que exista algún tipo de contaminación por el contacto con el ambiente, agentes externos o producto de la intervención humana.

De manera simultánea se monitorea de forma continua el patrón de comportamiento del proceso mediante el sensor óptico, el cual se contempla en el apartado 2.3.

**Gráfica 3.** Monitoreo de la prueba de esterilidad empleando el sensor óptico - sistema de agitación neumático.



**Fuente:** elaboración propia.

La curva obedece a un comportamiento sigmoideal, esta tendencia confirma la presencia de microorganismos al aumentar la concentración celular en la muestra; por tanto, emplear este sistema de agitación significa trabajar en un

ambiente no estéril, donde las variables como la productividad pueden verse afectadas por la competencia por nutrientes que generarían las nuevas poblaciones microbianas presentes en el medio, esto supone el agotamiento de nutrientes y la reducción de la tasa de crecimiento de los microorganismos de interés. Esta característica puede estar atribuida a la manipulación de la bomba y el método de desinfección propuesto, los protocolos no fueron efectivos y dieron lugar a una condición indeseable.

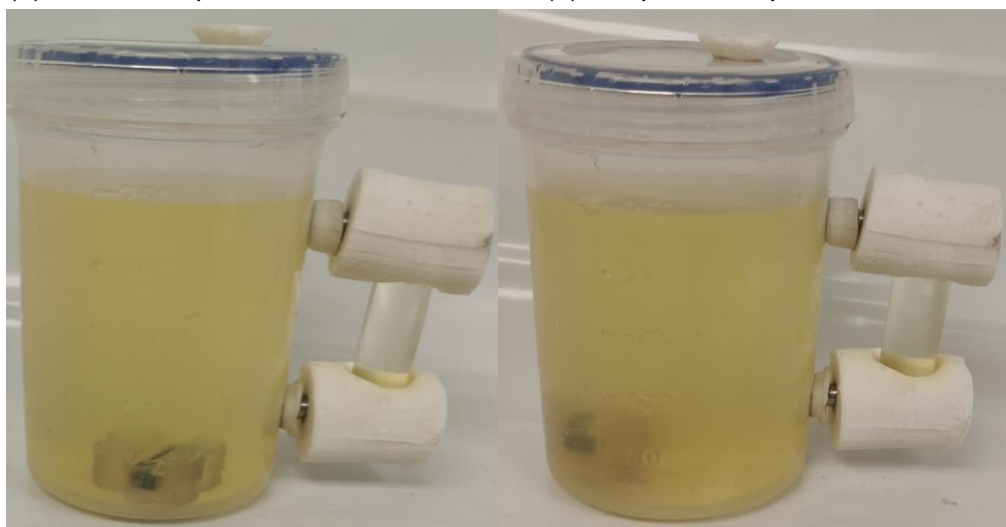
Cabe mencionar que este sistema es efectivo en condiciones donde no sea necesario mantener o controlar una condición axénica, la bomba permite una mezcla uniforme en el reactor donde la composición tiende a ser igual en todos los puntos del BR evitando la sedimentación o precipitación de los microorganismos. Como dato adicional, es un dispositivo práctico, versátil, de fácil operación, de bajo costo y con un mínimo consumo energético.

**2.6.2.3.2 Agitador magnético.** Tras el proceso de incubación se pudo constatar de manera cualitativa (Figura 30) que el medio conservo el mismo grado de transparencia con el cual inicio la operación. Como primera instancia, se presume que se mantuvieron condiciones asépticas durante la operación del BR.

**Figura 29.** Prueba cualitativa de esterilidad – Sistemas de agitación magnético.

(a) Antes de operación

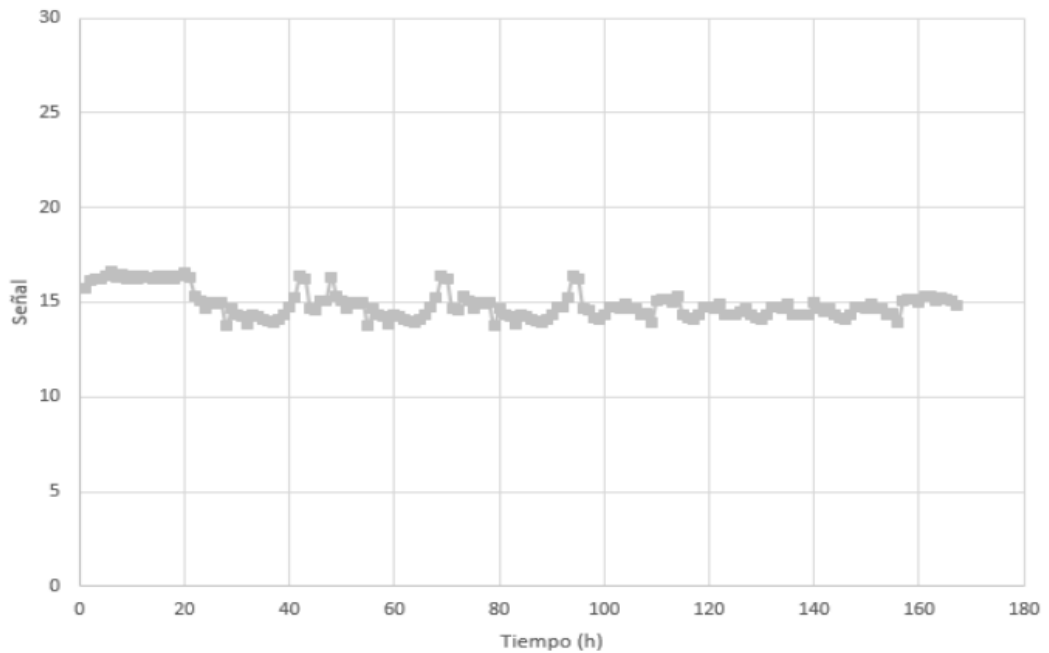
(b) Después de operación



**Fuente:** elaboración propia.

El sistema óptico desarrollado permitió monitorear en tiempo real, el comportamiento del proceso, el cual está definido por la siguiente gráfica.

**Gráfica 4.** Monitoreo de la prueba de esterilidad empleando el sensor óptico - sistema de agitación magnético.



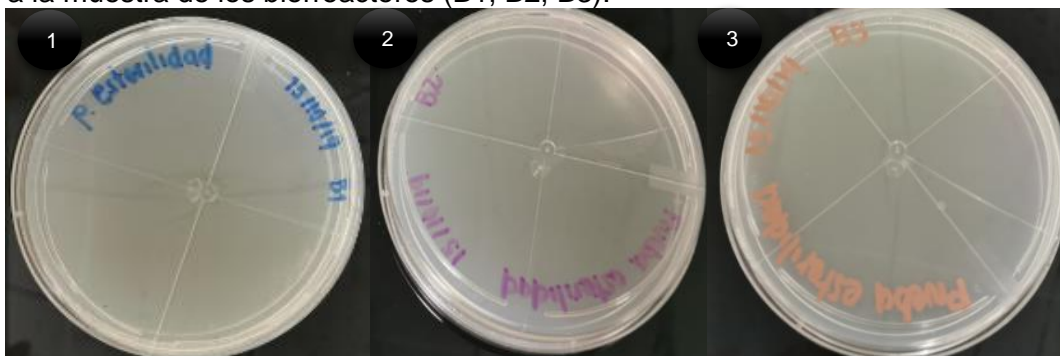
**Fuente:** elaboración propia.

El comportamiento lineal de la gráfica es un indicador ante la ausencia de microorganismos, es decir que las condiciones no fueron propicias para el crecimiento de los mismos. Las variaciones en las medidas están relacionadas con la estabilidad de los sensores ópticos, estos muestran fluctuaciones entre 0,5% y 0,9%. Estas variaciones están asociadas a los componentes electrónicos con los que fue diseñado el sensor (LED Y LDR), aunque presenten la misma referencia no pertenecen al mismo lote, lo que implica que cada sensor opera bajo un rango específico, y por tanto requieren una calibración. Dicha calibración se hace por medio de la toma de dos puntos (espectrofotómetro), puesto que el funcionamiento del sensor óptico no se comporta bajo una familia de rectas, es decir no comparten la misma pendiente<sup>104</sup>.

Finalmente, para confirmar un control positivo en la prueba, se realizó la siembra del cultivo de cada biorreactor en medio sólido con agar nutritivo. Luego de 4 días de incubación a 37°C, no se evidenció la formación de colonias, lo que indica que a partir de técnicas turbidimétricas (espectroscopia) y rayado en caja, fue posible verificar que las condiciones asépticas en el BR se mantuvieron durante toda la operación.

<sup>104</sup> Marroquin. Jorge. Op. Cit., p. 60.

**Figura 30.** Control positivo para esterilidad. Donde (1), (2) y (3) hacen referencia a la muestra de los biorreactores (B1, B2, B3).



Fuente: elaboración propia.

Este sistema de agitación además de proporcionar una mezcla completa en el BR, permite la homogeneidad en el cultivo favoreciendo la absorción de luz y nutrientes de los microorganismos, además al incorporar una barra magnética esterilizable en teflón (material inerte, no altera las propiedades del medio) reduce la intervención humana y la probabilidad de contaminación por agentes externos.

## 2.7 ANÁLISIS DE COSTOS

**2.7.1 Costos directos.** El prototipado y su equipamiento demandan ciertos materiales para su desarrollo. Las cantidades fueron ajustadas a fin de conformar un solo biorreactor.

**Tabla 6.** Costos directos.

<b>Materiales</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo (\$COP)</b>
Recipiente cilíndrico en polipropileno	Capacidad de 300 ml	1 unidad	9.000
Tubo en vidrio	16 mm de diámetro	10 cm	5.000
Caucho-silicona + Catalizador	-Codos	-2 piezas	12.000
	-Acoples	-2 piezas	
	-Tapón	-1 Pieza	
Moldes en PLA	-Codos	3 piezas	60.000
	-Acoples		
	-Tapón		
Tubo en acero inoxidable	5,6 mm de diámetro	10 cm	22.000
Caja rectangular en poliestireno expandido	Caja de 22 x 24 x 18 cm	1 unidad	20.000
Luces LED	Blancas	5 m	30.000
Ventiladores de	5x5 cm - amperaje de 0.15 V	3 unidades	15.000
Cordón de resistencia	--	2 m	4.000
Acrílico Negro	--	50*50 cm	50.000
Sensor óptico	--	1 unidad	24.000
Display del sensor	--	1 unidad	23.000
Arduino Uno	Rev 3	1 unidad	60.000
Bloque imantado cerámico	9.5x22x47mm	1 unidad	1.300
Moldes en PLA	Armazón	2 piezas	40.000
Adaptador	5 A – 12 V	1 unidades	30.000
Adaptador	2 A – 12 V	1 unidades	10.000
Barra Magnética en Teflón	6*20 mm	1 unidades	12.000
Cable	Calibre 26	20 m	5.000
Cable con Clavija	--	2 unidades	3.000
Interruptores	--	3 unidades	5.000
Termostato digital	W1209 - Control de Temperatura Con Display	1 unidad	12.000
Canaleta PVC Con Adhesivo	1/2" (13x8mm)	1 m	10.000
Estaño	---	100 gr	23.000
Cautín	----	1 unidad	14.000
Agitador magnético	3 puestos	1 unidad	100.000

**Tabla 6.** (Continuación).

<b>Materiales</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo (\$COP)</b>
Regulador de voltaje de 1000 v	--	1 unidad	40.000
Raspberry pi 3	Microcomputador	1 unidad	200.000
<b>Total</b>			<b>\$827.300</b>

**Fuente:** elaboración propia.

Los materiales empleados para la construcción del BR, en conjunto tienen un costo total de \$827.300(COP). Este costo puede verse sustancialmente disminuido si se decide cambiar el elemento recolector de datos, es decir, prescindir de la Raspberry pi 3 e implementar un NodeMCU con módulo ESP8266, esta tarjeta tiene un costo de \$15.000(COP) (con su respectiva programación) y permite el monitoreo continuo en tiempo real a partir de cualquier dispositivo que cuente con conexión a internet, esta tarjeta electrónica resulta ideal puesto que permitiría detectar posibles anomalías durante la captura y recolección de datos evitando la pérdida de los mismos.

**2.7.2 Costos indirectos.** Dentro de los costos es necesario incluir la mano de obra indirecta, la cual corresponde a todo el proceso de programación de los circuitos tanto del sensor óptico como del agitador magnético. Esta se desglosa de la siguiente como se muestra en la tabla 7.



**Tabla 7.** Costos indirectos.

<b>Recurso Humano</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Número de horas de desarrollo</b>	<b>Costo por hora por hora (\$COP)</b>	<b>Costo total (\$COP)</b>
Ingeniero electrónico	1	20	40.000	800.000

**Fuente:** elaboración propia.

En suma, el BR construido tiene un costo total o 1'627.300(COP), con una equivalencia a \$481,09 (US) (Tasa de cambio enero, 2020).


**Cuadro 8.** Biorreactores comerciales.

Modelo	Características	Ilustración
<p>Eppendorf BioFlo®</p>	<p><b>Volumen de operación (ml):</b> 400-1000 L.</p>	
	<p><b>Agitación:</b> Impulsores de paletas.</p>	
	<p><b>Modo de operación:</b> Lotes, feed-batch, continuo,</p>	
	<p><b>Manipulación:</b> Eppendorf SCADA, red IP (acceso a través de PC o teléfono móvil).</p>	
	<p><b>Variables de control y medida:</b> pH, DO, CO<sub>2</sub>, agitación, temperatura, potencial redox, nivel y OD.</p>	
	<p><b>Alimentación (W):</b> 450</p>	
<p>Fotobiorreactor FMT 150/1000-CUST (PSI)</p>	<p><b>Volumen de operación (ml):</b> Entre 150 y 1000.</p>	
	<p><b>Agitación:</b> Magnética.</p>	
	<p><b>Modo de operación:</b> Continuo.</p>	
	<p><b>Manipulación:</b> Manual, computadora, internet.</p>	
	<p><b>Variables de control y medida:</b> pH, Temperatura, iluminación, densidad óptica (en tiempo real), concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.</p>	
	<p><b>Alimentación (W):</b> 500.</p>	
<p><b>Costo (\$US):</b> 13,210 (Enero, 2020).</p>		

<sup>105</sup> MARROQUIN, Jorge. Op.Cit., p. 29.



**Cuadro 8.** (Continuación).

Modelo	Características	Ilustración
Fotobiorreactor Algaemaster 10 control (IKA)	<b>Volumen de operación (ml):</b> Entre 6000 y 10000.	
	<b>Agitación:</b> Hélice.	
	<b>Modo de operación:</b> Continuo.	
	<b>Manipulación:</b> Manual, computadora, programada, internet.	
	<b>Variables de control y medida:</b> pH, Temperatura, iluminación, suministro de nutrientes, agitación.	
	<b>Alimentación (W):</b> 375.	
<b>Costo (\$US):</b> 31,314 (Enero, 2020).		

**Fuente:** elaboración propia con base en MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS, 2017, p. 48.

Los modelos comerciales cuentan con diversas características que los hace superiores, su diseño permite el estudio, control y seguimiento de diferentes variables del proceso como pH, DO, CO<sub>2</sub>, potencial redox, OD, entre otras. Cuentan con materiales de primera calidad y además están totalmente automatizados, lo que facilita el manejo y operación.

De acuerdo a la anterior tabla, se puede apreciar los altos costos que implicaría adquirir un modelo comercial; mientras el modelo propuesto equivale a un 3.64% del valor del Fotobiorreactor FMT 150/1000-CUST (PSI), a un 1.010% con respecto a Eppendorf Bioflo 120, y finalmente a un 1.54% teniendo como referencia a Fotobiorreactor Algaemaster 10 control (IKA).

Las prestaciones del modelo construido pueden equiparar ciertas características de los modelos comerciales. Sin embargo, su diseño está bastante lejos de llegar a imitar el funcionamiento de un BR comercial; la eficiencia del prototipo no se ve comprometida, aunque este no cumpla con ciertos estándares o parámetros de calidad. Su aplicabilidad a este tipo de experimentos resulta ser útil, práctica y flexible, esta última permite modificar las variables del proceso con el fin de mejorar el diseño. Es importante destacar que agregar módulos de medición de pH y oxígeno disuelto tendría un costo de aproximadamente \$800 (US).

Si se deseara comercializar este prototipo, la relación costo/beneficio es alta, las ventajas y bondades de este producto resultan competentes para experimentaciones a escala laboratorio que no requieran equipos robustos,

permite incorporar otros instrumentos de medida sin afectar el comportamiento normal del proceso, control de temperatura, control de agitación, modelamiento de cinéticas de crecimiento mediante un monitoreo continuo en tiempo real y además presenta un bajo consumo energético, ya que no incorpora aireación; puesto que se reporta que el 50% de los costos de la operación son atribuidos a la demanda energética del proceso.

### 3. SELECCIÓN DE LA CEPA BACTERIANA Y MEDIO DE CULTIVO PARA LA CONFORMACIÓN DEL CONSORCIO

En el presente capítulo se establecen las condiciones de cultivo mediante un desarrollo pre-experimental y experimental que estuvieron en función de la selección de la cepa bacteriana y el medio más apropiado para promover un buen crecimiento microbiano, tanto de las cepas bacterianas como de la microalga *Chlorella vulgaris* sp. El desarrollo pre-experimental contempla la selección de la cepa bacteriana por medio de una evaluación cualitativa basada en la capacidad de producción del PHA en cada medio de cultivo y, a su vez, el crecimiento de la microalga en los mismos. Finalmente, para el desarrollo experimental se realiza una evaluación cuantitativa teniendo en cuenta las cinéticas de crecimiento, construidas a partir de los resultados de la evaluación cualitativa; con el propósito de establecer la cepa y medio a emplear.

#### 3.1 OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS

**3.1.1 Obtención de las bacterias productoras de PHA.** El grupo de investigación GRESIA previamente aisló 13 cepas productoras de PHA de un sistema de lodos activados de una planta de tratamiento de agua residual (PTAR) perteneciente a la compañía Pastas Doria S.A.S<sup>106</sup>. Dichas cepas poseen una nomenclatura basada en números (1-13).

De acuerdo a estudios previos realizados por el grupo de investigación; se identificaron y caracterizaron las morfologías macro y microscópicas de las cepas microbianas en mención, de manera simultánea se evaluó el crecimiento y la acumulación de PHA en presencia de glucosa y acetato. Finalmente, se determinó que las que mejor comportamiento tuvieron en los respectivos medios fueron las cepas 1, 5, 6 10 y 11. Todas las cepas presentaron una misma morfología, evidenciando bacilos. Se halló que las cepas 3, 4, 5 y 6 posiblemente eran Gram negativas; sin embargo, se recomendó confirmar dicha presunción. En contraste, las cepas restantes son Gram positivas, cabe mencionar que las cepas toleran una temperatura de hasta 37°C; lo anterior se tuvo en cuenta para comenzar la experimentación. Este estudio se contempla en el **ANEXO C**.

**3.1.2 Obtención de la microalga.** De igual modo, GRESIA tenía aislada la microalga *Chlorella Vulgaris* sp. de una laguna ubicada en Usme<sup>107</sup>.

**3.1.3 Replicación de microorganismos.** Debido a que los microorganismos son entregados en cajas de Petri que se conservaban en un cuarto frío a una temperatura de 4°C. Se replicaron de acuerdo al requerimiento de los mismo a lo largo de la experimentación, teniendo en cuenta que se debían renovar cada mes para evitar cualquier tipo de contaminante. Los microorganismos se

---

<sup>106</sup> QUIJANO, Deisy, 'Evaluación De La Producción De Metano A Partir De Biomasa Fotosintética', 2016.. p. 25-45.

<sup>107</sup> *Ibíd.*, p. 35.

mantiene en refrigeración en el cuarto frío bajo condiciones axénicas en su respectivo medio de cultivo.

**3.1.3.1 Cepas bacterianas productoras de PHA.** Las cepas se repicaron en el medio de cultivo agar nutritivo (apartado 3.2.6.1.1) empleando la técnica de siembra por agotamiento, de modo que en la última zona de extensión crecieran solamente colonias independientes. Se incubaron a 37°C en un rango de tiempo de 24 a 48 horas.

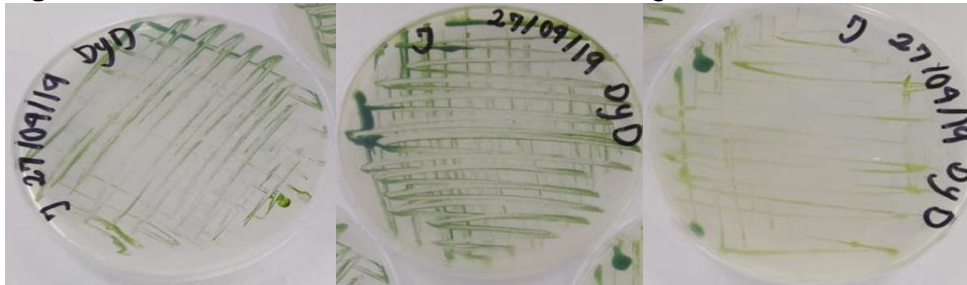
**Figura 31.** Cepas sembradas por agotamiento.



Fuente: elaboración propia.

**3.1.3.2 Microalga *Chlorella vulgaris* sp.** Se repicó la microalga en el medio de cultivo agar-alga (apartado 3.2.6.1.2), usando la técnica de siembra en masivo con el fin de obtener un número alto de microorganismo, se incubaron con fuente lumínica a una temperatura de 26°C, entre 72 y 96 horas.

**Figura 32.** Técnica de siembra en masivo Microalgas.



Fuente: elaboración propia.

## 3.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

Para que el crecimiento microbiano sea satisfactorio los microorganismos requieren de todos los elementos de su materia orgánica, el complemento total de iones necesarios para la energía y la catálisis, y, además, una fuente de energía. Sin embargo, dicho crecimiento puede estar influido por una variedad de factores, tanto físicos como nutricionales. Los factores físicos incluyen: la temperatura, la concentración de oxígeno, la humedad, la presión hidrostática, etc. Los factores nutricionales comprenden; la disponibilidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales, y en algunos casos vitaminas. Por tanto, es indispensable tener en cuenta las condiciones de crecimiento de los microorganismos para poder generarles un ambiente adecuado para su óptimo

crecimiento<sup>108</sup>. A continuación, se describen los factores que se tuvieron en cuenta.

**3.2.1 Protocolo de esterilización de materiales y medios de cultivo.** Se requiere que cualquier procedimiento que involucre la manipulación de los microorganismos, materiales, instrumentos, medios o soluciones se haga bajo condiciones asépticas previniendo así cualquier tipo de contaminación. Esto se realiza empleando un autoclave (All American modelo 50X-120), el cual por medio de emplear vapor de agua a altas presiones y temperaturas permite eliminar posibles microorganismos que puedan afectar negativamente los resultados. En este caso el tiempo de operación comprende aproximadamente 20 minutos, una temperatura de 120°C y una presión 15 psi.

Concluido el tiempo de esterilización, se procede a emplear una cabina de flujo laminar ultravioleta (UV), la cual evita que la zona de trabajo se encuentre libre de posibles contaminantes o agentes externos que puedan afectar los procesos, esta es previamente desinfectada con etanol al 96%, consecutivamente se enciende el ventilador con el fin de purgar los filtros y remover las partículas que puedan estar adheridas a la pared. Finalmente, se enciende el quemador Bunsen y la cabina es sometida a rayos UV por un lapso de 15 a 25 minutos, el cuarto donde está ubicada la cabina es oscuro y se aísla del exterior. Si se desea lograr un mayor grado de esterilidad en los medios y en los materiales a usar se puede optar por introducirlos en la cabina antes de iniciar el proceso de radiación ultravioleta.

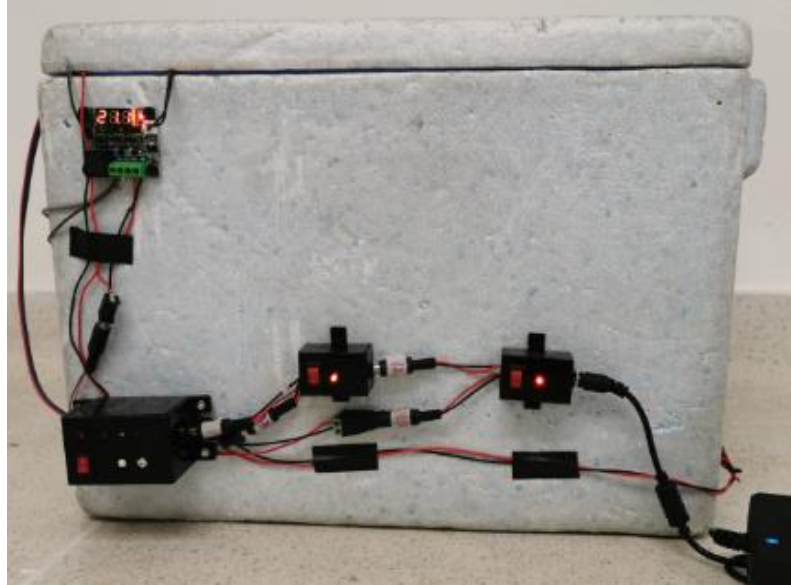
Además, es de vital importancia utilizar todos los implementos de bioseguridad (guantes, tapabocas, cofia, bata), para disminuir la posibilidad de cualquier tipo de riesgo para la salud y también, garantizar un entorno estéril y resultados óptimos en el trabajo a desempeñar.

**3.2.2 Cámara de incubación con agitador.** El sostenimiento de las condiciones de operación sugiere la fabricación de una segunda cámara de incubación, la cual funciona bajo el mismo principio y cuenta con las mismas especificaciones descritas en el apartado 2.2. Esta cámara difiere únicamente en sus dimensiones, y en vez de albergar un sistema de agitación magnético y todo el equipamiento asociado al sensor óptico, aloja un sistema de agitación orbital tipo Shaker.

---

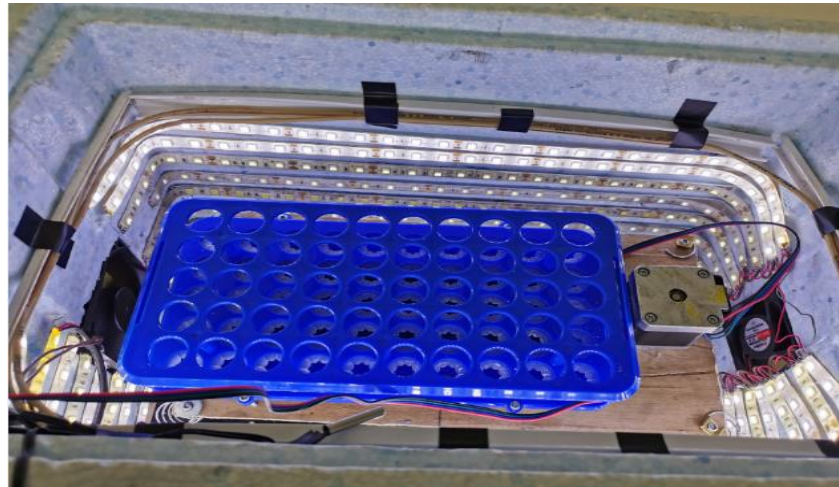
<sup>108</sup> PUMAROLA, A.; RODRÍGUEZ, A.; GARCIA, J.A., y PIEDROLA, G. 1992. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA. 2a. Ed. Elsevier España, 916p.

**Figura 33.** Montaje de cámara de incubación con agitador – Vista exterior.



Fuente: elaboración propia.

**Figura 34.** Montaje cámara de incubación con agitador – Vista interior.



Fuente: elaboración propia.

**3.2.3 Suministro de nutrientes.** Es importante tener en cuenta el metabolismo de los microorganismos a emplear para poder evaluar los nutrientes que se requieren para un crecimiento óptimo de los mismos. Los nutrientes esenciales para los microorganismos en general, deben contener una fuente de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo, y, además, micronutrientes, vitaminas, un aceptor y un donador de electrones<sup>109</sup>.

<sup>109</sup> PANIKOV, Nicolai. 2018. *Microbial Growth Dynamics, Comprehensive Biotechnology*, 2a. Ed. Elsevier., | <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00032-5>>.

**Cuadro 8.** Tipos de nutrición en microorganismos.

Modo nutricional	Fuente de energía	Fuente de carbono	Donador de electrones	Aceptor de electrones
Fotoautótrofo	Luz	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> , Fe <sup>+2</sup> , HS <sup>-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , Mn <sup>+2</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> , S <sup>0</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , CO <sub>2</sub>
Fotoheterótrofo	Luz	Compuestos orgánicos	Carbono orgánico	O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , S <sup>0</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>
Quimioautótrofo	Compuestos químicos	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> , Fe <sup>+2</sup> , HS <sup>-</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , Mn <sup>+2</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> , S <sup>0</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , CO <sub>2</sub>
Quimioheterótrofo	Compuestos químicos	Compuestos orgánicos	Carbono orgánico	O <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , S <sup>0</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>

Fuente: elaboración propia.

La fuente de carbono puede ser orgánica o inorgánica, los fotoautótrofos fijan el carbono del dióxido de carbono u otros compuestos inorgánicos, y, por otra parte, los heterótrofos obtienen carbono fijo de compuestos orgánicos hechos por otros organismos. En general, si los microorganismos usan oxígeno como receptor externo de electrones, los únicos productos de su metabolismo son, además de los nuevos microorganismos, dióxido de carbono y agua<sup>110</sup>.

Las cepas bacterianas son quimioheterótrofas, creciendo de manera obligada en condiciones aeróbicas, pues, utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones para cubrir sus necesidades energéticas. Por el contrario, las microalgas son fotoautótrofas, debido a que utilizan la energía de la luz para sintetizar compuestos orgánicos.

Para la preparación de los medios de cultivo empleados se tuvo en cuenta lo mencionado anteriormente, en la sección 3.2.6 se aborda en detalle la preparación de cada medio.

**3.2.4 Suministro de luz.** Las microalgas requieren de una fuente de energía proveniente de la luz para poder realizar el proceso de fotosíntesis, para tal fin, se implementa un sistema de luces automática tipo LED el cual se dispuso rodeando cada cámara de incubación. Sin embargo, si bien la luz es un nutriente crucial para su crecimiento, se requiere limitar su cantidad debido a que las microalgas al alcanzar su máxima tasa de crecimiento alcanzan un punto de saturación el cual promueve que se presente un punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales, dando incluso la posibilidad a la lisis celular. Se controló la intensidad lumínica a un valor aproximado de 2000 luxes<sup>111</sup>.

<sup>110</sup> DIONISI, Davide, 2017. ' Biological Wastewater Treatment Processes Mass and Heat Balances'. 1a. Ed. CRC Press. United states. 486p.

<sup>111</sup> HERNÁNDEZ, Alexis y LABBÉ, José. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, Vol. 49,

**3.2.5 Agitación.** Para asegurar la distribución homogénea de todos los nutrientes en los cultivos, y, además, evitar la sedimentación celular de los microorganismos se construyó un sistema de agitación (figura 36) basado en el funcionamiento de un agitador orbital tipo Shaker convencional.

Este sistema de agitación está compuesto por dos láminas contrachapada en madera de 4mm de espesor, en la lámina superior se ensambló una gradilla de 50 posiciones y un motor NEMA paso a paso el promovía la vibración de todo el sistema, para tal fin, fue necesario ensamblar mediante un acople impreso en 3D un tornillo (5 mm de diámetro y 5 cm de largo) al eje del motor el cual funcionó como peso excéntrico, adicionalmente se acoplaron 4 resortes en los extremos de las láminas que del mismo modo, en conjunto con el motor simulaban el movimiento de agitación mediante la compresión y extensión de estos.

Finalmente, se implementaron dos cajas impresas en 3D, una se encuentra bajo el motor sosteniendo el peso excéntrico en su interior, con el propósito de reducir la fricción y favorecer el desplazamiento de la pieza sobre el eje del motor se incorporó un rodamiento. La otra caja se ubica de forma paralela a la primera caja, la cual de la misma manera contiene un tornillo con las mismas dimensiones, este funciona como soporte para evitar la deformación de los resortes y el movimiento desorbitado de los mismos.

**Figura 35.** Sistema de agitación orbital tipo Shaker.



**Fuente:** elaboración propia.



**Figura 36.** Circuito de velocidades.



**Fuente:** elaboración propia.

Para que el sistema funcione es necesario adaptar un circuito de velocidades (figura 37) con el fin de controlar las revoluciones por minuto del motor NEMA y, por consiguiente, la intensidad de agitación del sistema según se requiera. El circuito consiste en un sistema de 16 velocidades ajustables, se compone de 4 luces LED, un interruptor on/off, dos pulsadores (controlan la velocidad). Debido a que el circuito se encuentra en sistema binario, las luces LED funcionan como indicadores de velocidad, es decir, la luz o luces que se enciendan entre más se encuentren a la izquierda indicarán una velocidad máxima o superior.

**3.2.6 Medios de cultivo.** Los microorganismos fueron fortalecidos y cultivados empleando diferentes medios de cultivo. Principalmente, se usaron medios sólidos para la reactivación y replicación de los mismos y, finalmente, se emplearon medios líquidos con variaciones de ácido acético, melaza - ácido acético y glucosa para la selección del medio más apropiado.

Los medios preparados se mezclan y se aforan con agua destilada para hidratar los componentes y, de acuerdo a la cantidad requerida se realizan las relaciones para obtener así las proporciones de cada componente.

**3.2.6.1 Siembra en medios sólidos.** Estos medios implican el uso de cajas de Petri estériles y medios previamente esterilizados. A continuación, se describe la composición de nutrientes en cada medio.

➤ **Agar nutritivo.** El protocolo para la preparación de este medio se describe en el **ANEXO C**.

**Tabla 9.** Composición de agar nutritivo.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (g/l)</b>
Agar bacteriológico	15
Glucosa	10
Caldo nutritivo	8

**Fuente:** elaboración propia.

➤ **Agar- alga.** Esta composición está basada en el proyecto de grado “Evaluación De La Producción De Metano A Partir De Biomasa Fotosintética”, donde se ajustaron las cantidades con base a la demanda de nitrógeno requerida por las microalgas *Chlorella vulgaris sp.*, se encontró, que un ligero exceso de orina favorece el crecimiento de la microalga por el contenido de nitrógeno presente en la orina, aproximadamente 7195 mg N / L más que el caldo alga<sup>112</sup>.

**Tabla 10.** Composición de agar-alga.

Composición	Cantidad (g/l)
Agar alga	15
Orina	8

Fuente: elaboración propia.

Con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseados se emplea un antibiótico bacteriostático conocido como Cloranfenicol, en la tabla 12 se detalla su composición.

**Tabla 11.** Composición del antibiótico Cloranfenicol.

Composición	Cantidad
Cloranfenicol	1,5 g
Etanol al 96%	10 ml

Fuente: elaboración propia.

La adición del antibiótico se realiza de la siguiente manera: en un tubo falcón estéril de 50 ml se toman 35 ml de medio, cuando este se enfría sin llegar a solidificarse puesto que las altas temperaturas promueven la degradación del mismo, se añade el 0,1% del volumen es decir 35 µl, posteriormente se procede a agitar el tubo, se sirve en la caja de Petri y, por último, se deja solidificar el medio. En este caso, la técnica de siembra masiva es empleada con el propósito de obtener una densidad celular elevada, al finalizar se incuban a una temperatura de 26°C entre 72 y 96 horas, con iluminación constante.

**3.2.6.2 Siembra en medios líquidos.** Este procedimiento se realiza en tubos de ensayo previamente esterilizados; mediante la técnica de siembra por inoculación, la cual consiste en adicionar 10 ml del medio a emplear, posteriormente se procede a inocular los microorganismos con ayuda de un asa bacteriológica flameada, se agita y se cierra el tubo para, finalmente, incuban a una temperatura de 26°C con agitación continua (230 rpm) entre aproximadamente 96 y 120 horas. Independientemente de la cepa bacteriana, se realizó el mismo procedimiento.

En el caso de las microalgas; para obtener una mayor concentración celular, debido a que su crecimiento es mucho más lento, fue necesario emplear una caja de Petri inoculada con algas, a la cual se le adiciona 5 ml de solución salina

<sup>112</sup> QUIJANO, Deisy. Op. Cit., p. 74.

al 85%, y con ayuda de perlas de vidrio se hace un raspado para resuspender toda la muestra, se vierte la mezcla en un recipiente estéril cubierto con una gasa que actúa como filtro.

Por último, se afora con 500 µl de la muestra empleando una micropipeta hasta completar 10 ml.

➤ **Medio nutritivo (MN).** El medio nutritivo se empleó como control positivo, puesto que, así como es la principal fuente de carbono de los organismos heterotróficos también lo es de los microorganismos.

**Tabla 12.** Composición del medio nutritivo.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad(g/l)</b>
Caldo nutritivo	8
Glucosa	10

**Fuente:** elaboración propia.

➤ **Medio melaza (MM).** La melaza hace parte de la biomasa de Segunda generación, siendo un subproducto del procesamiento del azúcar, por tanto, se emplea como uno de los sustratos potenciales, esta fue otorgada por GRESIA quien la utiliza como alimentación a los reactores acidogénicos pertenecientes al laboratorio. Se utiliza orina autoclavada con el fin de proporcionar una fuente de nitrógeno a las microalgas.

**Tabla 13.** Composición del medio melaza.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (por litro)</b>
Melaza	3 g
Orina	4 ml

**Fuente:** elaboración propia.

➤ **Medios de ácido acético.** Los ácidos grasos volátiles (AGVs) son compuestos químicos orgánicos presentes en diversos ambientes como en aguas residuales, estos poseen diversas aplicaciones; por ejemplo, pueden ser usados como fuentes de carbono a los microorganismos que producen metabolitos útiles o eliminan contaminantes orgánicos de las aguas residuales, y pueden servir como sustrato de partida para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y PHAs<sup>113</sup>.

Según diversas investigaciones se ha encontrado que el ácido acético y su forma de ion acetato son uno de los AGVs que mejores tasas de rendimiento genera al momento de acumular el biopolímero<sup>114</sup>. De manera similar a la melaza,

<sup>113</sup> SERAFIM, Luísa; LEMOS, Paulo y REIS, María. 'Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding'. *Journal of Biotechnology*, 2006, p. 226-238.

<sup>114</sup> CHALIMA, Angelina; OLIVER, Laura; FÉRNANDEZ, Laura; KARNAOURI, Anthi; DIETRICH, Tomas y TOPAKAS, Evangelos, 'Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds', 2017, p. 1-17. <<https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>>.

básicamente los medios de ácido acético son una simulación de la corriente de salida a los reactores acidogénicos del laboratorio. Para este caso, se emplea el ácido acético que proviene del vinagre comercial marca Santa Clara.

Dentro de este marco, se propuso que estos medios resultaran de la combinación de estos dos compuestos en diferentes proporciones, para evaluar el efecto que tenía.

Al emplear vinagre el medio va tender a tener un pH bajo, lo que implica que probablemente el crecimiento tanto de algas como de bacterias pueda verse afectado. Por tal razón se realiza la neutralización de los medios, se empleó como agente neutralizante Hidróxido de Sodio con grado comercial.

- **Medio ácido acético sin neutralizar.**

**Tabla 14.** Composición del medio MAC-1.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (por litro)</b>
Melaza	1 g
Vinagre	2 ml
Orina	4 ml

**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 15.** Composición del medio MAC-2.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (por litro)</b>
Melaza	2 g
Vinagre	1 ml
Orina	4 ml

**Fuente:** elaboración propia.

- **Medio ácido acético neutralizado.** Se decide realizar una modificación a estos medios, neutralizándolos, pues se sabe que casi todas las bacterias crecen óptimamente a un pH neutro o cercano, entre 6,5 y 7,5 y muy pocas crecen a un pH inferior<sup>115</sup>.

**Tabla 16.** Composición del medio MAA-1.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (por litro)</b>
Melaza	1 g
Vinagre	2 ml
Orina	4 ml

**Fuente:** elaboración propia.

<sup>115</sup> RODRÍGUEZ, María R., 'Variabilidad de La Inactivación Microbiana y de La Fase de Latencia de Los Microorganismos Supervivientes a Un Proceso de Acidificación', 2016., p. 9.

**Tabla 17.** Composición del medio MAA-2.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad (por litro)</b>
Melaza	2 g
Vinagre	1 ml
Orina	4 ml

**Fuente:** elaboración propia.

### 3.3 TÉCNICAS DE TINCIÓN PARA DETECCIÓN CUALITATIVA DE PHA

La identificación de la producción de PHA se realizó por medio de tinción Gram y dos técnicas de teñido (Agar Rojo Nilo y Agar Negro Sudán), los colorantes empleados para este fin tiñen los gránulos de PHA para hacerlos fácilmente identificables al ser vistos al microscopio<sup>116</sup>. A continuación, se describe el cada protocolo llevado a cabo para cada técnica de tinción.

**3.3.1 Protocolo para identificación de colonias productoras de PHA, usando Rojo de Nilo.** Para identificar bacterias productoras de PHA, en un principio se prepara agar nutritivo (tabla 13) y se procede a esterilizar, el medio autoclavado se deja enfriar con el fin de evitar la degradación del indicador y posteriormente se adiciona 500  $\mu$ L/L de Rojo Nilo, este es un indicador de detección de inclusiones intracelulares por excelencia, pues permite ver los gránulos presentes en los microorganismos que los producen. Se realiza el mismo proceso de siembra en medio sólido, después de transcurrido el tiempo de incubación si se evidencia que las colonias presentan una fluorescencia rosado tenue, indica que son positivas para la producción de PHA<sup>117</sup>. En el **ANEXO D** se desglosa el protocolo de preparación de los medios de cultivo empleado para evaluar las bacterias productoras de PHA mediante Rojo Nilo.

**3.3.2 Protocolo para confirmación de colonias productoras de PHA, usando Negro Sudán B.** Se procede a realizar la confirmación de la producción de PHA sólo a las cepas que resultaron positivo en la técnica de Rojo Nilo. Se prepara medio de cultivo negro Sudán, basado en la metodología de Burdon<sup>118</sup>.

**Tabla 18.** Composición del medio utilizado para tinción con Negro Sudán B.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad(g/l)</b>
Agar bacteriológico	15
Peptona	5
Cloruro de sodio	5

**Fuente:** elaboración propia.

<sup>116</sup> GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. Op. Cit., p. 87.

<sup>117</sup> *Ibíd.*, p. 87.

<sup>118</sup> ARCOS, Monica. DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE UN BIORREACTOR DISCONTINUO, 2007. Op. Cit., p. 87.

El colorante negro de Sudán B es un lisocromo, es decir presenta solubilidad en los lípidos lo cual le permite adherirse a la capa lipídica que recubre al biopolímero<sup>119</sup>. Por lo anterior, este indicador confirmador de PHA tiñe por completo la parte interna de los gránulos formados dentro de la célula del microorganismo que produzca dicho biopolímero.

Después de concluir la incubación en el medio descrito, se adiciona a cada caja de Petri el colorante durante 30 minutos, cubriendo totalmente la superficie de la caja, transcurrido ese tiempo se procede a retirarlo y se hace un lavado con etanol al 96%.

Si se observa que las colonias se tornan de color negro-azulado se confirma su capacidad de producción de PHA.

**3.3.3 Tinción de Gram.** Esta técnica de tinción es la más básica en la valoración de muestras para análisis bacteriológico, es de tipo diferencial pues determina las diferencias que hay entre células bacterianas o entre partes de una misma célula, por tanto, permite determinar si la muestra contiene bacterias de tipo Gram-positivas y/o Gram-negativas puesto que se diferencian en la estructura de sus paredes celulares. Para realizar esta tinción se requiere principalmente fijar la muestra de las bacterias que se desean analizar por medio del método físico más utilizado en microbiología (calor seco) el cual consiste en poner directamente la lámina a la flama del quemador Bunsen durante varios segundos y consecutivamente alrededor de 3 veces; esto con la finalidad de detener los procesos vitales de las células de los microorganismos, preservando así su estructura y morfología<sup>120</sup>. En esta tinción es necesario añadir colorantes en los cuales sus moléculas se adsorben a la membrana celular de las bacterias, puesto que estas por sí solas no pueden ser observables al ser incoloras.

El protocolo empleado fue el siguiente: Teniendo el frotis fijado se añade durante 1 minuto el tinte Cristal Violeta, se lava con agua destilada para remover el excedente de tinte, se adiciona Lugol durante 1 minuto y medio, se lava nuevamente con agua destilada, se limpia la muestra con Alcohol acetona durante 30 segundos, de nuevo se remueve con agua destilada, se cubre con Fucsina durante 1 minuto y finalmente se lava con agua destilada<sup>121</sup>.

---

<sup>119</sup> *Ibíd.*, p. 53.

<sup>120</sup> LÓPEZ, Luis; HERNÁNDEZ, Melisa; COLÍN, Claudia; ORTEGA, Silvestre; CERÓN, Guillermo y FRANCO, Rafael., 'Las Tinciones Básicas En El Laboratorio de Microbiología', *investigación en discpacidad*, Vol. 3, 2014, p. 10–18 <<http://www.medigraphic.com/rid>>.

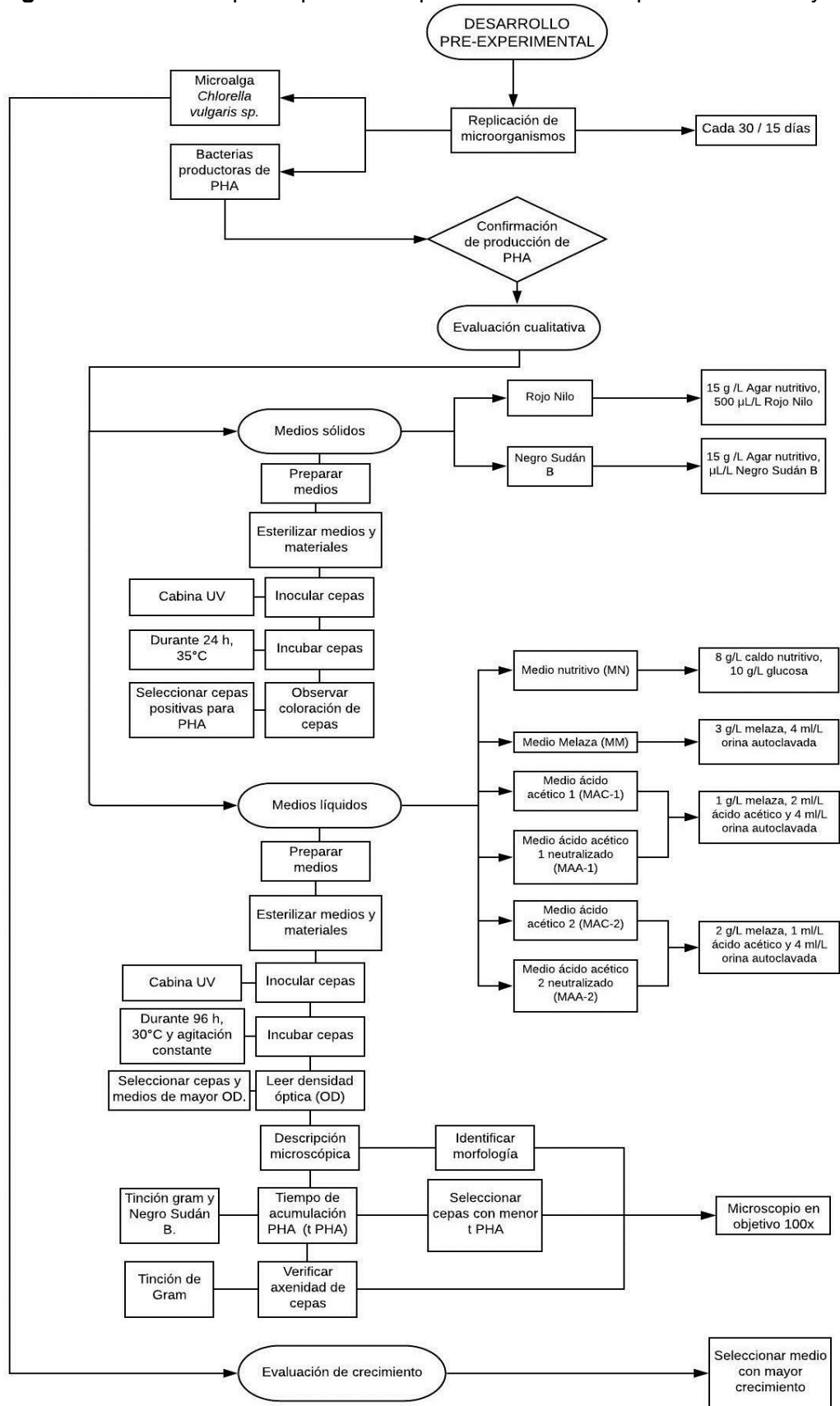
<sup>121</sup> SANTAMBROSIO, Eduardo; ORTEGA, Marta y GARIBALDI, Pablo A., 'Tinción y observación de microorganismos', 2009, p. 1-9.

### 3.4 DESARROLLO PRE-EXPERIMENTAL

Se denominó desarrollo pre-experimental a la selección de cepas y sustratos mediante análisis cualitativos en términos de la detección de PHA y el tiempo en el que se evidencia crecimiento, en cuanto a las cepas productoras de PHA. De igual modo se realizó el análisis del crecimiento de las microalgas en los diferentes sustratos (Figura 38).

Este pre-experimento se dividió en tres fases: En la primera, por medio de las técnicas de detección de PHA; Agar Rojo Nilo y Agar Negro Sudán B, en las cajas de Petri de cada cepa a evaluar se confirmaron las que aún producían el biopolímero, descartando así las cepas que no lo hacían. En la segunda fase, se inocularon las cepas seleccionadas en los medios líquidos descritos en la sección 2.2.5.2, con el fin de determinar el tiempo en el que cada cepa se demoraba en crecer y el tiempo en el que acumulaba el PHA, por medio de monitoreo microscópico diario. Al mismo tiempo, se verificaba la axenicidad de las cepas por medio de tinción de Gram y, por otra parte, se realizó una descripción microscópica. Por último, en la tercera fase se reactivaron las microalgas aisladas por GRESIA para evaluar su crecimiento en los medios líquidos seleccionados hasta este punto y, debido a que su crecimiento es considerablemente más lento (las microalgas tardan aproximadamente 120 horas en igualar la concentración de la cepa bacteriana) con respecto a las bacterias, el medio a seleccionar en esta etapa es el que favorece el desarrollo de la microalga.

Figura 37. Desarrollo pre-experimental para selección de cepas bacterianas y medios.



Fuente: elaboración propia.



**3.4.1 Detección cualitativa de PHA de las cepas bacterianas.** Antes de iniciar el desarrollo experimental, se tuvieron en cuenta estudios realizados anteriormente por GRESIA (ver **ANEXO A**), donde se determinó que las cepas 1, 5, 6, 10 Y 11 son las que acumulan mejor el PHA y se comportan mejor en medios con presencia de glucosa y al mismo tiempo en acetato; la cepa 7 resultó negativa para la producción de PHA realizando pruebas mediante las diferentes técnicas de tinción; las cepas 1, 5, 6, 10 y 11 crecen en 24 horas mientras que las cepas restantes crecen entre 48 y 72 horas. Por tales razones se descartaron las cepas 2, 3, 4, 7, 9 y 12; y se continuó trabajando con las cepas 1, 5, 6, 10 y 11.

Principalmente, se realizó la evaluación cualitativa a las cinco cepas seleccionadas por medio de las técnicas de teñido para confirmar la producción de PHA. En primer lugar, se inocularon las cepas que ya habían sido reactivadas previamente en Agar Rojo Nilo siguiendo el protocolo de la sección 3.3.1. Posteriormente, se inocularon las cepas que resultaron positivas, es decir las que presentaron fluorescencia rosa tenue, en el medio reportado en el apartado 3.3.2, dichas cepas se incubaron a 37°C y después de 2 días se procedió a añadir el colorante siguiendo todo el proceso descrito en el mismo apartado.

**3.4.2 Evaluación cualitativa en medios líquidos.** Para realizar la evaluación cualitativa se inocularon las cepas positivas para PHA obtenidas de la tinción con Rojo Nilo con sus respectivas réplicas, en los sustratos potenciales descritos en la sección 3.2.6.2. Se incubaron a una temperatura constante de 26°C, durante 96 horas, usando la cámara de incubación con agitador.

**3.4.2.1 Evaluación del crecimiento y tiempo de acumulación de PHA en los medios de cultivo.** Concluido el tiempo de incubación se tomaron muestras para medir la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm<sup>122</sup>. De manera análoga, durante el tiempo de incubación de los microorganismos se confirmó la presencia del biopolímero intracelularmente y el tiempo en el cual se acumulaba el mismo. Lo anterior se llevó a cabo por medio de la tinción de Gram mencionada y negro Sudán B en lámina.

Además, con el fin de confirmar las morfologías establecidas en estudios previos (**ANEXO C**), se realizó una descripción morfológica tanto macroscópica como microscópica de cada una de las cepas. Para la morfología macroscópica se identifica su tamaño, forma, borde y consistencia de las cepas; por otra parte, por medio de la tinción de Gram se observa su morfología microscópica, la cual describe la estructura didérmica dada por la envoltura celular<sup>123</sup>.

El proceso realizado se iniciaba tomando muestras cada 12 horas de cada tubo de ensayo, posterior a ello, se realizaba un frotis de cada una de las muestras en las láminas previamente marcadas, se fijaban por medio del quemador

---

<sup>122</sup> GONZÁLEZ, María G. 'Producción de Poli-Hidroxialcanoatos Por Bacterias Del Género Bacillus de origen Marino', 2008., p. 25.

<sup>123</sup> SILHAVY, Thomas J.; KAHNE, Daniel y WALKER, Suzanne, The bacterial cell envelop. Cold Spring Harb Perspect Biol . 2010, doi: 10.1101 / cshperspect.a000414

Bunsen y, paso siguiente, se realizaba la tinción de Gram para cada muestra, para finalmente ser observadas usando un microscopio marca Leica MD500 enfocando siempre con el lente 100x.

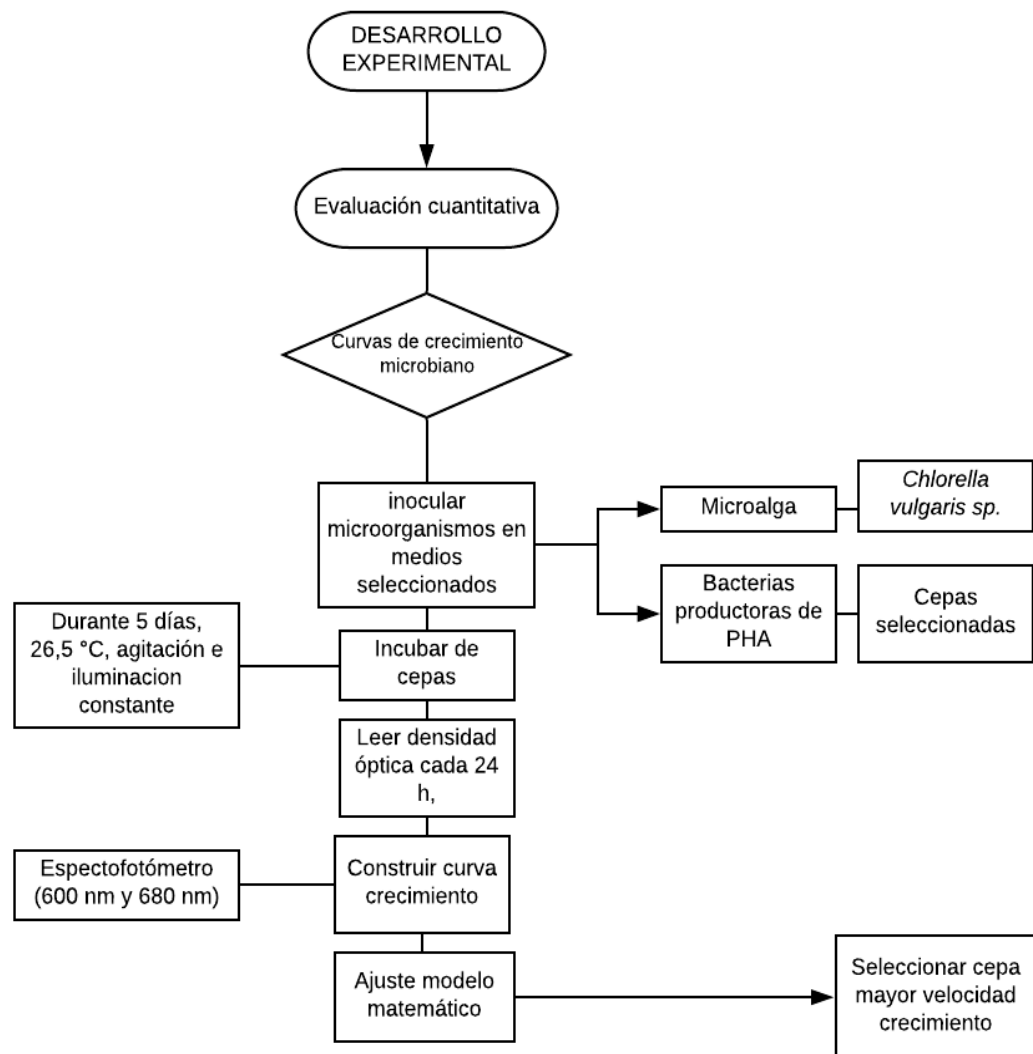
#### **3.4.2.2 Evaluación del crecimiento de microalga en los medios de cultivo.**

Para seleccionar las cepas bacterianas y los medios de cultivo en términos cualitativos, se incubó la microalga con sus respectivas réplicas en los medios de cultivo seleccionados en el apartado anterior, con el fin de ver su comportamiento especialmente en los medios que contenían acetato. Las condiciones de crecimiento para dicho experimento fueron: agitación (200 rpm) e iluminación (2000 luxes), constante y una temperatura de 26°C.

### **3.5 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

Se denominó desarrollo experimental al procedimiento realizado mediante curvas de crecimiento con el propósito de concluir la selección de la bacteria y el medio a emplear para continuar con el siguiente capítulo.

**Figura 38.** Desarrollo experimental para selección de cepa bacteriana y sustrato.



**Fuente:** elaboración propia.

**3.5.1 Evaluación de la cuantificación de crecimiento.** Con el fin de efectuar la cinética de crecimiento, se realizó un seguimiento diario de la densidad óptica de las bacterias seleccionadas en la sección 3.4.2.2 y la microalga en los medios de cultivo en cuestión.

**3.5.1.1 Procedimiento para realizar la curva de crecimiento microbiano.**

Para llevar a cabo la evaluación mencionada, los microorganismos se incubaron en la cámara de incubación con agitadora, a una temperatura de 26°C<sup>124</sup>, agitación (200 rpm) e iluminación constante. El experimento se realizó por triplicado, tomando una muestra cada 24 horas, durante 5 días. Se realiza la

<sup>124</sup> SHI, Jun; PANDEY, Pramod K.; FRANZ, Annaliese K.; DENG, Huiping y JEANNOTTEO, Richard. Op. Cit., p. 3.

medición de la densidad óptica por medio de un espectrofotómetro (Genesys 20, modelo Thermo) en diferentes longitudes de onda de acuerdo al rango de espectro electromagnético visible reportado para las bacterias y la microalga, 600 nm y 680 nm respectivamente<sup>125</sup>. La confirmación de estos resultados fue posible evidenciarlos mediante observación de la turbidez de la biomasa. Para la medición de la densidad óptica, se realizaron diluciones y los datos obtenidos fueron multiplicados por su respectivo factor de dilución.

### **3.6 ANÁLISIS DE RESULTADOS**

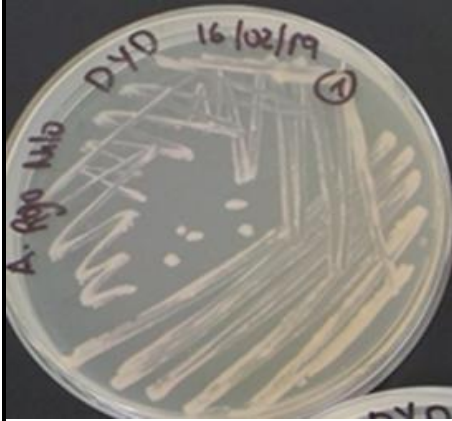
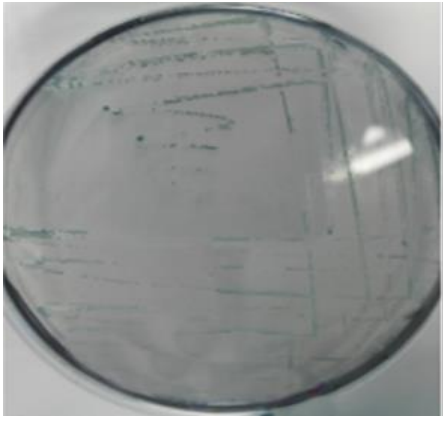

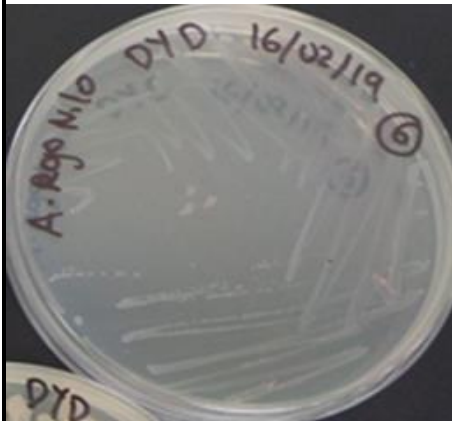
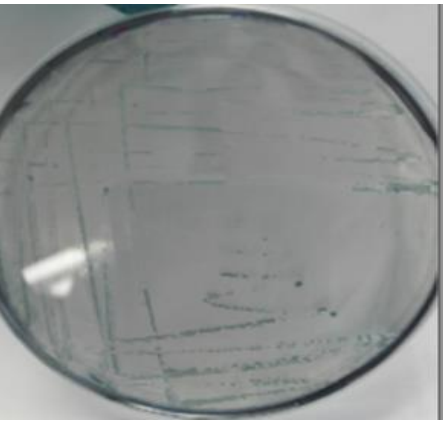
**3.6.1 Desarrollo pre-experimental.** A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la evaluación cualitativa realizada por medio de técnicas de tinción para evaluar la acumulación del PHA en las bacterias, donde sí se presentan cepas que perdieron su capacidad de producción del biopolímero se descartan. Por otro lado, se muestran los resultados del comportamiento de las cepas en los medios de cultivo evaluados descartando los medios en los cuales no se genera un crecimiento significativo y, a la vez, se presentan los tiempos de acumulación de PHA de cada cepa. Finalmente se realiza la descripción macro y microscópica de las cepas rectificando que sean las mismas morfologías reportadas como se mencionó en el apartado 3.4.1.

**3.6.1.1 Evaluación cualitativa en la detección de PHA.** Como se mencionó anteriormente, el propósito de esta evaluación es comprobar la producción del biopolímero de las cepas seleccionadas, utilizando los dos indicadores para tal fin.


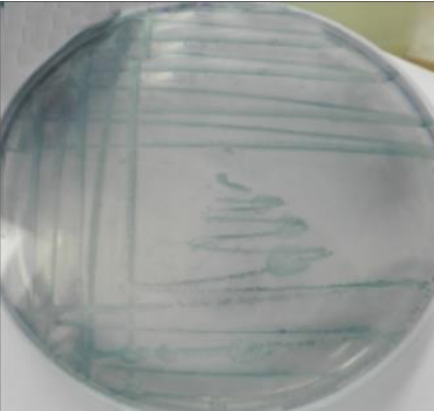

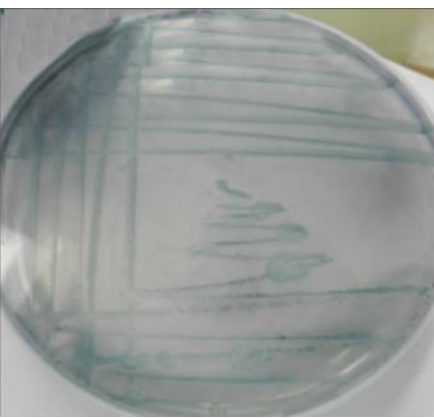
---

<sup>125</sup> *Ibíd.*, p.3

**Cuadro 9.** Detección cualitativa de PHA en las cepas bacterianas.

Cepa	Descripción de coloración presentada	
	Agar Rojo Nilo	Agar Negro Sudán B
1	<p>Colonias rosadas tenue</p> 	<p>Colonias negro-azulado</p> 
5	<p>Colonias blancas</p> 	<p>Debido a que las colonias no presentaron en Agar Rojo Nilo la fluorescencia rosa tenue, no se realizó la confirmación de producción de PHA. Se presume, que la tasa de generación del biopolímero requiere un mayor tiempo de incubación al contemplado para poder realizar la confirmación.</p>
6	<p>Colonias rosadas tenue</p> 	<p>Colonias negro-azulado</p> 

**Cuadro 10.** (Continuación).

Cepa	Descripción de coloración presentada	
	Agar Rojo Nilo	Agar Negro Sudán B
10	<p>Colonias rosadas tenue</p> 	<p>Colonias negras negro-azulado oscuro</p> 
11	<p>Colonias rosadas tenue</p> 	<p>Colonias negras negro-azulado oscuro</p> 

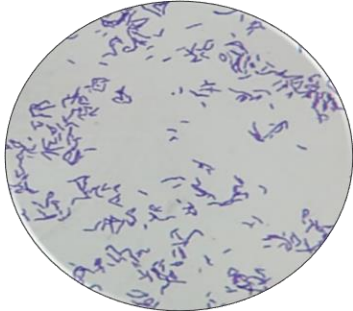

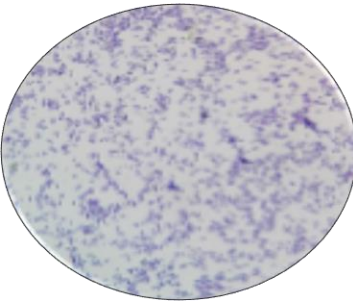
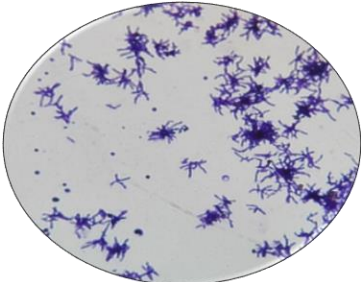
Fuente: elaboración propia.

Se obtuvo que todas las bacterias con excepción de la cepa 5, presentaron una tonalidad fluorescente rosa tenue, lo cual indica la presunta producción de PHA como se puede observar en el cuadro 6, luego de obtener este resultado, se procedió a realizar la tinción confirmatoria con Negro Sudán B donde se obtuvo que las cepas 1, 6 10 y 11 se tornaron de color negro-azulado visualizando finalmente un resultado positivo para la producción del biopolímero.

**3.6.1.1.1 Descripción microscópica y macroscópica de las bacterias.** Para terminar esta evaluación, se procedió a replicar las cepas positivas para la tinción con Negro Sudán B en Agar nutritivo, con el fin de realizarles tinción de Gram para verificar sus morfologías tanto macro como microscópicas, en el cuadro 10 se detallan los resultados obtenidos, concluyendo que las cepas 3, 4, 5 y 6 son

Gram positivas y las demás morfologías presentadas son las mismas evaluadas previamente en el estudio realizado por GRESIA (**ANEXO C**).

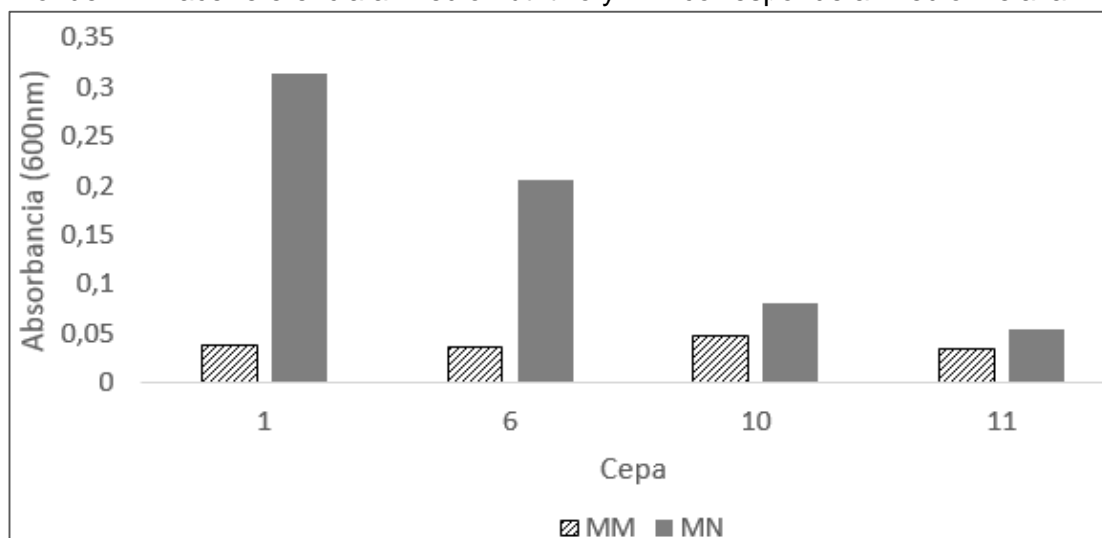
**Cuadro 11.** Descripción macroscópica y microscópica de las cepas.

<b>Cepa</b>	<b>Descripción microscópica</b>	<b>Descripción macroscópica</b>
1	 <p>Bacilos medianos Gram positivos</p>	Colonias puntiformes, circulares, convexas, borde redondeado, amarillas.
6	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>	Colonias puntiformes, irregulares, convexas, borde ondulado, blancas.
10	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>	Colonias pequeñas redondas, pulvinadas, borde regular, amarillas.
11	<p>Bacilos</p>  <p>medianos Gram positivos agrupados en forma de estrella</p>	Colonias medianas, irregulares, elevadas, borde rizado, blancas.

**Fuente:** elaboración propia.

**3.6.1.2 Evaluación cualitativa en medios líquidos.** Esta sección se denomina evaluación cualitativa, puesto que no hubo un registro diario del crecimiento en términos de densidad óptica, sino que solamente se evaluó el resultado final de esta, transcurridas las 96 horas de incubación de cada cepa en cada medio de cultivo. Se descartó el medio en el cual no se generó un crecimiento significativo y, a la vez, de determinaron los tiempos de acumulación de PHA de cada cepa en cada medio, puesto que la producción de PHA se da en condiciones de exceso de la fuente de Carbono, se evaluó el efecto de cada medio en función de lo mencionado. En las gráficas 5 y 6 se presentan los resultados obtenidos.

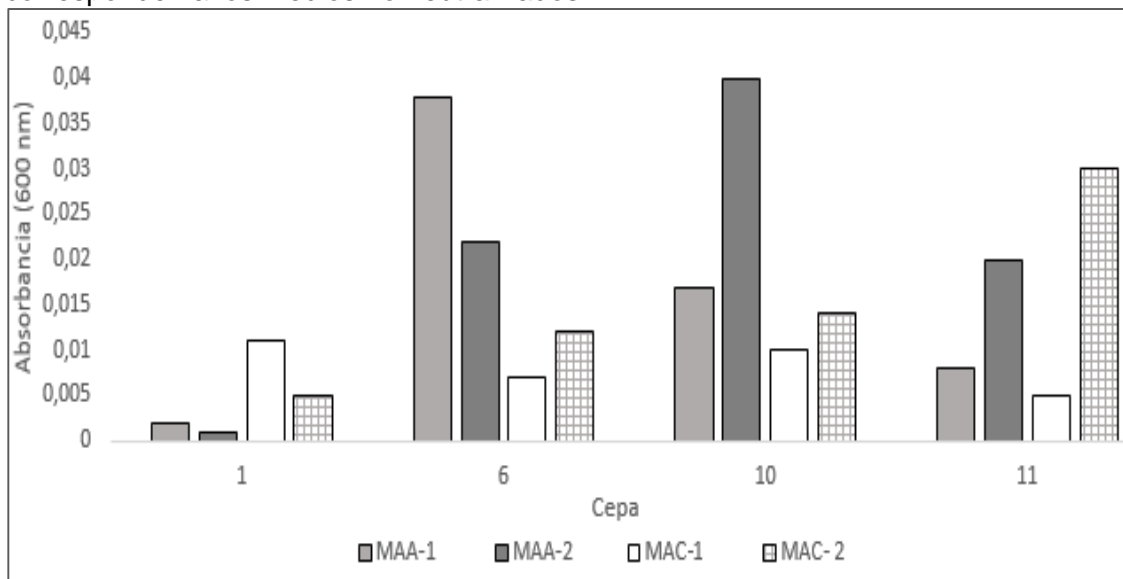
**Gráfica 5.** Crecimiento de cepas en los medios de cultivo de control a las 96 h. Donde MN hace referencia al medio nutritivo y MM corresponde al medio melaza.



Fuente: elaboración propia.



**Gráfica 6.** Crecimiento de cepas en los medios de cultivo de ácido acético. Donde MAA-1 y MAA-2 son los medios de ácido acético neutralizados mientras MAC-1 y MAC-2 corresponden a los medios no neutralizados.



**Fuente:** elaboración propia.

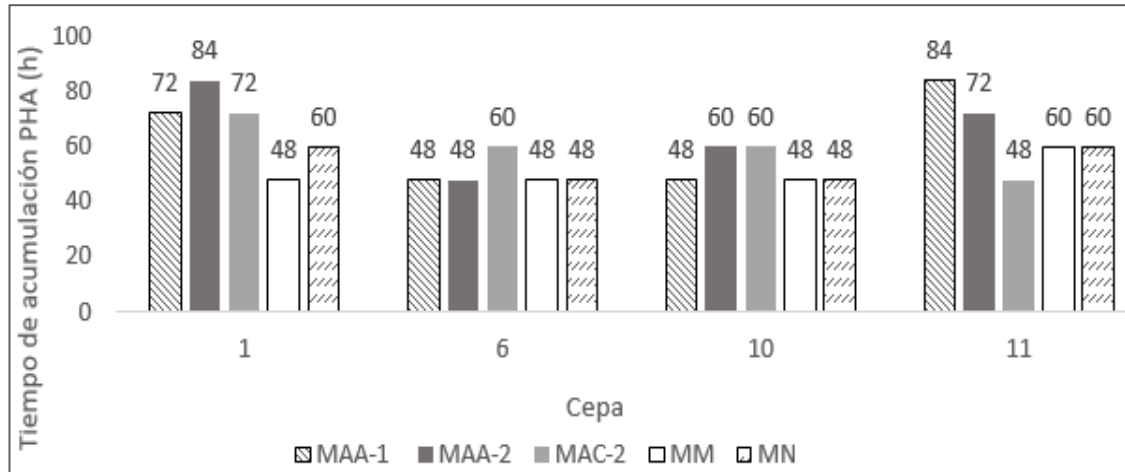
En la gráfica se muestra el comportamiento obtenido en los medios de MN y MM, como se esperaba se evidencia que todas las cepas en general crecieron mejor en medio nutritivo, puesto que este se compone principalmente de glucosa, la cual es la fuente primaria en la síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica<sup>126</sup>. De la misma manera, la melaza está compuesta por un conjunto de azúcares los cuales permiten que haya una buena incorporación de estos al metabolismo de las bacterias. Se puede observar que la cepa 1 (gráfica 7) no generó un crecimiento significativo en prácticamente todos los medios, especialmente en los medios de ácido acético neutralizados MAA-1 y MAA-2. Por el contrario, esta misma cepa fue la que mejor creció en MN. Por otra parte, la cepa 11 obtuvo su mayor crecimiento en el medio de ácido acético no neutralizado MAC-2 y luego en los medios neutralizados MAA-2, MAA-1 y MAC-1, respectivamente. Finalmente, se evidencia que las cepas 6 y 10 fueron las que mejor se desempeñaron en los medios de ácido acético neutralizado, en MAA-2 y MAA-1. De acuerdo a estos resultados se descarta la cepa 1 y se siguen estudiando las cepas 6, 10 y 11. Además, se decidió seguir trabajando con los medios neutralizados (MAA-1 y MAA-2) y con el medio MAC-2, pues estos generaron crecimientos significativos en contraste con el medio MAC-1.

Para determinar el tiempo de acumulación del PHA se realizó un monitoreo cada 12 horas, por medio de observación en microscopio de la tinción Gram y negro Sudán B en lámina; para comprobar y confirmar la presencia del PHA, respectivamente. En el momento de realizar la tinción de Gram, el colorante Safranina es de gran ayuda, puesto que tiñe las paredes celulares de rosa

<sup>126</sup> Md Eroglu S., Toprak S., Urgan O, MD, Ozge E. Onur, MD, Arzu Denizbasi, MD, Haldun Akoglu, MD, Cigdem Ozpolat, MD, Ebru Akoglu, 'Optimización de La Producción Del Agente de Biocontrol Candidia Sake', *Saudi Med J*, 33 (2012), 111 <<https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>>.

dejando cualquier otro compuesto sin teñir, obteniendo como positivo para productor de PHA si se observaban gránulos en el interior de la membrana citoplasmática de la cepa en cada medio evaluado.

**Gráfica 7.** Tiempo de acumulación intracelular de PHA. Donde MAA-1 y MAA-2 son los medios de ácido acético neutralizados mientras MAC-1 y MAC-2 corresponden a los medios de ácido acético no neutralizados, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.



**Fuente:** elaboración propia.


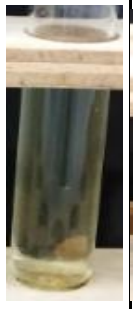






Como se puede observar en la gráfica anterior todas las cepas tuvieron la tendencia de acumular mucho más rápido el biopolímero en los medios MN y MM lo cual indica que el tiempo de acumulación del PHA está ligado directamente con el crecimiento, pues como se mencionó antes, precisamente en estos medios fue donde se presentó una mayor densidad óptica. Las cepas 1 y 11, fueron las que demoraron más en acumular el PHA intracelularmente, incluso en los medios MN y MM. Por otro lado, se evidencia que las cepas 6 y 10 se comportan similar pues son las que acumulan el PHA en la mayoría de medios a las 48 horas, y además concuerdan en el medio MAA-1. Razones por las cuales se decide descartar tanto las cepas 11 y 1 como el medio MAC-2.

### 3.6.1.2.1 Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* sp.

Como ya se ha mencionado, si bien es cierto que se tiene mayor interés en los medios de ácido acético y, además, las cepas 6 y 10 tuvieron un comportamiento favorablemente en éstos, de acuerdo al artículo "Process for symbiotic culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlorella vulgaris* for in situ CO<sub>2</sub> mitigation" uno de los principales retos en el desarrollo de un cultivo mixto entre un microorganismo heterótrofo y un autótrofo es la selección de un medio que permita el dominio conjunto de los dos microorganismos<sup>127</sup>. Por lo anterior, se requirió evaluar el crecimiento de la *Chlorella Vulgaris* sp., en los medios en estudio, tanto el medio de control como MM y los medios de ácido acético manteniendo las condiciones de operación (ver cuadro 11).

<sup>127</sup> LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. Op. Cit., p. 2.

**Cuadro 12.** Crecimiento de microalgas en medios de cultivo. Donde MAA-1 y MAA-2 son los medios de ácido acético neutralizados mientras MAC-1 y MAC-2 corresponden a los medios de ácido acético no neutralizados, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.

Día	MM	MN	MAA-1	MAA-2
0				
7				

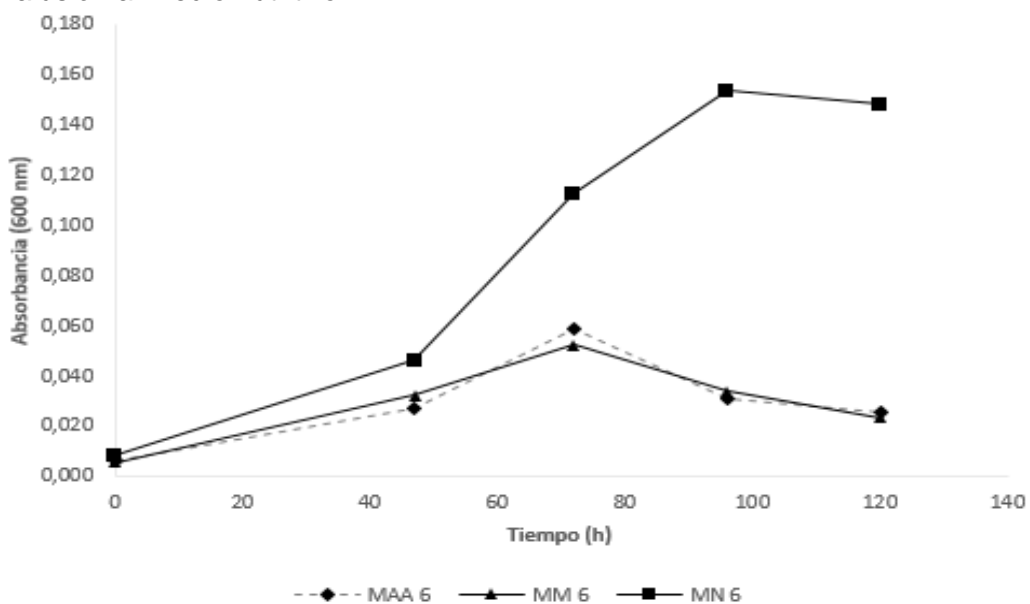
Fuente: elaboración propia.

El anterior cuadro muestra el resultado visible que se obtuvo luego de 7 días de incubación en los medios de cultivo en estudio, en los sustratos de interés (MAA-1 Y MAA-2) se evidencia un mayor crecimiento, siendo en el medio que contiene más acetato (MAA-1) donde se presenta la mayor cantidad de biomasa. Si bien todas las especies de microalgas tienen un metabolismo autotrófico, varias especies utilizan también un metabolismo heterotrófico debido a que pueden utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono. Existen estudios en los cuales algunas especies han exhibido la capacidad de crecer heterotróficamente en acetato como única fuente de carbono y además si están en condiciones mixotróficas se suele favorecer la captación del acetato y a su vez el aumento de la biomasa en contraste con las condiciones heterotróficas, por lo cual se cree que esta especie de *Chlorella vulgaris sp.*, puede actuar de esa forma<sup>128</sup>. Dicho lo anterior, se decidió seleccionar el medio de ácido acético MAA-1 y realizar las cinéticas de crecimiento tanto con este sustrato como con MM, MN y MAA-1, para poder tener una mejor idea de su comportamiento en términos de velocidad de crecimiento.

<sup>128</sup> LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. Op. Cit., p. 9.

**3.6.2 Curvas de crecimiento de cepas y medios seleccionados.** En el presente apartado, se presentan los resultados obtenidos del seguimiento de la densidad óptica durante el tiempo de incubación. Estas curvas de crecimiento permiten determinar el efecto de cada medio de cultivo contrastando el crecimiento de cada cepa y la microalga en las diferentes fases de crecimiento a lo largo del tiempo.

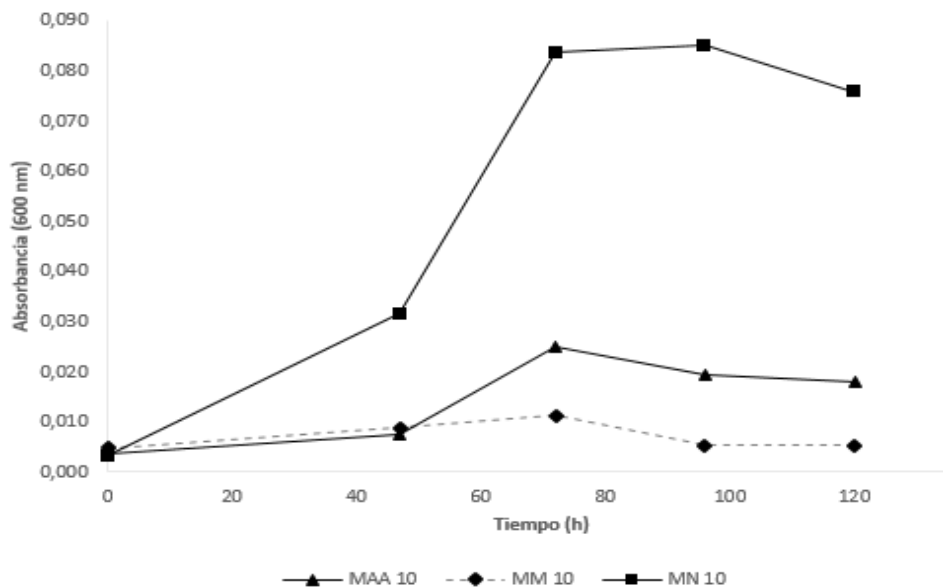
**Gráfica 8.** Curva de crecimiento cepa 6. Donde MAA-1 corresponde al medio de ácido acético neutralizado, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.



**Fuente:** elaboración propia.

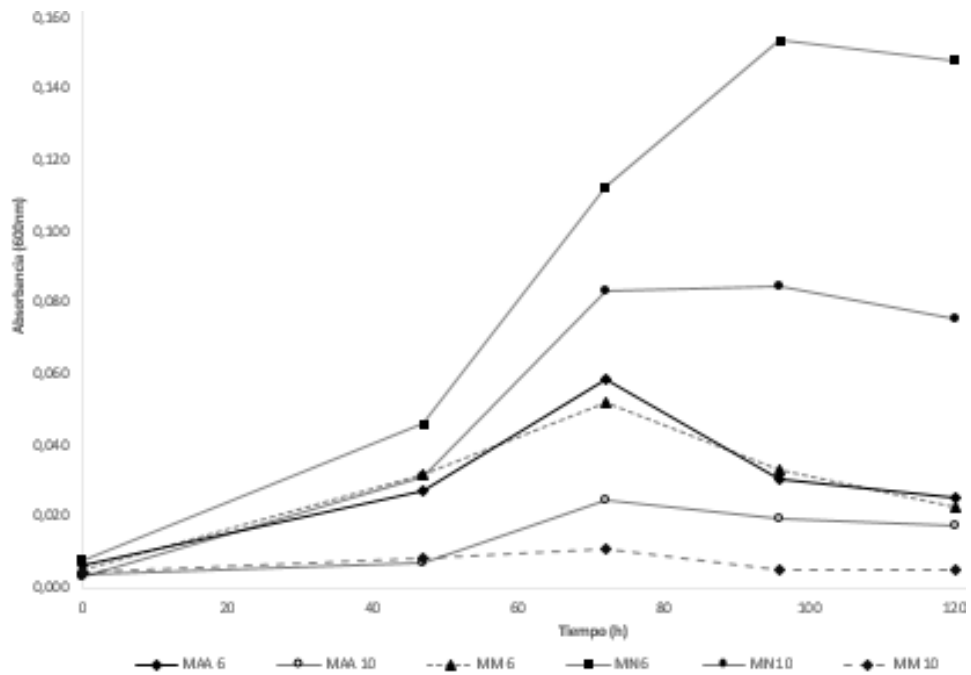
Cabe aclarar que el grado de turbidez del medio melaza (MM) es bastante alto, lo cual podría perturbar los resultados en términos de la densidad óptica. Por tanto, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4500 rpm y una temperatura de 20°C. Tras finalizar dicho tiempo, se procedió a descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en agua destilada, con el fin de evitar interferencias en las medidas.

**Gráfica 9.** Curva de crecimiento cepa 10. Donde MAA-1 corresponde al medio de ácido acético neutralizado, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.



Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 10.** Curvas de crecimiento cepas 6 y 10. Donde MAA-1 corresponde al medio de ácido acético neutralizado, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.

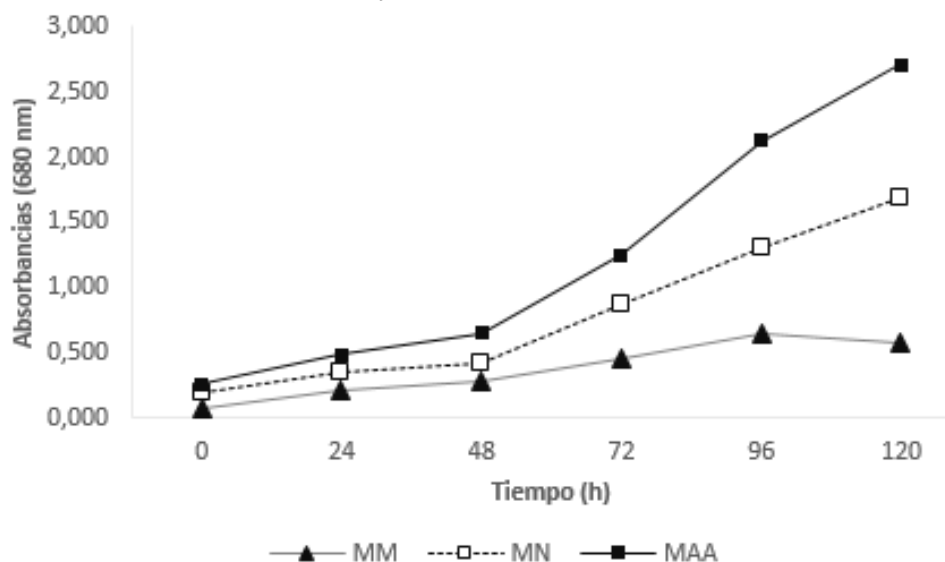


Fuente: elaboración propia.

En la gráfica 10 se puede observar el comportamiento de la cepa 6 y 10 en los tres medios estudiados. De forma evidente en el caso de las dos cepas los controles positivos (MN) exhibieron un mayor crecimiento con respecto a los otros medios de cultivo alcanzando unidades de absorbancia de 1,54 y 0,85 a los 4 días de incubación donde se da inicio a la fase estacionaria, dándose el mayor crecimiento por parte de la cepa 6.

Por otra parte, se obtuvieron diferentes comportamientos en los demás medios para cada una de las cepas. Sin embargo, respecto a las fases de adaptación y exponencial de los microorganismos se observa que tienen la misma tendencia en un rango de tiempo de 47 y 72 horas, respectivamente. La cepa 6 evidenció un mayor crecimiento en los demás medios con respecto a la cepa 10.

**Gráfica 11.** Curva de crecimiento microalgas. Donde MAA-1 corresponde al medio de ácido acético neutralizado, MM hace referencia al medio melaza y MN hace alusión al medio nutritivo.



**Fuente:** elaboración propia.

En el caso particular de la microalga se aprecia que el medio de control no fue en el que mejor creció, sin embargo, en el medio MAA fue en el que mejor lo hizo, pues como se había mencionado en el apartado 3.6.1.2.1 se presume que esta especie de *Chlorella vulgaris* puede crecer heterotróficamente en acetato como única fuente de carbono. En todos los medios se observa que la fase de adaptación se da hasta las 48 horas, posteriormente se inicia la fase exponencial. A los 4 días se observa que en el medio de melaza se empieza a adaptar la microalga, con tendencia pronta de llegar a su fase de declinación. Por otro lado, en los medios MN y MAA no es notoria ni la fase estacionaria, ni la fase de muerte debido a que se finalizó el seguimiento a los 5 días de incubación.

**3.6.2.1. Curva de calibración.** Los resultados obtenidos a través del método turbidimétrico empleado no permiten evidenciar la viabilidad de la cepa y del alga en el medio seleccionado; por tanto, se decidió utilizar un método directo que permitiera el recuento de los microorganismos con la finalidad de relacionar la concentración en células/ml y la absorbancia tanto para las algas como para la cepa bacteriana seleccionada. Se empleó como técnica de recuento celular la Cámara Neubauer, el protocolo de cuantificación y conteo es descrito en el apartado 4.3.3.1.

La curva se realizó tomando como referencia 5 puntos con el fin de obtener un buen ajuste, los microorganismos han sido previamente cultivados en el medio seleccionado (en líquido) por separado en condiciones ambientales propicias con un tiempo de incubación de 4 días, con el fin de obtener una densidad óptica con una concentración considerable (buscando el punto de saturación de los microorganismos). Finalmente, se tomó una muestra de 100 ml de los medios cultivados con algas y bacterias, estas muestras fueron el patrón sobre el cual se realizaron las diluciones. El primer punto equivale al 100% de la solución patrón, y los siguientes puntos se evidencian en la siguiente tabla.

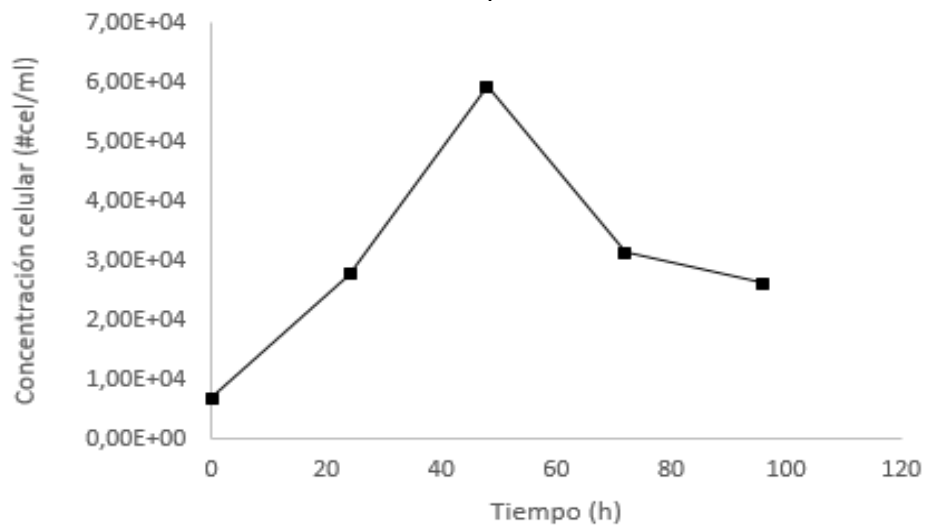
**Tabla 19.** Diluciones para la curva de calibración.

<b>Solución patrón (ml)</b>	<b>Solución salina (ml)</b>	<b>Porcentaje de dilución (%)</b>
10	--	100
7	3	70
5	5	50
3	7	30
1	9	10

**Fuente:** elaboración propia.

Con base a las curvas de calibración obtenidas en el **ANEXO E** y **ANEXO F**, tomando la ecuación de la recta se determinó la concentración en células/ml obteniendo como resultado las siguientes gráficas, las cuales permiten relacionar las curvas de crecimiento obtenidas en el anterior apartado con la concentración celular. Cabe aclarar, que se realizaron tres replicas con el fin de eliminar el error experimental y el sesgo en los datos.

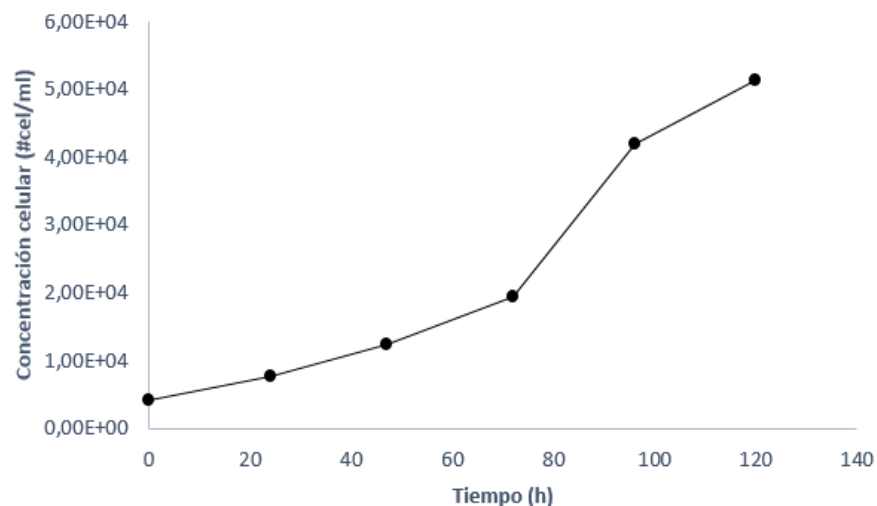
**Gráfica 12.** Curva de calibración cepa 6.



**Fuente:** elaboración Propia.

Se puede observar que la concentración máxima en células/ml tiene un valor de  $6 \times 10^4$ , este valor corresponde a la fase exponencial del microorganismo. Se presume que este podría ser el punto de saturación de la cepa bacteriana en el medio; sin embargo, el crecimiento estuvo limitado por el sistema de agitación (apartado 3.2.5), este fue intermitente a lo largo de la operación debido a que tendía a fallar, lo cual se tradujo en la precipitación de las células y una baja tasa de crecimiento o duplicación. De igual manera, la fase estacionaria no se evidencio; puesto que, los cambios de las condiciones ambientales no fomentaron el crecimiento celular dando lugar a la pérdida de viabilidad de la cepa microbiana.

**Gráfica 13.** Curva de calibración microalga *Chlorella vulgaris* sp.



**Fuente:** elaboración propia.

Por último, la microalga *Chlorella vulgaris* sp., obtuvo su concentración máxima celular tras un tiempo de 120 horas producto de la tasa de duplicación, ya que



requieren más tiempo en duplicarse en comparación con las bacterias. Se podría inferir que igual manera la fase de latencia estuvo condicionada por el funcionamiento del sistema de agitación lo que condujo a la sedimentación. Otra de las posibles causantes es que el sistema de iluminación también tuvo fallas a lo largo del proceso.

#### 4. ESTABLECIMIENTO DE PROPORCIONES DE INÓCULO ALGA-BACTERIA

En el presente capítulo se describe el procedimiento experimental para llegar a las proporciones de inóculo en las cuales se presumía que había una relación simbiótica en términos de intercambio de gases y crecimiento tanto global como individual de los microorganismos.

El procedimiento consta de tres pruebas las cuales difieren en las proporciones de inóculo de cada microorganismo, inicialmente se realizó un experimento para evaluar el correcto funcionamiento del sistema de incubación, haciendo referencia a la cámara de incubación y el sistema óptico de medida el cual abarca la recolección y almacenamiento de datos.

##### 4.1 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE INCUBACIÓN Y SISTEMA ÓPTICO DE MEDICIÓN

Previamente a iniciar los experimentos que se plantean en este capítulo se verificó el comportamiento del sistema. Para esto se inocularon los tres biorreactores con una densidad óptica de 0.8 de biomasa microalgal durante 5 días; donde es posible monitorear las fases de crecimiento del microorganismo y de igual manera detectar posibles anomalías en el funcionamiento del sensor óptico, la cámara de incubación y el sistema de agitación.

**Figura 39.** Cámara de incubación con sistema de agitación magnético y sensores de medida.



Fuente: elaboración propia.

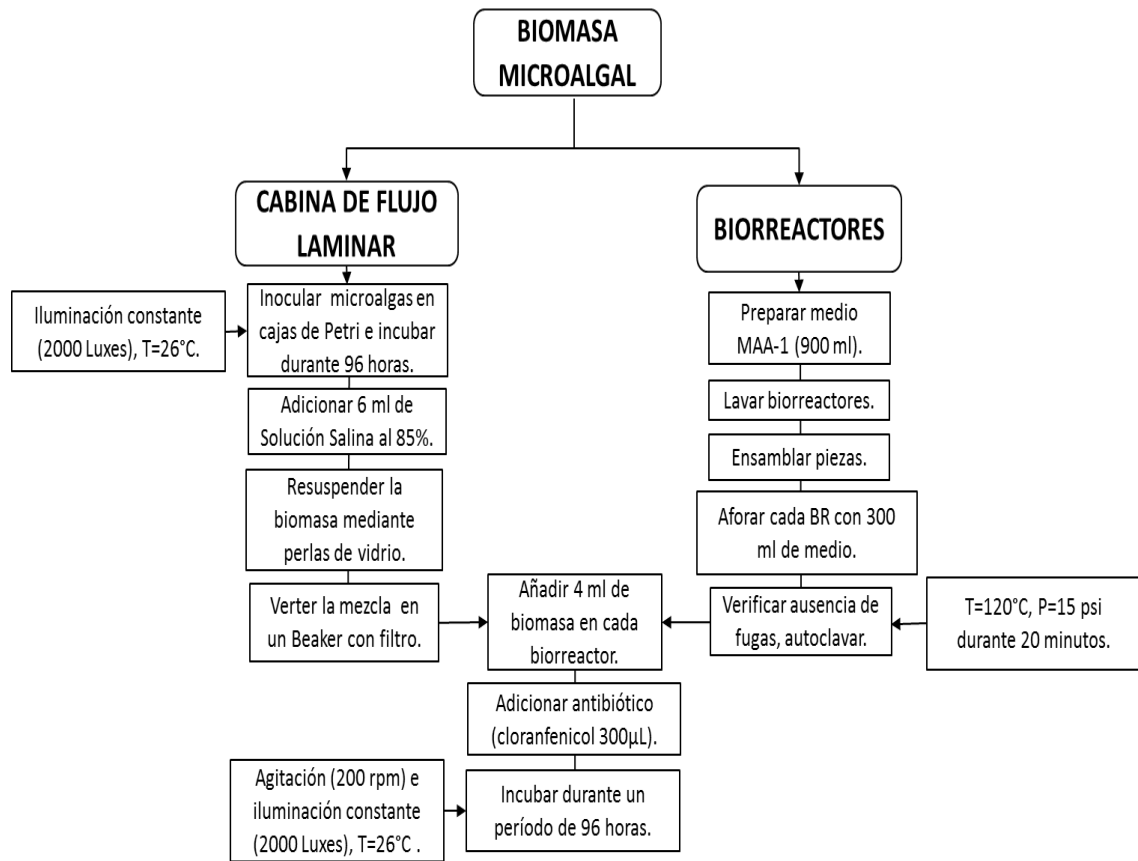
## 4.2 PROTOCOLOS PARA INOCULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Previamente a la inoculación conjunta de los microorganismos fue necesario obtener una cantidad considerable de biomasa de cada uno con el fin de ajustar la densidad óptica requerida, para lograr esto, cada microorganismo fue inoculado en el medio de cultivo en el que presento el mayor crecimiento. Es importante resaltar que en cada proceso realizado se tuvo en cuenta el protocolo de esterilidad mencionado en la sección 3.2.1.

Como se mencionó, después del proceso de esterilización de todos los materiales y medios necesarios, y del sometimiento de los mismos a irradiación de rayos UV en la cabina de flujo de laminar, se procede a seguir el mismo procedimiento para cada experimento el cual se describe en los dos siguientes apartados.

**4.2.1 Preparación de microalgas.** En primer lugar, por cada experimento se requieren de una a dos cajas de Petri, con microalgas previamente inoculadas, con ayuda de una micropipeta y puntas estériles se adiciona a cada caja 6 ml de solución salina al 85 % y también perlas de vidrio, se procede a agitar para remover la biomasa algal que contenga cada caja, luego se vierten en un recipiente que posee una gasa que funciona como filtro para separar las perlas del líquido. Por otro lado, se tienen los biorreactores que ya contienen el medio en el cual se inocular (MAA-1), con precaución se realiza la apertura de la cubierta del BR para inocular el medio líquido contenido con las microalgas en cantidades iguales, es decir 4 ml, en cada biorreactor. Inmediatamente después del paso anterior se adiciona el antibiótico siguiendo el protocolo nombrado en la sección 3.2.6.1.2. Se procede a realizar el sello de las cubiertas; evitando así la exposición al medio ambiente o cualquier tipo de contaminación y posibles derrames del medio. Finalmente, los biorreactores son llevados a la cámara de incubación. Se dejan crecer durante cuatro días para obtener una biomasa significativa a las condiciones que tiene estandarizada la cámara de incubación (sección 2.2), tales como, agitación (200 rpm) e iluminación constante (2000 Luxes) y una temperatura de 26°C. Finalizada la fase de incubación se procede a realizar el montaje del cultivo mixto.

**Figura 40.** Preparación de las microalgas.

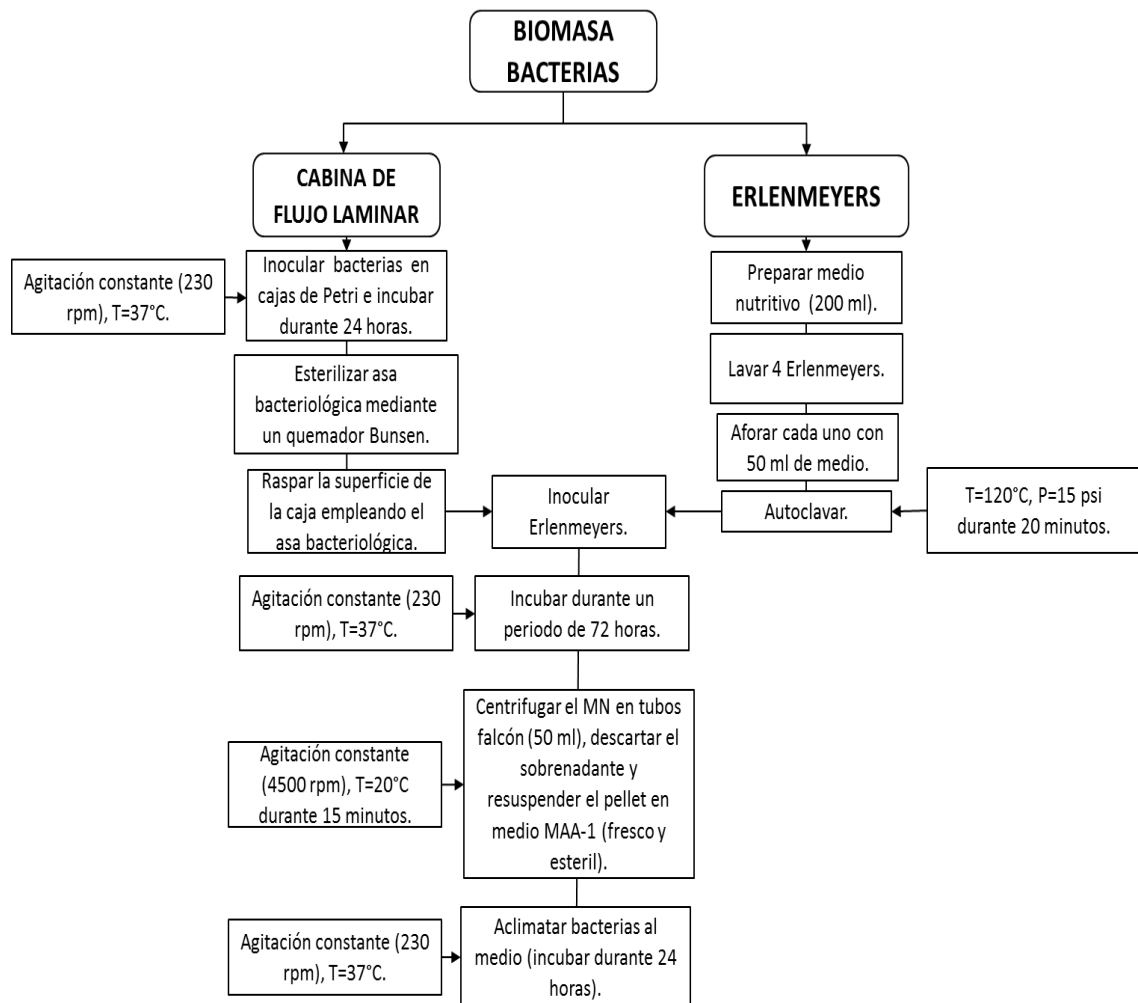


**Fuente:** elaboración propia.

**4.2.2 Preparación de la cepa bacteriana.** Debido a que las bacterias presentaron mejor crecimiento en medio nutritivo (MN), se procede a realizar un inóculo previo en este, para obtener una mayor cantidad de biomasa. Inicialmente, se tienen cuatro Erlenmeyers de 250 ml aforados con un volumen de medio de 50 ml cada uno, con el fin de que las cepas tengan disponibilidad de oxígeno para poder efectuar la oxidación del sustrato. Posteriormente, con ayuda de un asa bacteriológica se inocula cada Erlenmeyer con la cepa (se debe procurar que la concentración del inóculo sea alta, ya que la productividad está estrechamente relacionada con esta variable), se agita suavemente de manera circular para distribuir la muestra en todo el medio. Finalmente, se llevan a una incubadora marca Memmert modelo 100-800, a una temperatura de 37°C con agitación constante (230 rpm) durante tres días.

Concluido el periodo de incubación, se procede inicialmente a centrifugar en tubos falcón de 50 ml el medio de cultivo líquido de bacterias durante 15 minutos a 4500 rpm y una temperatura de 20°C, se descarta el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende en un medio de cultivo fresco y estéril MAA-1, con el fin de aclimatarlas al mismo, en esta etapa se les permite adaptar su metabolismo en un tiempo de 24 horas. Este procedimiento se realiza un día antes de la inoculación de los microorganismos en conjunto.

**Figura 41.** Preparación de la cepa bacteriana.



**Fuente:** elaboración propia.

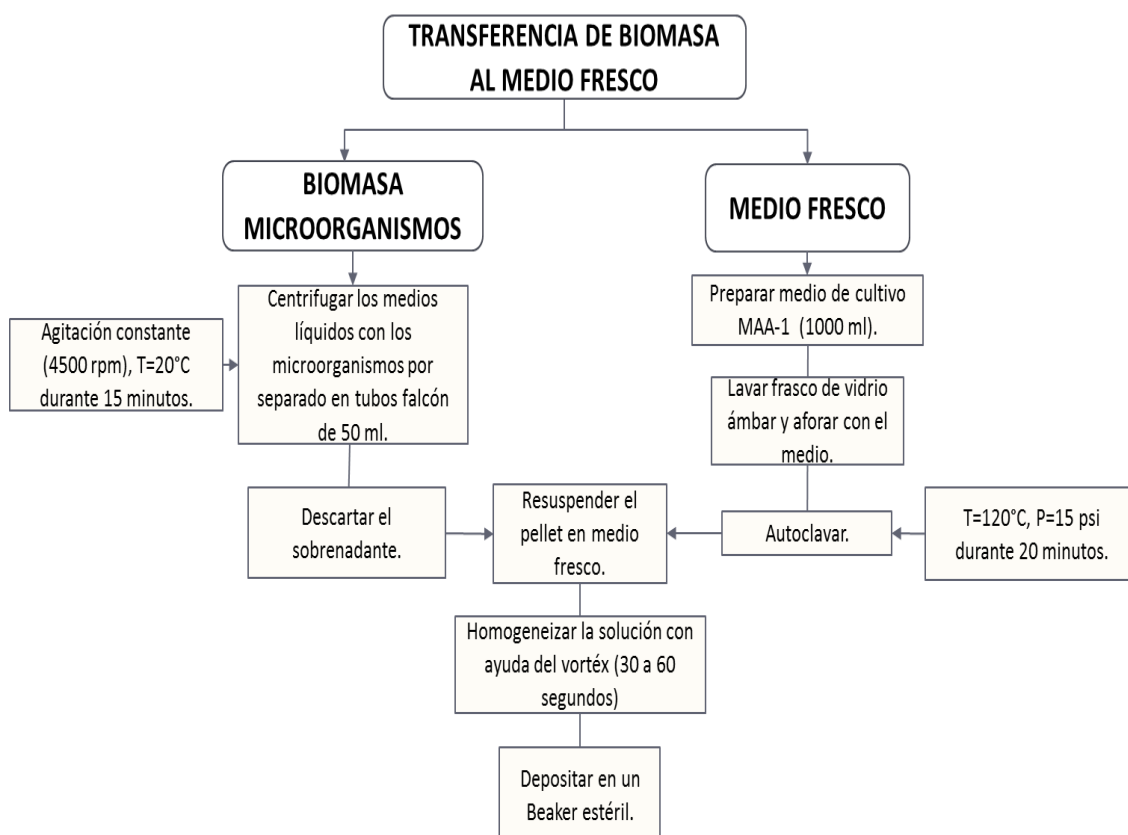
**4.2.3 Inoculación de los cultivos mixtos.** El inóculo de los cultivos mixtos necesarios para desarrollar cada experimento se preparó a partir de la biomasa de cada microorganismo, teniendo en cuenta el procedimiento que se describe a continuación.

**4.2.3.1 Verificación de axenicidad de cultivos.** Antes de empezar la inoculación de los cultivos mixtos se debe verificar que las características macroscópicas y microscópicas de cada microorganismo coincidan con las descritas en el apartado 3.6.1.1.1, esto se realizó mediante técnicas de observación en microscopia y cualitativamente mediante la observación de la apariencia de las colonias. La contaminación de los cultivos se puede ver afectada por diversos factores (Operador, manipulación, atmósfera, superficies, utensilios, medios y soluciones); por tanto, es recomendable seguir los protocolos que estén en función de un ambiente estéril (sección 3.2.1.). En caso de que no se halle puro alguno de los dos microorganismos se vuelve a iniciar el procedimiento de preparación de los mismos.

**4.2.3.2 Método de inoculación.** Este proceso implica asociar ambos microorganismos en un mismo medio de cultivo (MAA-1), los cuales han sido previamente inoculados e incubados hasta obtener una densidad óptica cercana a la saturación o la población máxima del cultivo. En los siguientes apartados se esclarece de forma puntual la metodología llevada a cabo en el establecimiento del consorcio. Es importante resaltar que el material implicado ha sido previamente sometido a procesos de esterilización, con el fin de disminuir al máximo cualquier tipo de contaminante que pueda afectar el proceso.

➤ **Transferencia de biomasa individual a medio fresco.** Para empezar con la inoculación se requiere primero que todo, transferir la biomasa de cada microorganismo a un medio fresco, puesto que en el tiempo de crecimiento de su biomasa es muy probable que no se disponga de los nutrientes necesarios para que puedan crecer óptimamente, para esto se cuenta con un 1 litro de medio previamente preparado y esterilizado. Para realizar este proceso se lleva a cabo una centrifugación diferencial o Pelleting de la siguiente manera, se añade el medio con biomasa de cada microorganismo por separado en tubos falcón, se lleva a una centrífuga a 4500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 20°C, concluido dicho tiempo se procede descartar el sobrenadante y se resuspende el pellet obtenido en el medio fresco mediante agitación suave en vórtex depositándolo en un Beaker estéril.

**Figura 42.** Transferencia de biomasa individual al medio fresco.

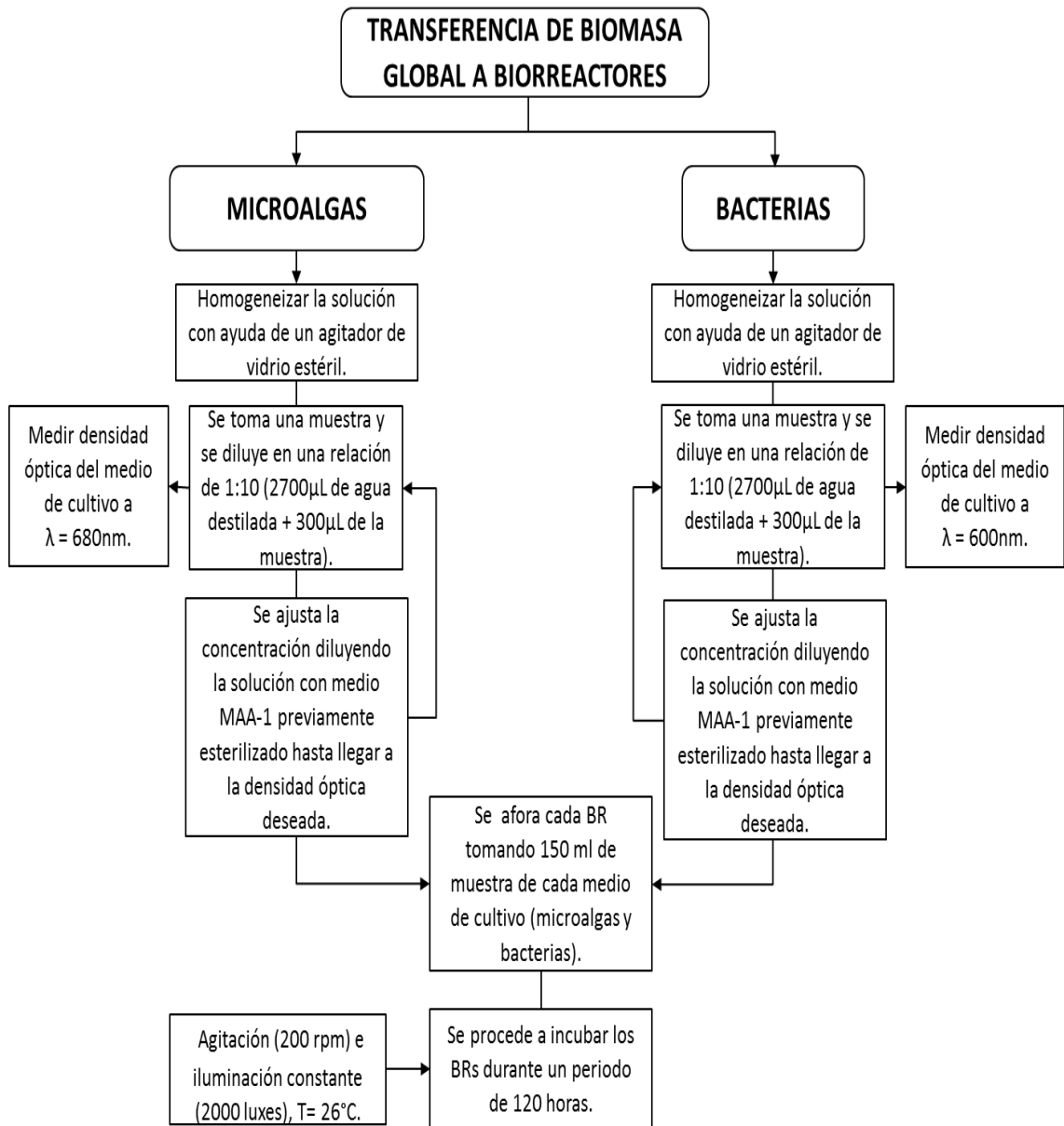


**Fuente:** elaboración propia.

➤ **Transferencia de biomasa global a biorreactores.** La capacidad máxima de cada prototipo comprende un volumen total de 300 ml. Cada experimento es inoculado con proporciones iguales en volumen, es decir 150 ml de medio líquido fresco MAA-1 con biomasa microalgal y 150 ml de medio líquido fresco MAA-1 con bacterias en suspensión. La transferencia global se realiza de la siguiente manera, se disponen de dos Beakers (cada uno contiene el medio inoculado con cada microorganismo por separado), se procede a medir la densidad óptica de los medios de cultivo con el fin de ajustar la concentración en términos de absorbancia. Debido a que las soluciones se encuentran concentradas se procede a diluirlas mediante el medio MAA-1 previamente esterilizado; hasta llegar a la densidad óptica deseada (apartado 4.7). Finalmente, los biorreactores son inoculados e incubados a una temperatura de 26°C, agitación (200 rpm) e iluminación (2000 Luxes) constante durante 5 días.

• **Ajuste de concentración de cada microorganismo.** Para realizar el ajuste de la concentración de los microorganismos por separado se requiere 1 litro de medio fresco (MAA-1) y 450 ml de la biomasa (cantidad mínima requerida para aforar los 3 biorreactores) de cada microorganismo. En primera instancia se toma una muestra de cada Beaker para poder realizar lectura inicial de la densidad óptica en un espectrofotómetro, una vez obtenido el resultado y de acuerdo a la cantidad de cada microorganismo requerido para cada experimento se decide si es necesario adicionar más medio fresco o si se requiere añadir más cantidad de biomasa, de esta manera se toma una nueva muestra para leerla nuevamente y se realiza este procedimiento hasta que se ajuste al valor deseado.

**Figura 43.** Transferencia y ajuste de biomasa global a biorreactores.



**Fuente:** elaboración propia.

**4.2.4 Muestreo en el biorreactor.** Con el fin de efectuar las cuantificaciones que se describirán en los siguientes apartados, se debe realizar un muestreo periódico. Este se efectúa mediante un sistema implementado en la cubierta del reactor, el cual permite tomar muestras de forma rápida y sencilla. Este proceso se realiza con ayuda de jeringas de 5 ml previamente esterilizadas, se usa una jeringa por cada biorreactor, se extraen 2 ml de cada uno, y posteriormente, se introducen a tubos falcón de 15 ml estériles, con el fin de poder ser usados para realizar diluciones que se requieran.



**Figura 44.** Sistema de recolección de muestras.

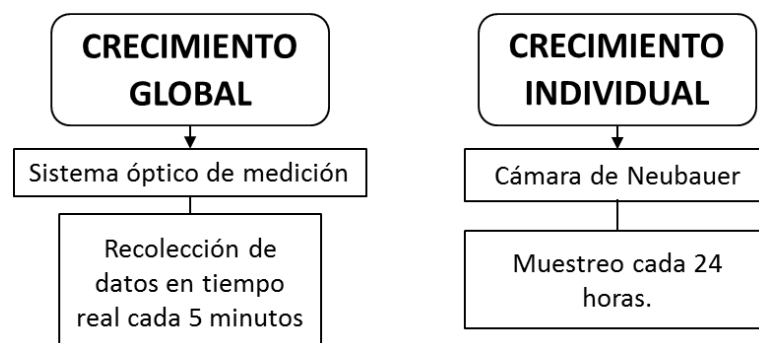


**Fuente:** elaboración propia.

### 4.3 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA DE MICROORGANISMOS

Se emplearon dos técnicas de cuantificación de biomasa con el fin de observar el comportamiento tanto global como individual de ambos microorganismos. Para realizar seguimiento global como ya se ha mencionado se dispuso del sistema óptico de medición construido para recolectar datos en tiempo real cada 5 minutos. Por otro lado, se utilizó una cámara de Neubauer mediante conteos cada 24 horas. A partir de esta cuantificación se logra iniciar el análisis los resultados de los mismos.

**Figura 45.** Cuantificación global e individual de los microorganismos.



**Fuente:** elaboración propia.

**4.3.1 Curvas de calibración.** Como se mencionó en el apartado 2.3 el sensor óptico emite una señal que es proporcional a la cantidad de luz que recibe; sin embargo, cada sensor requiere una calibración. Por otra parte, se requiere realizar una curva que permita relacionar la concentración en cel/ml con la conversión de la señal en absorbancia mediante el espectrofotómetro. En los

siguientes apartados se evidencia la metodología llevada cabo para construcción de las curvas de calibración.

**4.3.1.1 Curvas de calibración señal vs absorbancia.** La longitud de onda del sensor óptico de medida es única y cercana a 680 nm. Sin embargo, ese valor se toma como una referencia puesto que el sensor puede ser calibrado a diferentes longitudes de onda y establecer correlaciones lineales con el espectrofotómetro<sup>129</sup>. Como se mencionaba en el apartado 2.3, los sensores operan bajo rangos diferentes; por tanto, cada uno requiere una calibración. Esta es realizada de la siguiente manera:

- I. Tras finalizar el periodo de incubación de los BRs, en un Beaker estéril se procede a mezclar y homogeneizar la biomasa final obtenida.
- II. Se aforan los biorreactores con la biomasa que ha sido previamente mezclada y se ensamblan los sensores ópticos sobre las celdas de medida (downcomer).
- III. Se introducen los BRs en la cámara de incubación durante 15 minutos, con el propósito de obtener 3 datos de la señal para una misma muestra mediante el sensor óptico. Se mantienen las condiciones de operación del proceso: una temperatura de 26°C, agitación (200 rpm) e iluminación constante (2000 Luxes).
- IV. Transcurridos los 15 minutos se toma una muestra de cada BR. Se mide en el espectrofotómetro a 720 nm, diluyendo la muestra 1:10 (2700 µL de agua destilada + 300 µL de la muestra).
- V. Se procede a retirar los BRs de la cámara y se realiza una dilución de 1:2, es decir, se remueve el 50% de la biomasa total (150 ml) de cada uno y se afora con medio MAA-1 (fresco) hasta completar el volumen total (300 ml).
- VI. Repetir pasos III y IV.
- VII. Nuevamente se retiran los BRs de la cámara y se procede hacer una dilución de 2:5, es decir, se remueve el 20% de la biomasa total (60 ml) de cada uno y se afora con medio MAA-1 (fresco) hasta completar el volumen total (300 ml).
- VIII. Repetir pasos III y IV.

La calibración de los sensores debe realizarse con mínimo dos puntos, esto reside en que el comportamiento de los sensores no corresponde a una familia de rectas<sup>130</sup>.

---

<sup>129</sup> MARROQUIN, Jorge. Op. Cit., p. 58.

<sup>130</sup> *Ibíd.*, p. 69.

**4.3.1.2 Curvas de calibración absorbancia vs concentración celular.** Puesto que cada cultivo mixto se comporta de manera diferente en términos de concentración celular. Principalmente, se requiere realizar un muestreo cada 24 horas en cada experimento, con el fin de obtener una relación proporcional entre la concentración de cada microorganismo y la señal emitida por el sensor óptico. Lo anterior se explica detalladamente en el apartado 4.3.3.

Esta calibración se realiza tomando la correlación lineal presentada en la gráfica 15 y la concentración celular en cel/ml de los microorganismos, esta concentración se obtiene a partir del recuento celular empleando como método de cuantificación directo la cámara Neubauer, el cual se esclarece en el apartado 4.3.3.1.

**4.3.2 Crecimiento global de microorganismos.** Para realizar el monitoreo global del crecimiento de los microorganismos, por medio del sistema óptico de medición se recolectan y almacenan los datos en tiempo real, se configura para que tome los datos cada 5 minutos; sin embargo, dado a que se obtienen bastantes datos se decide sólo graficar datos cada 30 minutos. Además, simultáneamente se hizo un muestreo como se indica en el apartado 4.2.4 con el fin de leer la densidad óptica cada 24 horas.

**4.3.3 Crecimiento individual de microorganismos.** En los cultivos mixtos de cualquier tipo, cada microorganismo posee su propia curva de crecimiento donde la posición y la forma de una curva de crecimiento en el sistema, sobre un rango de tiempo, depende del metabolismo de cada microorganismo, la disponibilidad de los nutrientes y de las condiciones de crecimiento a las cuales se someten<sup>131</sup>, motivo por el cual se realizó una cuantificación individual para cada microorganismo en cada experimento realizando un muestreo cada 24 horas y simultáneamente al apartado anterior, como bien se explica en el literal 4.2.4.

Los conteos celulares individuales se realizaron mediante una cámara de Neubauer y un microscopio, se realizó la visualización de las microalgas en el objetivo 40x y el de las bacterias en el objetivo 100x. A continuación, se presentan los protocolos diseñados para efectuar el procedimiento en cada experimento.

**4.3.3.1 Protocolo para realizar conteo celular individual.** Después de realizar el muestreo siguiendo el procedimiento de la sección 4.2.4, se procede a observar una muestra de cualquier biorreactor para evaluar la cantidad de diluciones a realizar con el fin de poder realizar un mejor conteo celular para cada muestra.

La cámara Neubauer es un instrumento utilizado principalmente en medicina y además también es usado en microbiología para realizar recuento de células en medio líquido, como se observa en la figura 47 dicha cámara posee 9 cuadros, cada uno con un área de 1 mm<sup>2</sup>, en el cuadro central se realizó el conteo celular,

---

<sup>131</sup> MOELLER, Gabriela y TOMASINI., 'Microbiología de lodos activados', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2019, p. 162. <<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>>.

por lo cual, teniendo en cuenta esto, cada cuadro grande contiene 25 cuadros medianos los cuales a su vez, cada uno está dividido en 16 cuadro pequeños que tienen un área de 0,0025 mm<sup>2</sup>, generando un total de 400 cuadros pequeños, por lo cual se tiene que el área de cada cuadro grande es de 1 mm<sup>2</sup>, por otro lado su volumen está dado por la multiplicación entre la profundidad (0,1 mm) y el área donde se realiza el conteo<sup>132</sup>. En este caso, para obtener resultados más rigurosos se realiza el conteo en los 25 cuadrantes centrales, por tanto, el volumen será 0.1mm<sup>2</sup>, a continuación, se presenta el cálculo descrito.

El procedimiento para hallar el volumen donde se ingresa la muestra, primero se halla la cantidad de cuadros pequeños que hay en un cuadro grande, así:

**Ecuación 2.** Determinación de cuadros pequeños totales.

$$\text{Cuadros pequeños} = 25 \times 16 = 400$$

**Fuente:** MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. Scientia Iranica. 2013., p. 160., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

Después de hallar los cuadros presentes en un cuadro grande se procede a hallar el área del mismo:

**Ecuación 3.** Determinación área de cuadros totales.

$$\text{Área} = 400 \times 0,0025\text{mm}^2 = 1\text{mm}^2$$

**Fuente:** MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. Scientia Iranica. 2013., p. 160., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

Finalmente, se realiza la multiplicación del área obtenida del cuadro grande con la profundidad de la cámara la cual es de 0,1 mm<sup>2</sup> para obtener el volumen total donde se lee cada muestra.

**Ecuación 4.** Determinación del volumen de muestreos.

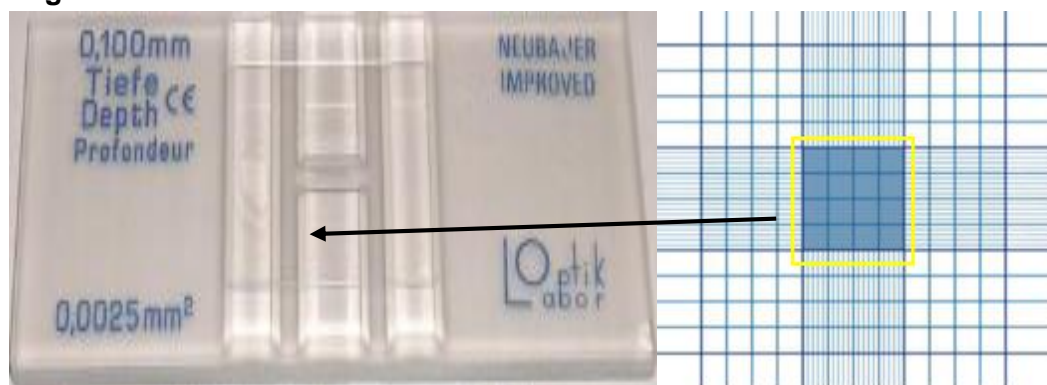
$$\text{Volumen} = \text{Área} \times \text{Profundidad} = 1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm}^2 = 0.1\text{mm}^3$$

**Fuente:** Elaboración propia con base en MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. Scientia Iranica. 2013., p. 607–610., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

---

<sup>132</sup> MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. Scientia Iranica. 2013., p. 160., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

**Figura 46.** Cámara Neubauer.



**Fuente:** Elaboración propia con base en MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. *Scientia Iranica*. 2013., p. 607–610., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

Todos los conteos celulares se realizaron en los 25 cuadros señalados en la figura 47, empleando la técnica de observación en zigzag de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, para tener más practicidad en el conteo evitando al máximo la probabilidad de obtener errores en el mismo.

Para colocar la muestra en la cámara, primero es necesario poner un portaobjetos sobre donde se encuentra alojada la cuadrícula, se realiza la dilución respectiva con solución salina al 85% y se añaden por medio de una micropipeta de 20  $\mu\text{L}$ , finalmente se observa en el microscopio con el objetivo que se requiera de acuerdo al microorganismo a observar.

**4.3.3.2 Cálculo de la concentración de microorganismos.** Para realizar los cálculos correspondientes a la cantidad de células que hay en cada mililitro de las muestras, se realiza el siguiente procedimiento: se deben hallar todos los valores que se requieren en la ecuación 5, para ello inicialmente se halla el volumen el cual es el que va a contener la muestra dentro de la cámara, y los demás valores se obtienen teniendo en cuenta tanto el factor de dilución empleado como las células contadas en los 25 cuadrantes.

**Ecuación 5.** Concentración de células.

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{Células}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Células contadas} \times \text{Factor de Dilución}}{\text{Volumen}}$$

**Fuente:** Elaboración propia con base en MAGHSOODI, Vida; KAZEMI, Akhtar; NAHID, Parvin; YAGHMAEI, Soheila y SABZEVARI, Mohammad. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. *Scientia Iranica*. 2013., p. 607–610., 10.1016/j.scient.2013.01.007.

#### 4.4 TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA BASADA EN NEGRO DE SUDÁN B

Las técnicas para cuantificar PHA requieren equipos y procesos rigurosos. Por tanto, el siguiente estudio “Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye” propone una nueva técnica, la cual tiene como principio el uso de tinte negro de sudan, esta alternativa ofrece una solución rápida y precisa a la hora de identificar o determinar el contenido intracelular extraíble de PHA. El principal problema de las técnicas tradicionales, radica en que exigen disposición de equipos costosos, largas jornadas de trabajo y el procesamiento de los datos puede tardar hasta 20 horas, lo que impide la toma de decisiones frente a elección y estudio de bacterias acumuladoras de PHA. Esta técnica contempla un simple protocolo basado en el empleo de instrumentos y reactivos comunes, requiere seguir simples pasos y resulta ser precisa en la predicción, procesamiento y lectura de las muestras. Una de sus grandes ventajas es que puede realizar utilizando un equipo básico de espectrometría, con tintes de bajo costo y reactivos que se encuentran comúnmente en cualquier laboratorio<sup>133</sup>. Este protocolo fue adaptado por el grupo GRESIA en sus procesos de investigación, dando lugar a una técnica que permite hacer mediciones relativas. La técnica se contempla en el **ANEXO G**.

#### 4.5 ECUACIÓN DIFERENCIAL LOGÍSTICA DE VERHULST

Esta ecuación modela el crecimiento poblacional de diferentes organismos. Contempla diferentes parámetros cinéticos como  $K$ , la cual hace referencia a la capacidad de carga del medio o bien a la constante de saturación, se define como el límite de individuos o células que una población puede tolerar. También se encuentra  $r$ , la cual se define como la velocidad o tasa de crecimiento y por último  $PO$  hace referencia a la población inicial<sup>134</sup>. La ecuación viene dada por la siguiente expresión:

**Ecuación 6.** Ecuación logística de Verhulst.

$$Y = (K * PO * \exp(r * X)) / (K + PO * (\exp(r * X) - 1))$$

**Fuente:** LÓPEZ José L., ‘La Ecuación Diferencial Logística ( o de Verhulst )’, 2011, p. 1–5., <<https://doi.org/10.3390/rs9050411>>.

El ajuste de esta ecuación se realizó empleando un método conocido como COBYLA que permite el ajuste por mínimo cuadrados y la minimización de los mínimos cuadrados. Este es programado en PYTHON (lenguaje de programación minimalista que permite el desarrollo de diferentes programas o

<sup>133</sup> PORRAS, Mauricio A., VILLAR, Marcelo A., y CUBITTO, María A., ‘Novel Spectrophotometric Technique for Rapid Determination of Extractable PHA Using Sudan Black Dye’, *Journal of Biotechnology*, 2017, p. 28–32 <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.012>>.

<sup>134</sup> LÓPEZ José L., ‘La Ecuación Diferencial Logística ( o de Verhulst )’, 2011, p. 1–5., <<https://doi.org/10.3390/rs9050411>>.

plataformas), contiene en su librería general un módulo que lleva por nombre SCIPY (biblioteca de algoritmos y herramientas matemáticas); esta posee una función de minimización llamada minimize en la cual se pueden elegir varios métodos, en este caso como ya se había mencionado es COBYLA. Se introducen los datos experimentales y la ecuación, este calcula datos de la ecuación compara con los experimentales haciendo las diferencias, eleva todas las diferencias al cuadrado y realiza la suma todo, esa suma es la que viene a ser minimizada. Este sistema resulta ideal para cualquier modelo matemático. Sin embargo, al contar con mayor cantidad de parámetros es más difícil que converja el modelo.

#### **4.6 PRUEBAS RESPIROMÉTRICAS**

El oxígeno disuelto es una medida indirecta del consumo del medio de cultivo, pues representa el oxígeno requerido por los microorganismos para que puedan oxidar la materia orgánica que dispongan. Estas pruebas se hicieron para la interpretación de los resultados obtenidos cuando los microorganismos se cultivan juntos. Además, se evaluó la capacidad mixotrófica<sup>135</sup> de las microalgas utilizadas para explicar este metabolismo en el intercambio de gases con bacterias.

Fue importante evaluar el comportamiento del oxígeno disuelto en los cultivos mixtos que se realizaron puesto que según algunos autores como Third cita observaron que, al limitar y al tener un exceso en el oxígeno en un medio, el rendimiento de la producción de PHA tenía un efecto, en ese caso específico una reducción de la concentración del OD limitaba el crecimiento celular y por el contrario un incremento permitía un aumento en la misma.

**4.6.1 Medición oxígeno disuelto (OD) de microorganismos.** Para evaluar las interacciones que se presentaron en los cultivos mixtos se realizaron dos pruebas previamente de cada microorganismo individualmente. La inoculación conjunta de ambos microorganismos se realizó en cada experimento.

#### **4.7 ESTABLECIMIENTO DE PROPORCIONES DE CULTIVO**

Para establecer las proporciones en las cuales se inocularon los microorganismos se decidió iniciar con un punto de partida el cual fue el resultado de la densidad óptica donde empezó la fase exponencial tanto de las bacterias como de las microalgas, posteriormente se decidió aumentar la cantidad de algas y simultáneamente disminuir la proporción de bacterias en los siguientes dos experimentos para evaluar el efecto que tenía en conjunto con la bacteria en términos de crecimiento tanto global como individual, la concentración del oxígeno disuelto y en términos de producción de PHA.

---

<sup>135</sup> SFORZA, Eleonora; PASTORE, Martina; SPAGNI, Alessandro y BERTUCCO, Alberto., Op. Cit., p.12.

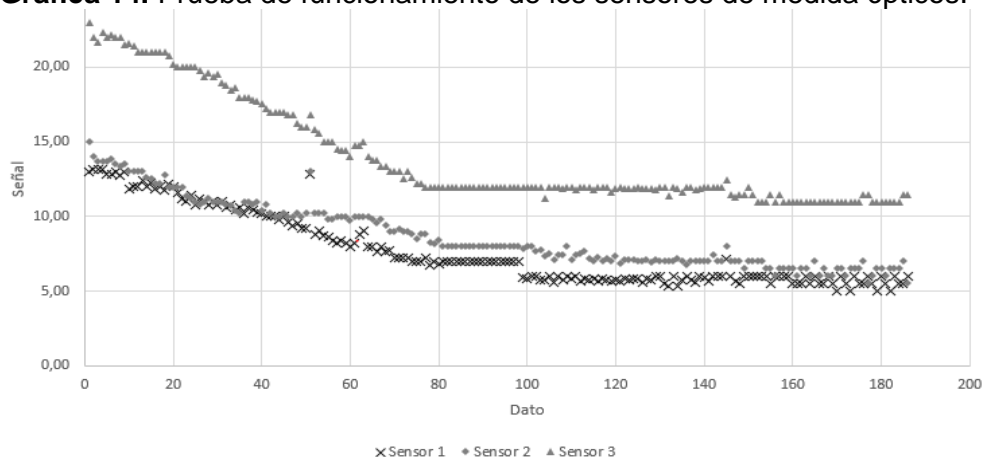
**4.7.1 Cálculo de porcentaje inicial de cada microorganismo.** Después de realizar la inoculación del cultivo mixto en cada experimento se procedió a realizar el conteo celular por parte de cada microorganismo siguiendo el protocolo de la sección 4.3.3, de esta manera por medio de la ecuación 5 se calculó el número de células por mililitro (células/ml) que se había inoculado por separado, se promediaron los resultados obtenidos por los tres biorreactores para finalmente hallar el porcentaje en el cual se inocularon inicialmente. Como se ha mencionado anteriormente se realizó conteo cada 24 horas, durante los 5 días de incubación, con el fin de obtener los valores de concentración obtenidos por cada microorganismo en cada día respectivo.

## 4.8 ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el presente capítulo donde se realiza un análisis en cuanto a crecimiento global e individual, producción de PHA, e intercambio de gases, con el fin de describir cada cultivo mixto y lograr establecer las proporciones adecuadas de inóculo.

**4.8.1 Prueba de funcionamiento del sistema de incubación y sistema óptico de medición.** Tras 5 días de incubación se rectificó el funcionamiento del sistema completo. Como se observa en la gráfica 14 los sensores ópticos funcionaron de una manera adecuada puesto que mostraron uniformidad en los resultados de la señal de cada sensor óptico. Por otro lado, el sistema de iluminación tuvo fallas en el circuito que lo controlaba, para lo cual se requirieron hacer ajustes en el mismo y posterior a esto poder iniciar las experimentaciones. La señal sin procesar de los sensores mide la transmitancia, la cual es una medida física de la relación de intensidad de luz incidente y transmitida al pasar por la muestra<sup>136</sup>.

**Gráfica 14.** Prueba de funcionamiento de los sensores de medida ópticos.



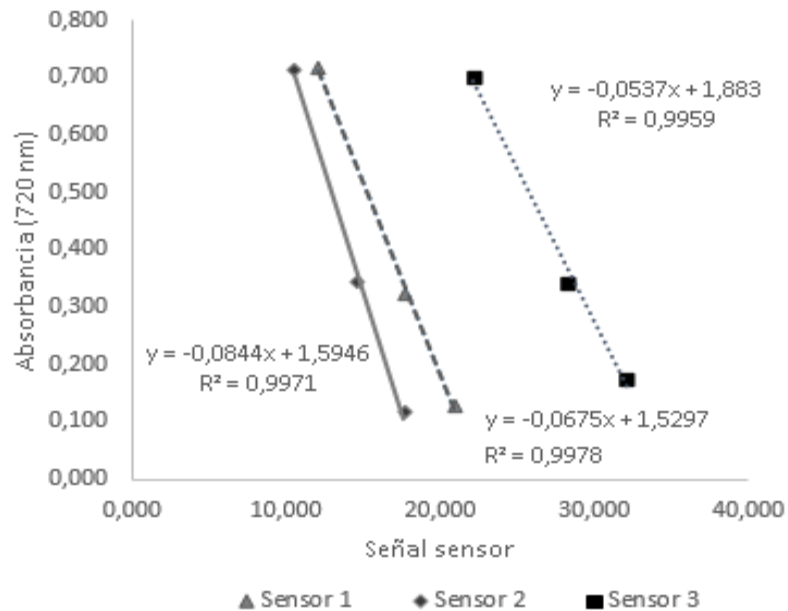
**Fuente:** elaboración propia.

<sup>136</sup> ABRIL, Nieves; BÁRCENA, Antonio J.; FERNÁNDEZ, Emilio; GÁLVAN, Aurora; JORRÍN, Jesús; PEINADO, José, et al. ' Espectrofotetría: Espectros de Absorción y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas', *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*. 2010., p. 1–8.



**4.8.2 Cinéticas de crecimiento.** Para la respectiva construcción de las curvas de crecimiento en función de un mismo tipo de dato, se requirieron realizar las curvas de calibración nombradas en el literal 4.3.1.

**Gráfica 15.** Curvas de calibración señal sensores ópticos vs absorbancia (720 nm).



Fuente: elaboración propia.

En los siguientes literales se podrán evidenciar los resultados de las curvas de crecimiento ya calibradas en términos de densidad óptica. Por otro lado, en el apartado **4.8.2.2** se describe el proceso que se llevó a cabo para obtener los valores de concentración celular (cel/ml) respecto al tiempo de los cultivos mixtos en cada experimento realizado.

**4.8.2.1 Crecimiento global de microorganismos.** A continuación, se muestran las curvas de crecimiento en términos de densidad óptica y de concentración celular (células/ml) para cada experimento junto con los parámetros cinéticos obtenidos del modelo matemático.

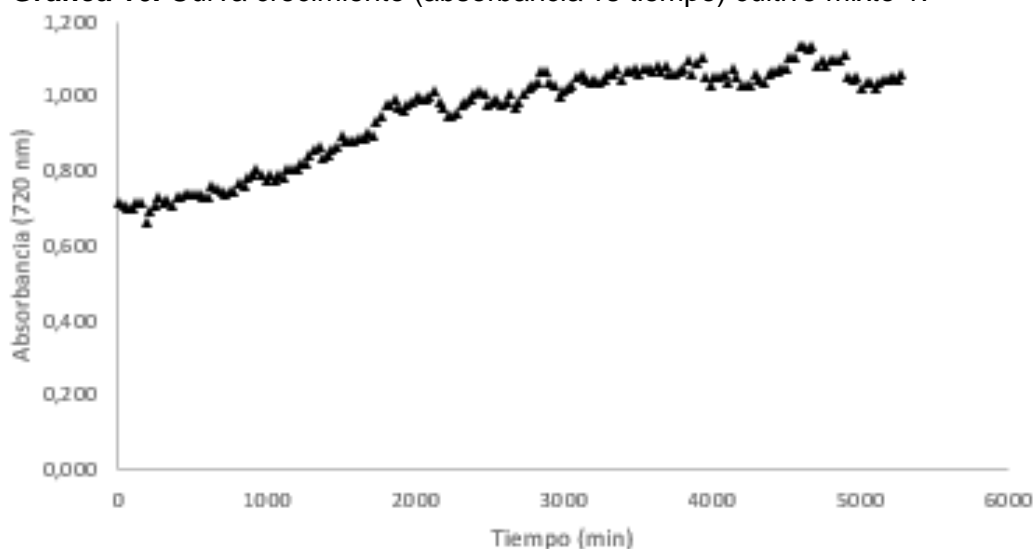
De acuerdo a la ecuación diferencial logística se determinó para cada experimento la población inicial ( $P_0$ ), la velocidad de crecimiento ( $r$ ) y la constante de saturación ( $K$ ),

**Tabla 23.** Parámetros cinéticos de experimentos realizados.

Experimento	$P_0$	$K$	$r$
1	0,56	1,19	1,11
2	No ajusta ecuación logística	No ajusta ecuación logística	No ajusta ecuación logística
3	0,68	1,12	0,86

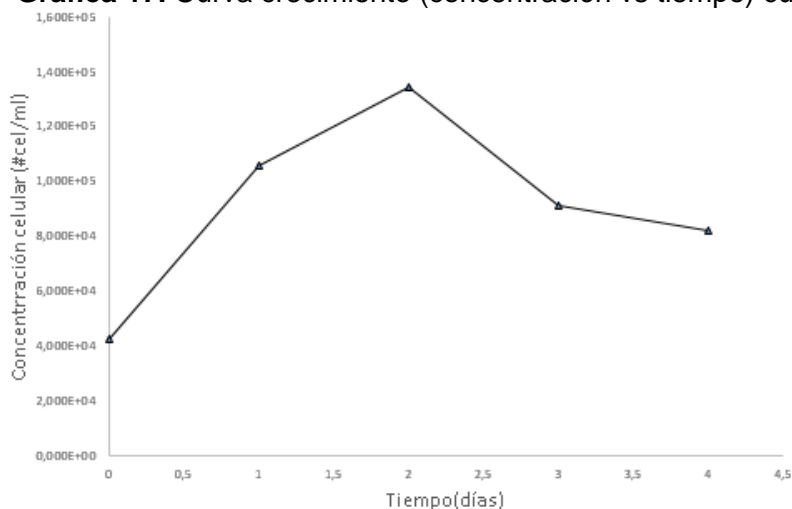
Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 16.** Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 1.



**Fuente:** elaboración propia.

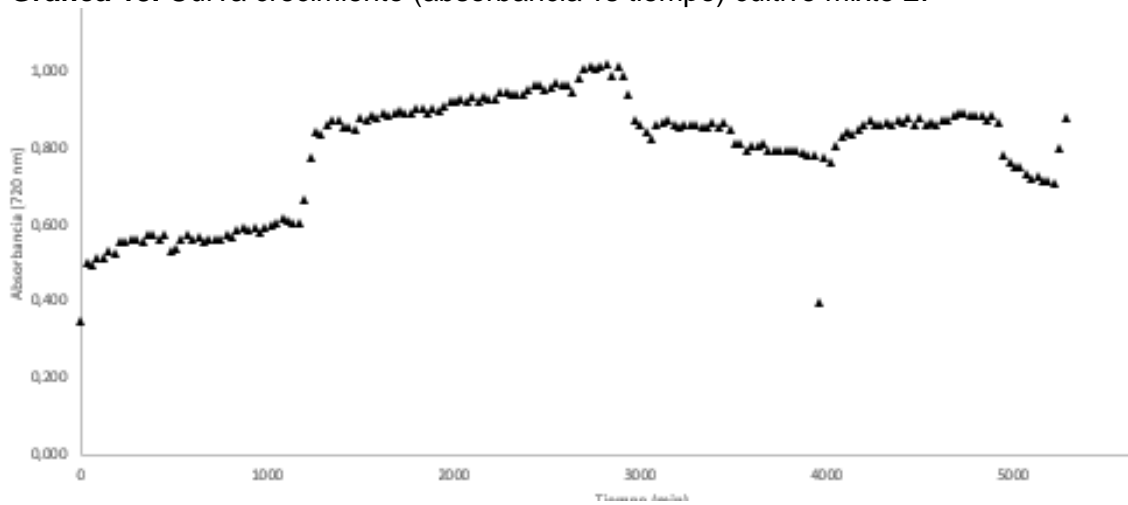
**Gráfica 17.** Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 1.



**Fuente:** elaboración propia.

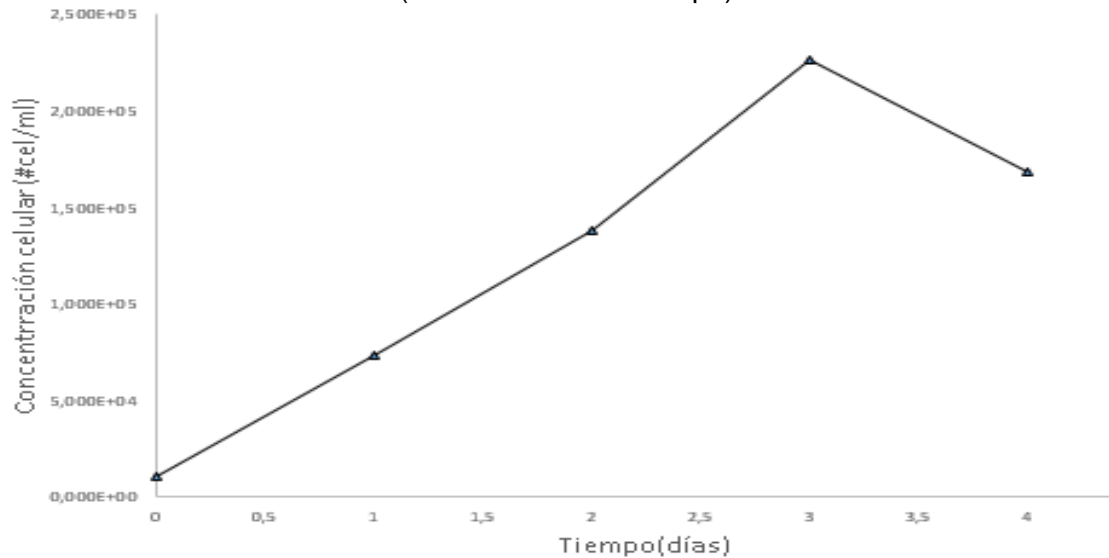
En la gráfica 16 referente al experimento del cultivo mixto 1 no es posible observar la fase de adaptación puesto que como se mencionó antes previamente los microorganismos fueron adaptados al medio de cultivo, su fase exponencial dura alrededor de 3000 minutos (dos días), después de este tiempo se aprecia la fase estacionaria donde los microorganismos dejan de crecer manteniendo un equilibrio entre el número de células nuevas con el número de células que mueren. No es posible evidenciar la fase de muerte lo cual indica que esta empieza después de transcurridos los dos días. Sin embargo, en la curva de crecimiento en términos de concentración celular (gráfica 17) si es posible evidenciar la fase de muerte. En comparación con el último experimento, su velocidad de crecimiento y constante de saturación fueron mayores, lo cual indica que, además que los microorganismos tienen un buen crecimiento juntos, la concentración máxima de estos es alta.

**Gráfica 18.** Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 2.



**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 19.** Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 2.



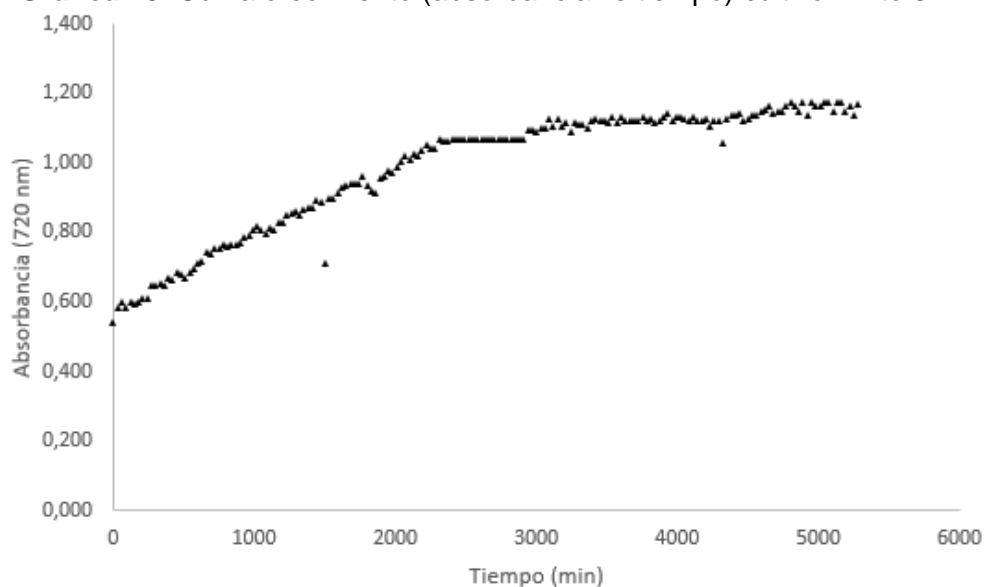
**Fuente:** elaboración propia.

En el caso del cultivo mixto 2 según la gráfica 18 es posible evidenciar que la fase de adaptación dura alrededor de 15 horas, lo cual indica que los microorganismos están asimilando los nutrientes y condiciones de crecimiento a su metabolismo, luego de este tiempo los microorganismos empiezan a duplicarse en su fase exponencial la cual se da en un rango de 2100 minutos (1,4 días), posterior a ello se inicia la fase estacionaria la cual abarca aproximadamente 15 horas, esta fase se caracteriza por un valor constante del número de microorganismos a medida que la tasa de crecimiento se iguala con la tasa de muerte bacteriana, concluido dicho tiempo se inicia la fase de declinación.

Los modelos de crecimiento comunes se ajustan a un comportamiento general de crecimiento exponencial seguido de una desaceleración asintótica. El modelo de Verhulst puede incluir también una fase de latencia al principio del crecimiento

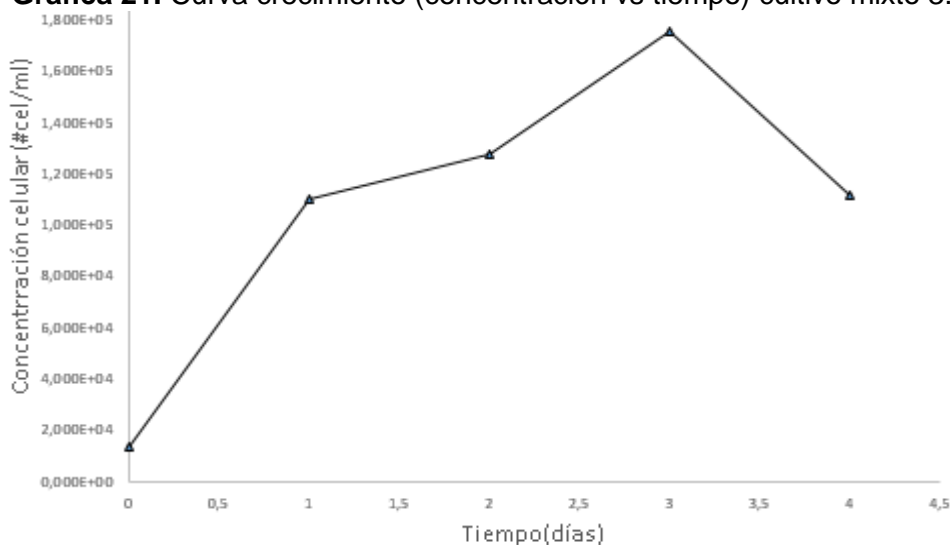
(como una S alargada). Otros modelos pueden ajustarse a una fase de muerte después del desaceleramiento asintótico. Cualquier comportamiento diferente a los descritos no podrá ser ajustado a los modelos tradicionales. El segundo experimento dista mucho de lo que pueden ajustar los modelos tradicionales. Se presume la presencia de 3 estados estables, tal vez determinados por la concentración de sustrato. Al principio las células apenas se adaptarían al sustrato y hay relativamente una pequeña cantidad. Luego se equilibran en una concentración relativamente alta porque hay sustrato suficiente todavía y al final vuelve a descender la densidad celular porque el sustrato empezaría a escasear.

**Gráfica 20.** Curva crecimiento (absorbancia vs tiempo) cultivo mixto 3.



**Fuente:** elaboración propia.

**Gráfica 21.** Curva crecimiento (concentración vs tiempo) cultivo mixto 3.



**Fuente:** elaboración propia.

En este caso del cultivo 3 (gráfica 19) se puede ver la fase exponencial con una duración de aproximadamente 141 minutos, enseguida se observa que se llega

al inicio de la fase estacionaria donde los microorganismos se mantienen estables durante alrededor de tres días. En la gráfica 20 se puede ver la fase de muerte la cual empieza transcurridos los tres días.

La velocidad de crecimiento y constante de saturación fueron menores que en el experimento 1 indicando que el comportamiento en conjunto de estos microorganismos no fue tan favorable respecto a los otros dos.

**4.8.2.2 Crecimiento individual de microorganismos.** Para la construcción de las curvas de crecimiento en función del tiempo se requirió seguir el procedimiento del apartado 4.3.3. En el desarrollo de cada experimento diariamente se halló la concentración de cada muestra. Se procede a realizar el cálculo respectivo con la ecuación 5, los resultados obtenidos diarios y de cada experimento se detallan en el presente apartado.

Las curvas de crecimiento global dan una idea de lo que está sucediendo en cada sistema de cultivo mixto, sin embargo, no representa el número de células individuales de cada cepa (microalga y bacteria); por lo cual, los resultados se complementaron mediante conteos celulares individuales como se mencionó anteriormente en Cámara Neubauer.

A continuación, se realiza una muestra de cálculo correspondiente al día final del experimento 1.

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos individualmente por parte de cada biorreactor, realizando el conteo siguiendo el protocolo de la sección 4.3.3 para cada microorganismo.

**Tabla 20.** Cantidad de células contadas en Cámara Neubauer.

Tiempo (días)	Bacterias (células)			Algas (células)			
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	
0		73	73	73	33	33	33
1		641	518	525	188	158	180
2		1195	955	952	333	312	392
3		2200	1752	1548	394	408	445
4		1324	1241	1000	481	474	545

**Fuente:** elaboración propia.

Con los resultados obtenidos se procede a realizar un promedio entre los tres biorreactores, de cada microorganismo.

**Tabla 21.** Promedio de cantidad de células.

Tiempo (días)	Bacterias (células)	Algas (células)
0	73,33	33,33
1	561,33	175,33
2	1034	345,67
3	1853	416
4	1188,33	500

**Fuente:** elaboración propia.

Con el número obtenido de células se halla la concentración celular por parte de cada microorganismo, como se muestra a continuación.

$$\text{Concentración bacterias} = \frac{1188 \text{ células} \times 10}{0,1 \text{ ml}} = 1,188 \times 10^5 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

$$\text{Concentración microalgas} = \frac{500 \text{ células} \times 10}{0,1 \text{ ml}} = 5,0 \times 10^4 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

De la misma manera se compilan todos los datos, como se puede observar en la tabla 26. Para obtener un comportamiento del crecimiento de la población como se muestra en la gráfica 20.

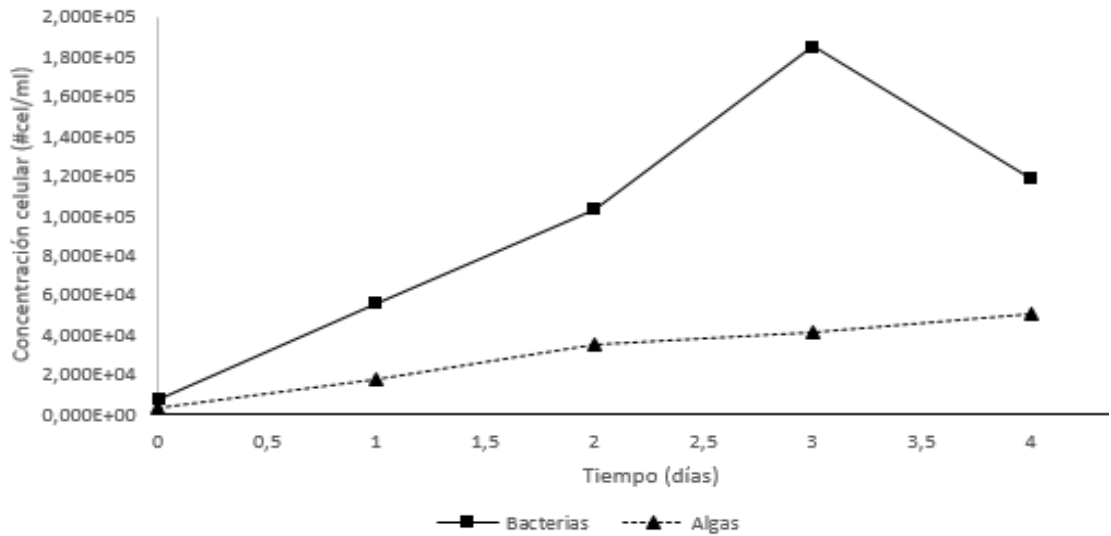
**Tabla 26.** Concentración celular de microorganismos por separado.

Tiempo (días)	Bacterias (células/ml)	Algas (células/ml)
0	7,33E+03	3,33E+03
1	5,61E+04	1,75E+04
2	1,03E+05	3,46E+04
3	1,85E+05	4,16E+04
4	1,19E+05	5,00E+04

**Fuente:** elaboración propia.

Para encontrar el porcentaje en el cual se inocula cada microorganismo, el resultado en el día 0 de concentración de cada uno es sumado para obtener el total de la población, para efectos del presente experimento, se obtiene una cantidad total de  $1,07 \times 10^4$  cel/ml, permitiendo hallar los porcentajes en los que se encuentra cada cepa, por tanto, de bacterias se inocularon 90,63% y de algas 9,37%.

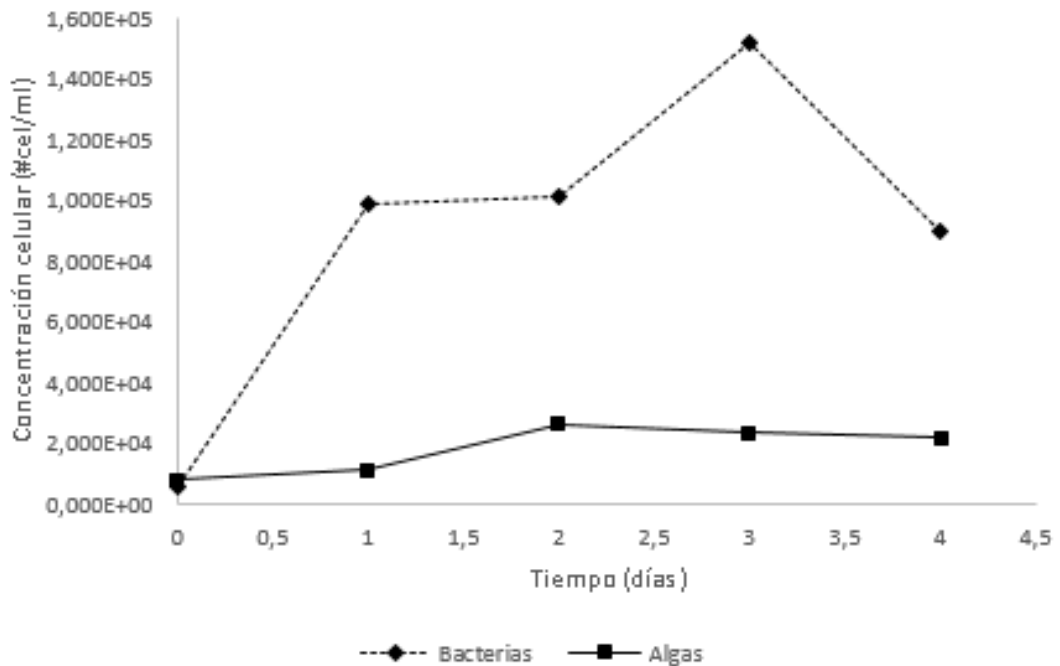
**Gráfica 22.** Curva crecimiento cultivo mixto 1.



Fuente: elaboración propia.

Al final del experimento se obtuvo una concentración total de  $8,2 \times 10^4$  cel/ml de microorganismos contando con 85,48% de bacterias y 14,52% de algas. En el segundo experimento se obtiene una cantidad total de  $1 \times 10^4$  cel/ml, permitiendo hallar los porcentajes en los que se encuentra cada cepa, por tanto, de bacterias se obtuvieron 68,75% y de algas 31,25%.

Gráfica 23. Curva crecimiento cultivo mixto 2.

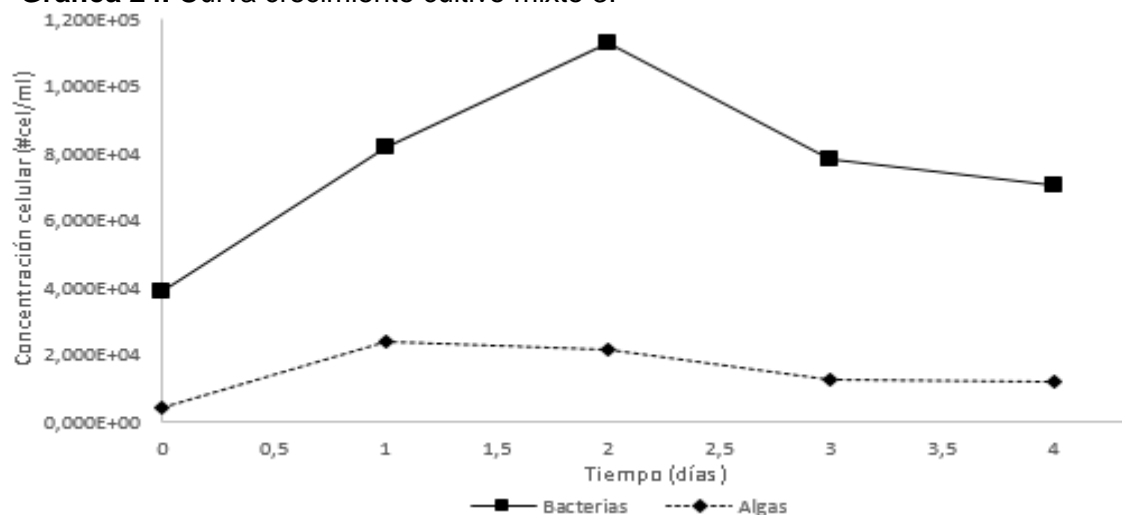


Fuente: elaboración propia.

Al final del experimento se obtuvo una concentración total de  $1,69 \times 10^5$  cel/ml de microorganismos contando con 70,38% de bacterias y 20,62% de algas.

Para el tercer experimento se obtiene una cantidad total de  $1,37 \times 10^4$  cel/ml, permitiendo hallar los porcentajes en los que se encuentra cada cepa, por tanto, de bacterias se tienen 41,46% y de algas 58,54%.

**Gráfica 24.** Curva crecimiento cultivo mixto 3.



**Fuente:** elaboración propia.

Al final del experimento se obtuvo una concentración total de  $1,12 \times 10^5$  cel/ml de microorganismos contando con 80,49% de bacterias y 19,51% de algas.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados obtenidos para los tres experimentos.

**Tabla 22.** Resumen de resultados experimentos.

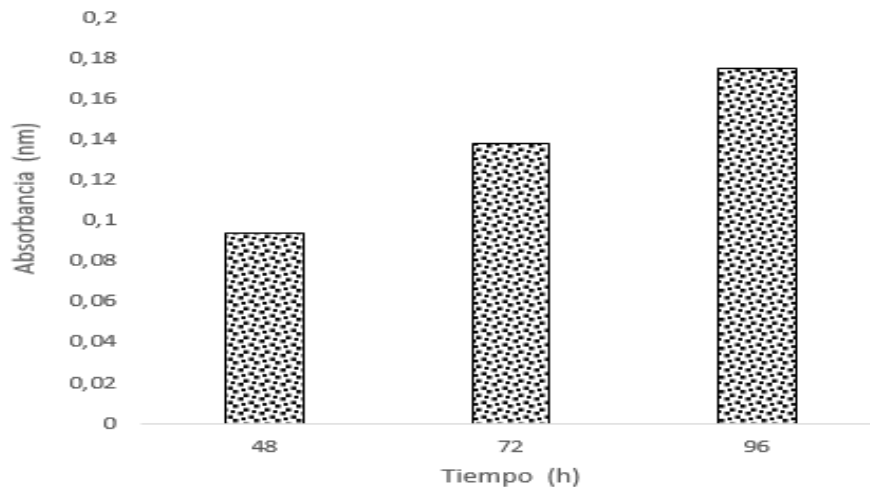
	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	Día 0	Día 4	Día 0	Día 4	Día 0	Día 4
<b>Total Microorganismos Cel/ml</b>	$4,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$	$1,08 \times 10^4$	$1,69 \times 10^5$	$1,37 \times 10^4$	$1,12 \times 10^5$
<b>BACTERIAS</b>	90,63%	85,48%	68,75%	70,38%	41,46%	80,49%
<b>ALGAS</b>	9,37%	14,52%	31,25%	20,62%	58,54%	19,51%

**Fuente:** elaboración propia.

**4.8.3 Curvas de producción de PHA.** A continuación, se ilustran los resultados obtenidos a partir de la técnica de espectroscopia descrita en el apartado 4.4. Se realizó el seguimiento de la acumulación del polímero, realizando un muestreo diario durante un periodo de 3 días con el objeto de confirmar la acumulación del polímero en los diferentes experimentos.

**Gráfica 25.** Acumulación de PHA- Experimento 1.

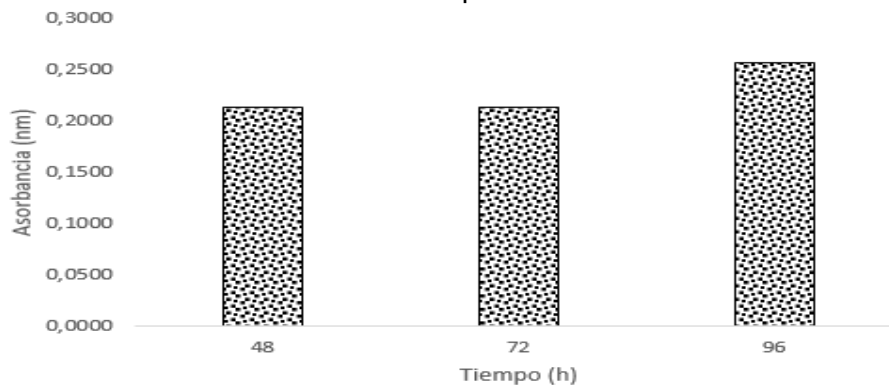




Fuente: elaboración propia.

En este primer experimento se observa que la producción de PHA aumenta progresivamente en el tiempo. Lo que indica que este microorganismo (bacteria) tienen la capacidad de producir PHA durante su crecimiento sin la necesidad de exponerlo a condiciones de estrés; por tanto, no es necesario mantener un déficit de un nutriente esencial y una fuente de carbono en exceso. En consecuencia, la tasa de generación del polímero es lenta en comparación con los experimentos posteriores. Así mismo, en este procedimiento se evidencia un incremento progresivo de la tasa de consumo de sustrato, presenciando sólidos volátiles que se manifiestan en polímeros de reserva y los cuales son producto de la formación de biomasa.

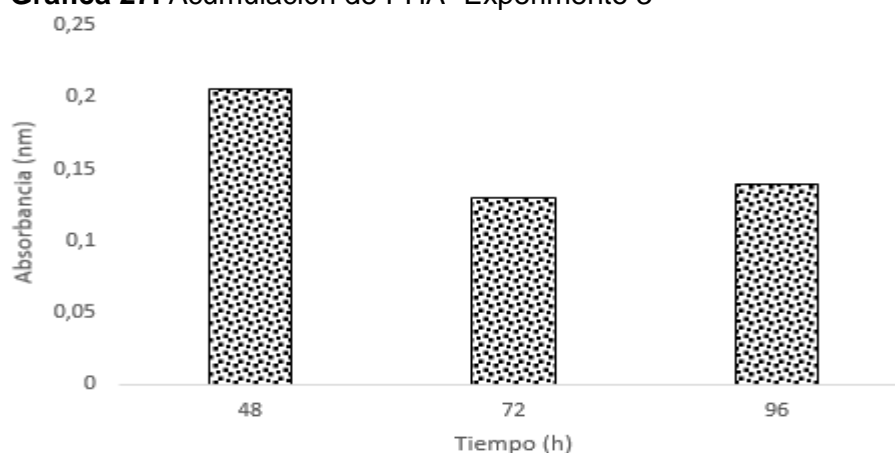
**Gráfica 26.** Acumulación PHA- Experimento 2



Fuente: elaboración propia.

La producción de PHA desde las 48 hasta las 72 horas se mantuvo relativamente constante obteniendo una densidad óptica aproximada de 0,20 de densidad óptica, al cabo de 96 horas aumentó a 0,25. La presencia de condiciones dinámicas o desequilibradas en función del pH, aireación, sustrato, etc. En el medio de cultivo provocan que el metabolismo de los microorganismos reaccione y como respuesta, induce el almacenamiento de reservas internas intracelulares de compuestos, generalmente polisacáridos y lípidos (glucógeno y polihidroxicanoatos).

**Gráfica 27.** Acumulación de PHA- Experimento 3



**Fuente:** elaboración propia.

Mediante una medida indirecta (densidad óptica) se pudo establecer la cantidad de PHA en la muestra, cabe aclarar que estas medidas no son absolutas simplemente permiten comparar muestras. Tras 96 horas el experimento 1 produce la misma cantidad de PHA que el experimento 3. Esto radica en que la falta o ausencia de un nutriente esencial como el O<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub>; favorecen la tasa de acumulación del biopolímero, puesto que los microorganismos involucrados están bajo condiciones de estrés. El cambio de las condiciones ambientales genera una respuesta, esta se traduce en el almacenamiento de inclusiones intracelulares (PHA) como reservas de carbono y energía. Por tanto, la ausencia de oxígeno incrementa la velocidad de acumulación del biopolímero, obteniendo así una cantidad de PHA superior en un intervalo de tiempo reducido.

La acumulación de PHA toma un rol importante en la supervivencia de los microorganismos cuando los nutrientes empiezan a escasear. Los microorganismos que cuenten con la capacidad de acumular el biopolímero podrán emplearlo bajo condiciones ambientales adversas. Las condiciones que promueven la acumulación del biopolímero también pueden estar relacionadas con el modo de operación del biorreactor, someter a los microorganismos a periodos de abundancia y hambruna, permite alcanzar mayores tasas de acumulación de PHA.

La técnica empleada contempla la relación existente entre el contenido de PHA extraíble Vs el que se predice, es decir este valor es directamente proporcional al área de los picos que puede ser una aproximación más precisa, pero en muchas ocasiones la altura del pico resulta ser proporcional al contenido de PHA en la muestra; puesto que, no todos los espectrofotómetros permiten hacer barridos tan solo leer una longitud de onda a la vez. Sin embargo, no se ha desarrollado una calibración de la técnica; por tanto, solo permite establecer mediciones relativas con el espectrofotómetro y de tal manera diferenciar que muestras acumulan más PHA que otras.

También se puede evidenciar que la mayor tasa de acumulamiento de PHA se dio en el experimento número 2 y 3 durante su fase exponencial. En cambio,

para el experimento 1 se dio en su fase de declive, una posible razón es que los microorganismos están en una condición de estrés ante el agotamiento de los nutrientes esenciales. En los diferentes experimentos con base a los resultados obtenidos, es posible predecir que las condiciones durante el proceso fueron idóneas para la obtención del polímero. Cabe mencionar que también se realizó el seguimiento tomando muestras, tiñéndolas y a través del empleo del microscopio confirmar dicha presunción.

**4.8.4 Medición oxígeno disuelto (OD) de microorganismos.** Se realizó la medición de oxígeno disuelto, para un inóculo de bacteria, microalga y para la inoculación conjunta de ambos microorganismos en cada experimento, con el fin de evaluar el efecto que este tenía tanto en la concentración celular como en la producción de PHA. Todos estos experimentos se realizaron durante un lapso de cuatro días donde fueron incubados a una temperatura de 26°C, agitación (200 rpm) e iluminación (2000 Luxes) constante.

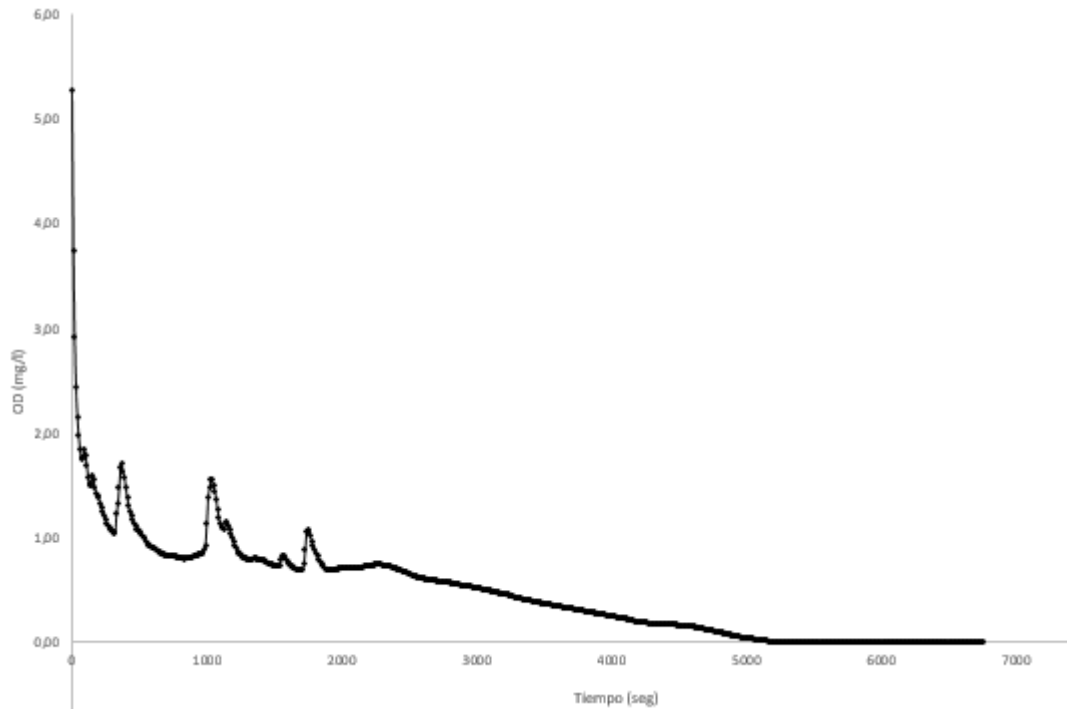
**Figura 47.** Medición de oxígeno disuelto de microorganismos en co-cultivo y en monocultivo.



Fuente: elaboración propia.

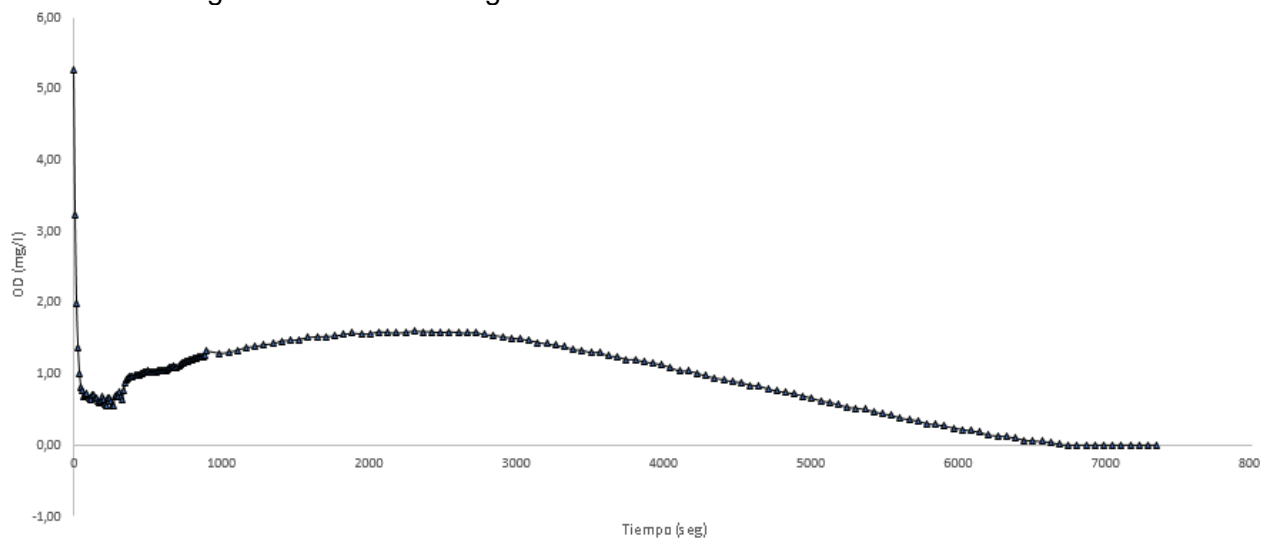
**4.8.4.1 Oxígeno disuelto en cultivos individuales de microorganismos.** A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la medición de oxígeno disuelto para cada microorganismo por separado en el medio MAA.

**Gráfica 28.** Oxígeno disuelto bacterias en monocultivo.



Fuente: elaboración propia.

**Gráfica 29.** Oxígeno disuelto microalga en monocultivo.



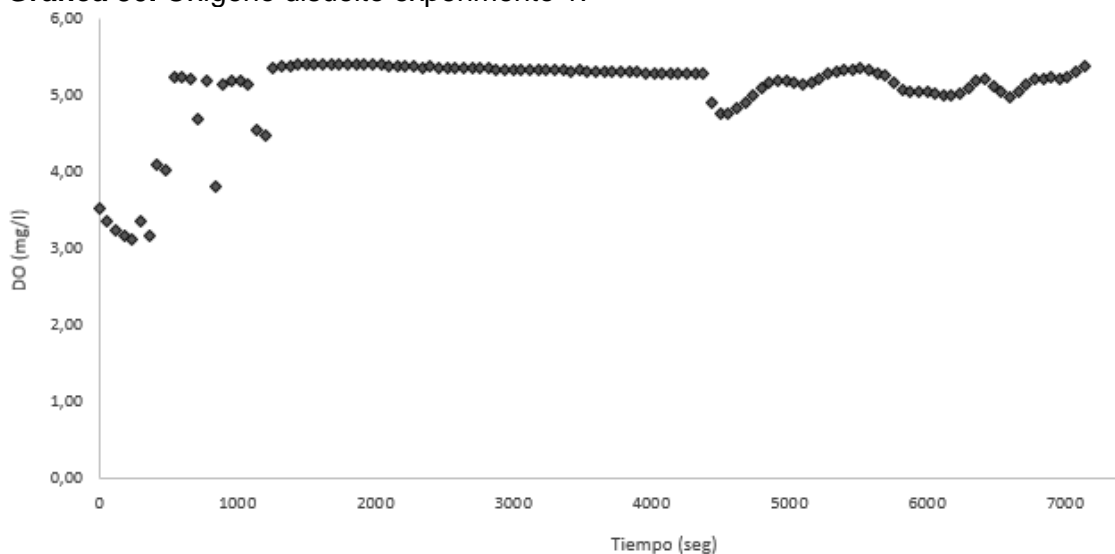
Fuente: elaboración propia.

Como se observa en la gráfica 27 se presume que generan estrés por la limitación de nutrientes, por tanto, consumen todo el oxígeno disuelto presente en el medio al cabo de 50 minutos. Por otra parte (gráfica 28), las microalgas elevan la concentración de oxígeno a 1,5 mg/l hasta el punto de inflexión en los 40 minutos aproximadamente, donde empieza a decaer. Esta tendencia reside en que la concentración de oxígeno depende de la fotosíntesis, la cual precisa de la presencia de una fuente de  $\text{CO}_2$  en el medio líquido. Debido a que el sistema no cuenta con aireación, el  $\text{CO}_2$  solo puede provenir de la degradación de la fuente de carbono. Al irse agotando la fuente de carbono debe disminuir el  $\text{CO}_2$  y, por lo tanto, la fotosíntesis y el oxígeno también disminuyen.

Por tanto, se encontró una reducción más rápida del oxígeno para las bacterias que para las microalgas, lo que sugiere que la tasa de consumo de bacterias es mucho más rápida que la producción de microalgas.

**4.8.4.2 Oxígeno disuelto en cultivos mixtos.** A continuación, se encuentran los resultados obtenidos de cada cultivo mixto inoculado respecto al comportamiento de Oxígeno disuelto y sus respectivos análisis.

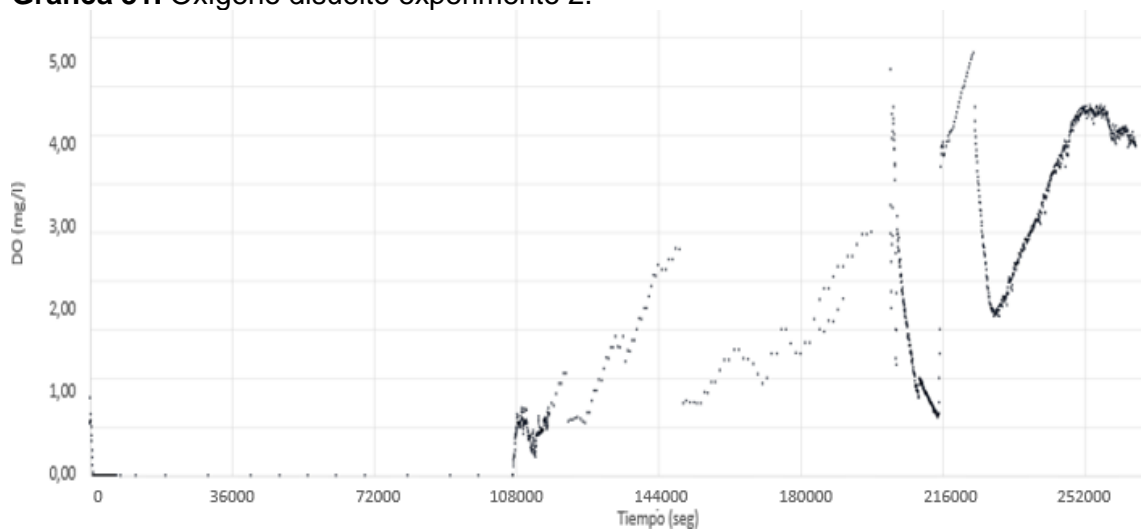
**Gráfica 30.** Oxígeno disuelto experimento 1.



**Fuente:** elaboración propia.

Para el primer experimento se obtuvo que en general el oxígeno disuelto se mantuvo constante en aproximadamente 5,5 mg/l, lo cual sugiere que posiblemente la producción de oxígeno autótrófica de las microalgas resultó ser suficiente para compensar el consumo del mismo que requerían las bacterias. De esta manera, se presume que hubo un equilibrado intercambio de gases entre los microorganismos, pues también se evidenció que la concentración celular de las algas aumentó en comparación a la condición de inóculo. Cabe señalar que los datos obtenidos durante los primeros 20 minutos no son representativos, puesto que el régimen de flujo es afectado al introducir la sonda de oxígeno (la cual ocupa un volumen considerable), es decir que la fluctuación generada es producto del tiempo de respuesta de la membrana en adaptarse o estabilizarse a las nuevas condiciones del medio.

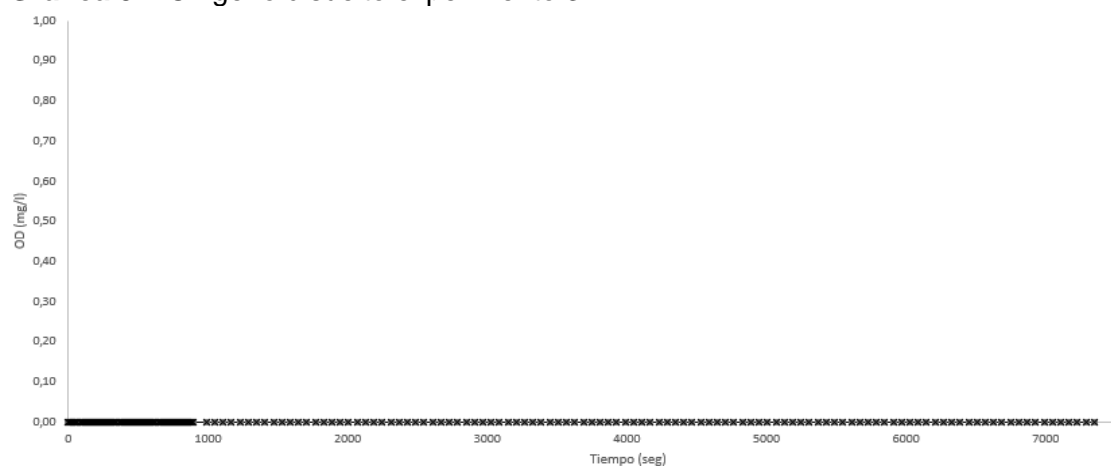
**Gráfica 31.** Oxígeno disuelto experimento 2.



**Fuente:** elaboración propia.

En el segundo experimento el oxígeno permaneció durante las primeras 3 horas en 0 mg/l y posterior a ello empezaron a generarse oscilaciones del mismo en el sistema, si bien en este experimento se obtuvo una estabilidad en términos de crecimiento celular, el intercambio de gases fue inestable a lo largo del tiempo obteniendo al final del experimento una concentración de oxígeno de 4 mg/l. Se evidencia que al aumentar la cantidad de microalgas se obtienen fluctuaciones de oxígeno en el sistema tendiendo a disminuirse, lo que sugiere que el oxígeno producido por las microalgas puede reducir en parte la disminución general de concentración de oxígeno disuelto. Esta tendencia representa un sistema complejo, donde el patrón de comportamiento del oxígeno podría aludir a la competencia por el sustrato entre los microorganismos, los picos y valles generados son el producto de la predominancia de una población sobre otra.

**Gráfica 32.** Oxígeno disuelto experimento 3.



**Fuente:** elaboración propia.

Finalmente, en el último experimento no se observó producción neta de oxígeno, lo cual indica que probablemente no se presentó una relación simbiótica en términos de transferencia de gases, por tanto, se asume que prevalece

fuertemente el metabolismo heterotrófico de las bacterias por encima del de las microalgas. Como se evidencia en la gráfica 23, la curva de crecimiento de las microalgas no está inhibida por la presencia de bacterias en el medio, pero la tasa de duplicación es lenta en comparación con los experimentos anteriores. Esto probablemente se deba al crecimiento simultáneo de bacterias que es relativamente rápido en los primeros días, pero luego se ve reducido, deteniendo así la producción de CO<sub>2</sub>. Lo que indica que la producción de oxígeno disuelto es demasiado lenta para compensar el consumo por parte de las bacterias. Como se mencionaba anteriormente la presencia de una fuente de CO<sub>2</sub>, es esencial en el proceso de fotosíntesis.

#### **4.8.5 SELECCIÓN DE PROPORCIONES DE INÓCULO ALGA-BACTERIA**

En literatura se reporta que, al disminuir la cantidad de algas, las bacterias pueden tener una mayor disponibilidad de fuente de carbono, lo que permite mejores tasas metabólicas y niveles más altos de PHA<sup>137</sup>. Lo anterior se evidenció, pues en el primer experimento con menor cantidad de inóculo de algas se obtuvo una cantidad considerable de bacterias, las cuales fueron las que más cantidad de bacterias productoras de PHA se obtuvieron, sin embargo, el crecimiento global no fue tan significativo, por el contrario, en los otros dos experimentos se obtuvo una mayor cantidad de microorganismos al final del experimento.

A medida que la relación entre microalga/bacteria fue disminuyendo se observó que los microorganismos permanecían más tiempo en su fase estacionaria y por el contrario la fase exponencial se disminuía. El segundo experimento con proporciones de inóculo de 68,75% de bacterias y de algas 31,25% fue el que más estabilidad mostró respecto al crecimiento celular y presentó dificultades para mantener una estabilidad en la concentración de oxígeno. Por otro lado, en el tercer experimento con proporciones de inóculo de 41,46% de bacterias y 58,54% de algas, respecto a dichas cantidades de inóculo disminuyó en un 33% la proporción de microalgas y por el contrario las bacterias predominaron con el doble de su cantidad inicial, mostrando que en esta condición es difícil mantener un intercambio de gases entre los microorganismos. Finalmente, en el primer experimento con proporciones de inóculo de 90,63% de bacterias y 9,37% de algas, fue en el que mayor velocidad de crecimiento y saturación se obtuvieron, además, se asume que hubo un equilibrio en términos de intercambio de gases entre los microorganismos, pues la producción de oxígeno por parte de las microalgas resultó ser capaz de compensar el consumo que requerían las bacterias.

Se podría inferir que la acumulación del biopolímero (PHA) no es dependiente de que el medio sea aerobio; puesto que, se alcanzó mayores tasas de acumulación de PHA ante la limitación de nutrientes esenciales como O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

---

<sup>137</sup> J. C. FRADINHO, A. Oehmen, and M. A.M. Reis, 'Effect of Dark/Light Periods on the Polyhydroxyalkanoate Production of a Photosynthetic Mixed Culture', *Bioresource Technology*, 148 (2013), 474–79 <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.010>>.

Sin embargo, el metabolismo de estos microorganismos (bacterias) les permite acumular PHA durante su fase crecimiento sin la necesidad de exponerlos a una condición de estrés; no obstante, implica que el tiempo de síntesis del biopolímero se vea prolongado, debido a que la velocidad de síntesis o generación del polímero requiere 96 horas para lograr una cantidad de PHA similar a los experimentos 2 y 3.

Por lo anterior, en términos de la concentración celular se decide optar por el experimento 1, puesto que favorece el crecimiento conjunto de los microorganismos. En consecuencia, no es ideal en función de la síntesis de PHA, debido a que la velocidad de generación del biopolímero es bastante lenta en comparación con los experimentos 2 y 3. Por tal razón, la concentración y las condiciones que favorecen la producción de PHA hacen referencia al experimento 3, obteniendo que la limitación de oxígeno es un factor idóneo en el proceso de síntesis de PHA.

Fue posible constatar la presencia del biopolímero de manera rápida y precisa a lo largo del experimento mediante una técnica basada en negro de sudan prescindiendo de equipos, reactivos y métodos que se traducen en altos costos. Esta metodología requiere pequeñas cantidades de muestra, las cuales se pueden obtener directamente durante el curso de la experimentación facilitando la operación, la optimización de tiempo y un rápido procesamiento de los datos.



## 5. CONCLUSIONES

- Se diseñó y se construyó un biorreactor a escala laboratorio con un costo de \$1'627.300 (COP) bajo referentes bibliográficos que permitieron establecer parámetros de diseño en función de la operación y cultivo de los microorganismos, este diseño se basa en un reactor tipo air-lift de bucle externo, el cual cuenta con un sistema de agitación magnético que da lugar a una transferencia uniforme de gases y masa en todos los puntos del reactor. Este BR se caracteriza por poseer un sistema óptico de medida que permite un monitoreo en tiempo real del crecimiento de los microorganismos que se cultivan.
- Se seleccionó un medio de cultivo y una cepa bacteriana en función del comportamiento de los microorganismos, evaluando la producción de PHA de manera cualitativa y cuantitativa, el medio seleccionado contenía 2 ml de ácido acético, 1 gramo de melaza y 4 ml de orina, aportándoles los nutrientes necesarios a los microorganismos. La cepa seleccionada es Gram positiva, dicha cepa presentó un mayor crecimiento en los demás medios con respecto a las demás cepas estudiadas y además acumuló de una mejor manera el PHA.
- Tres cultivos de microalga-bacteria fueron inoculados en distintas proporciones tomando como punto de partida la concentración de microorganismos en su fase exponencial, se realizó el seguimiento del crecimiento tanto global como individual de los microorganismos y pruebas respirométricas para evaluar el efecto que tenían; obteniendo así, que la mejor proporción para promover el crecimiento de los microorganismos corresponde al experimento 1; donde se inóculo 90,63% de bacterias y 9,37% de algas, pues se presentó la mayor velocidad de crecimiento y saturación, además, se presentó un equilibrio en términos de intercambio de gases entre los microorganismos, pues la producción de oxígeno por parte de las microalgas resultó ser capaz de compensar el consumo que requerían las bacterias, manteniendo dicha concentración en 5 mg/l. Sin embargo, el experimento que favorece la producción de PHA es el 3, puesto que la limitación de un nutriente esencial como el oxígeno desencadenó la producción del biopolímero en menor tiempo con respecto al experimento 1, el cual tardó 96 horas en producir la misma cantidad que el experimento 3.
- Los resultados obtenidos demuestran que la demanda de oxígeno requerida por los microorganismos se suple mediante las interacciones metabólicas de los mismos, lo que conlleva a prescindir de compresores y costos energéticos asociados a la aireación.
- Enriquecer un cultivo mixto fotosintético con acetato abre la posibilidad de usar desechos orgánicos agroindustriales (biomasa de segunda generación) como sustrato para la producción de PHA, teniendo un sistema más rentable y ambientalmente sostenible, pues se disminuyen los altos costos asociados

a las materias primas empleadas durante la síntesis de PHA en los procesos convencionales de producción de este biopolímero.

## 6. RECOMENDACIONES

- Implementar como método de recolección de datos un NCUmode con módulo 8266, esta tarjeta electrónica permite monitorear de manera directa y en tiempo real los datos vía internet registrados por el sensor óptico. Con el fin de detectar posibles anomalías en el funcionamiento, una de las principales causas que produjo la pérdida de datos.
- Los parámetros propuestos para el diseño del biorreactor tipo air-lift de bucle externo pueden servir como base para nuevos estudios.
- Para evaluar más detalladamente las interacciones entre los dos microorganismos se recomienda realizar un balance de masa teniendo en cuenta las ecuaciones estequiométricas de cada microorganismo.
- La cámara Neubauer tiende a perder precisión puesto que esta técnica de microscopía no permite discernir de manera clara entre células viables y muertas. Por tanto, se recomienda utilizar una técnica directa que reduzca la desviación estándar y el sesgo en los datos obtenidos por errores humanos como un citómetro de flujo.
- Con el fin de obtener recuento más preciso empleando la cámara Neubauer, se sugiere tomar por lo menos tres submuestras de cada muestra.
- La identificación de la cepa microbiana podría servir como base para comprender mejor las interacciones entre los microorganismos tomando como referencia fuentes bibliográficas, con el fin de poder comparar y optimizar resultados de anteriores estudios.
- Realizar la neutralización del medio de cultivo MAA-1 mediante hidróxido de sodio con grado reactivo resulta ideal, ya que la calidad nutricional del medio no se vería afectada; fomentando un mayor crecimiento microbiano.
- Es recomendable adaptar un difusor de aire en la parte inferior del biorreactor; de tal manera que actúe como un sistema de agitación neumático. En comparación con el modelo actual (bomba sumergible tipo pecera) este equipo resulta ser más versátil y práctico a la hora de emplearlo; además, es posible someterlo a procesos de esterilización por autoclave, lo que implica que la asepsia no se vería comprometida a lo largo de la operación.
- Se recomienda evaluar el efecto de la composición de alimentación del sustrato usando otros ácidos orgánicos además del acetato para identificar cuál de ellos genera una mayor capacidad de acumulación del PHA en este tipo de cultivo mixto.
- Se recomienda cuantificar la cantidad de nutrientes que remueven los microorganismos al interactuar puesto que este también es un factor

importante para evaluar el efecto que se tiene respecto a la producción de PHA.

- Realizar un ensayo de trazadores permitiría confirmar si el BR construido opera bajo la modalidad CSTR, verificando la ausencia cortocircuitos, recirculaciones y zonas muertas en la unidad.

## BIBLIOGRAFÍA

ABRIL, Nieves; BÁRCENA, Antonio J.; FERNÁNDEZ, Emilio; GÁLVAN, Aurora; JORRÍN, Jesús; PEINADO, José, et al. 'Espectrofotometría: Espectros de Absorción y Cuantificación Colorimétrica de Biomoléculas', Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. 2010. p. 1–8.

AGATÂNGELO Joaquim y DOS SANTOS, Eduardo. 'Microorganismos de Interés En Seguridad Alimentaria Con Modelos Matemáticos', Universidad Autónoma de Barcelona, Tesis Doct.Facultad de Veterinaria, 2007, p. 1–282.

ALFONSO, Carlos., 'Análisis De Diferentes Clases De Vidrio, Para La Elaboración De Una Ayuda Gráfica Como Soporte Técnico, Que Considere Sus Características Térmicas, Físicas Y Ópticas', 2018, p. 68.

ÁLVAREZ-DA SILVA, Laura, 'Bioplásticos: Obtención y Aplicaciones de Polihidroxialcanoatos', 2016, p. 38.

ARCOS, Monica. DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES Y PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE UN BIORREACTOR DISCONTINUO, 2007. Op. Cit., p. 23.

BENAVIDES, Henry. 'Información Técnica Sobre Gases de Efecto Invernadero y El Cambio Climático.', Ideam, 2007, p. 1–102 <<https://doi.org/IDEAMMETEO/008-2007>>.

BENDEZÚ, Jose H., Introducción a las resinas de poliéster y afines. Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central UNMSM. 2012., p. 2-6.

BIKANDI, Joseba. 'Cinética de La Fase Exponencial de La Curva de Crecimiento Microbiano', Departamento de inmunología, microbiología y parasitología Facultad de farmacia, 2014, p. 8.

CARVALHO, Ana; MEIRELES, Luís y MALCATA, Xavier. 'Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances', Biotechnology Progress. 2006, p.1490-1506.

CASTILLO, Diego. 'Efecto Del Gen FadH1 En La Producción de PHA Conteniendo Monómeros Insaturados Por Pseudomonas Putida', 2008, p. 16.

CHALIMA, Angelina; OLIVER, Laura; FERNÁNDEZ, Laura; KARNAOURI, Anthi; DIETRICH, Tomas y TOPAKAS, Evangelos, 'Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds', 2017, p. 1-17. <<https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>>.

CHIVA, Sergio Vicent and others, Depuración de Aguas Residuales: Digestión Anaerobia, Depuración de Aguas Residuales: Digestión Anaerobia, 2018 <<https://doi.org/10.6035/uji.facs.2018.2>>.

CUBILLOS, Adela y ESTENSSORO, Fernando. Energía y Medio Ambiente : Una Ecuación Difícil Para América Latina : Los Desafíos Del Crecimiento y Desarrollo En El Contexto Del Cambio Climático, 2011. DÁVILA, Ana. 'Evaluación de Las Condiciones de Cultivo Autotrofico de Microalgas Chlorella', Universidad de San Francisco de Quito, 2013, p. 28.

FERNÁNDEZ, Miguel. 'Diseño , Montaje y Caracterización de Fotobiorreactores Airlift Para El Cultivo de La Microalga Chlorella Sorokiniana', 2013, p. 9.

FONSECA, Liseth; SÁNCHEZ, María. 'EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL SUSTRATO PRINCIPAL (ÁCIDO ACÉTICO Y ÁCIDO ACÉTICO/ MELAZA) EN LA SELECCIÓN DE CULTIVO MIXTO DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHA, EN UN REACTOR AIR-LIFT', 2019 <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

FONT VICENT, Enrique, 'Estudio Del Comportamiento Hidrodinámico de Un Reactor Biológico Con Sistema de Aireación Superficial Con Turbinas de Eje Vertical', 2014, p. 24.

FRADINHO; REIS, M.A.M. y OEHMEN.A., 'Beyond Feast and Famine : Selecting a PHA Accumulating Photosynthetic Mixed Culture in a Permanent Feast Regime', Water Research, 2016, p. 428 <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.022>>.

GARCÍA, Marta, 'PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA DE LA CERVEZA', 2015.

GARCÍA, Rafael. 'Producción de Biomasa de Microalgas Rica En Carbohidratos Acoplada a La Eliminación Fotosintética de CO<sub>2</sub>', Consejo Superior de Investigación Científica, 2011 <<https://doi.org/10.1046/j.15298817.1998.340812.x>>.

GONZÁLEZ, María G. 'Producción de Poli-Hidroxialcanoatos Por Bacterias Del Género Bacillus de origen Marino', 2008., p. 25.

GONZÁLEZ, Yolanda; MEZA, Juan C; GONZÁLEZ, Orfil y CÓRDOVA, Jesús. 'SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO', 2013, p. 77–115.

GUILERA, Javier, 'Diseño De Un Biorreactor Para La Obtención De Quitosán', 2016, p. 32. <<https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Compendio de normas para trabajos escritos NTC-1486-6166 Bogotá D.C. El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

J. C. FRADINHO, A. Oehmen, and M. A.M. Reis, 'Effect of Dark/Light Periods on the Polyhydroxyalkanoate Production of a Photosynthetic Mixed Culture', *Bioresource Technology*, 148 (2013), 474–79 <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.010>>.

KOLLER, Martin; MARŠÁLEK, Lukáš; MIRANDA DE SOUSA, Miguel y BRAUNEGG, Gerhart. 'Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters in a Sustainable Manner', 2017, p. 24–38 <<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>>.

KOURMENTZA, Constantina; PLÁCIDO, Jersson; VENETSANEAS, Nikolaos; BURNIOL-FIGOLS, Anna; VARRONE, Cristiano; GAVALA, Hariklia N y REIS, Maria A. M. 'Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production', *Bioengineering*, 2017, p. 55 <<https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>>.

KYNADI, Anna y SUCHITHRA, T.V, 'Polyhydroxyalkanoates : Biodegradable Plastics for Environmental Conservation Industrial & Environmental Biotechnology', 2014 <<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4642.5682>>.

LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. 'Process for Symbiotic Culture of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Chlorella Vulgaris* for in Situ CO<sub>2</sub> Mitigation', 2018. p.2.

LA, Angéla; PERRÉ, Patrick y TAIDI, Behnam. 'Process for Symbiotic Culture of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Chlorella Vulgaris* for in Situ CO<sub>2</sub> Mitigation', 2018. p.2. LÓPEZ José L., 'La Ecuación Diferencial Logística ( o de Verhulst )', 2011, p. 1 5., <<https://doi.org/10.3390/rs9050411>>.

LÓPEZ, Luis; HERNÁNDEZ, Melisa; COLÍN, Claudia; ORTEGA, Silvestre; CERÓN, Guillermo y FRANCO, Rafael., 'Las Tinciones Básicas En El Laboratorio de Microbiología', *investigación en discapacidad*, Vol. 3, 2014, p. 10 18 <<http://www.medigraphic.com/rid>>.

MARROQUIN, Jorge. 'DESARROLLO DE BIORREACTORES CONTROLADOS APLICABLES AL ESTUDIO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS DE INTERÉS COMERCIAL', 2019, p. 22-60.

MD EROGLU S., Toprak S., Urgan O, MD, Ozge E. Onur, MD, Arzu Denizbasi, MD, Haldun Akoglu, MD, Cigdem Ozpolat, MD, Ebru Akoglu, 'Optimización de La Producción Del Agente de Biocontrol *Candidia Sake*', *Saudi Med J*, 33 (2012), 111 <<https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>>.

MÉNDEZ, Daniel. 'Modelamiento Matemático y Optimización Del Proceso de Producción de Polihidroxialcanoatos Empleando La Bacteria *Burkholderia Cepacia* B27 a Partir de Ácidos Grasos.', 2016, p. 137.

MONTEIRO, Juliana A.; DO SUL Ivar y COSTA Monica F., 'Plastic Pollution in Islands of the Atlantic Ocean', *Environmental Pollution*, 2018, p. 103–10 <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.096>>.

MORENO, Erika y VANEGAS, Daniel., DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR ESTERILIZABLE Y DE BAJO COSTO PARA EL ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS, 2017, p. 14.

OELLER, Gabriela y TOMASINI., 'Microbiología de lodos activados', *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2019, p. 162. <<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>>.

PALOMINO, Angélica, 'EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ACIDOGÉNICO PARA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV) A PARTIR DEL AGUA RESIDUAL SINTÉTICA DE LA INDUSTRIA CERVECERA, COMO PLATAFORMA DE BIORREFINERÍA MARÍA', 2016., p. 20.

PANIKOV, Nicolai. 2018. *Microbial Growth Dynamics*, *Comprehensive Biotechnology*, 2a. Ed. Elsevier., I <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00032-5>>.

PÉREZ, Raúl. 'ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUA RESIDUAL USANDO UN SISTEMA INMOVILIZADO MICROALGA-BACTERIA EN CRECIMIENTO AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO y MIXOTRÓFICO', 2009, p. 9 11. <[https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez\\_.pdf](https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/258/1/perez_.pdf)>.

PŁACZEK, Małgorzata; PATYNA, Agnieszka y WITCZAK, Stanisław., 'Technical Evaluation of Photobioreactors for Microalgae Cultivation', 2017, <<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20171902032>>., p. 8.

PORRAS, Mauricio A., VILLAR, Marcelo A., y CUBITTO, María A., 'Novel Spectrophotometric Technique for Rapid Determination of Extractable PHA Using Sudan Black Dye', *Journal of Biotechnology*, 2017, p. 28–32 <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.012>>.

PUMAROLA, A; RODRÍGUEZ, A.; GARCIA, J.A., y PIEDROLA, G. 1992. *MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA*. 2a. Ed. Elsevier España, 916p. QUIJANO, Deisy, 'Evaluación De La Producción De Metano A Partir De Biomasa Fotosintética', 2016.. p. 25-45. *Ibíd.*, p. 35.

RAMÍREZ, Luis G.; JACOB-LOPES, Eduardo y QUEIROZ, Leila. 'Fotobiorreactor: Herramienta Para Cultivo De Cianobacterias', *Ciencia y Tecnología*, 2014, p. 9–19 <<https://doi.org/10.18779/cyt.v6i2.90>>.



RUÍZ, H.A.; RODRÍGUEZ, R.M; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS, J.C y AGUILAR, C.N., 'Diseño De Biorreactores Para Fermentación En Medio Sólido', Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol 6.1, 2007, p. 33–40.

SALAZAR, Diana P., 'Estudio Del Desarrollo Industrial En La Producción de Polihidroxicanoatos En La Primera Década Del Siglo XXI', 2010.

SALINAS, Edmar; GASCA, Victor. 'Los Biocombustibles', El Cotidiano, 2009, p. 75–82. SANTACRUZ, Carolina, 'Aplicación de Modelos Para La Evaluación Hidrodinámica de Un Sedimentador de Alta Tasa', 2005, p. 5-15.

SANTAMBROSIO, Eduardo; ORTEGA, Marta y GARIBALDI, Pablo A., 'Tinción y observación de microorganismos', 2009, p. 1-9. SERRANO, Julieth. 'Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros Producidos Por Microorganismos.: Una Solución Frente a La Contaminación Del Medio Ambiente', Teoría y Praxis Investigativa, 2010, p. 79–84 <<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3702404&info=resumen&idioma=ENG>>.

SFORZA, Eleonora; PASTORE, Martina; SPAGNI, Alessandro y BERTUCCO, Alberto. 'Microalgae-Bacteria Gas Exchange in Wastewater: How Mixotrophy May Reduce the Oxygen Supply for Bacteria', 2018, p. 1-6. SHI, Jun; PANDEY, Pramod K.; FRANZ, Annaliese K.; DENG, Huiping y JEANNOTTEO, Richard, 'Chlorella Vulgaris Production Enhancement with Supplementation of Synthetic Medium in Dairy Manure Wastewater', AMB Express, Vol 6, 2016, p. 1–9 <<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0184-1>>.

SINGH SAHARAN, Baljeet; GREWAL Anita y KUMAR, Pardeep. 'Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments', Chinese Journal of Biology, 2014, p. 1–18 <<https://doi.org/10.1155/2014/802984>>.

RODRÍGUEZ, María R., 'Variabilidad de La Inactivación Microbiana y de La Fase de Latencia de Los Microorganismos Supervivientes a Un Proceso de Acidificación', 2016., p. 9. TAN, Giin Yu Amy; CHEN, Chia Lung; GE, Liva; WANG, Lin; LI, Yanhong; ZHAO, Lei; MO, Yu et al. 'Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review', Polymers, 2014, p. 54 <<https://doi.org/10.3390/polym6030706>>.

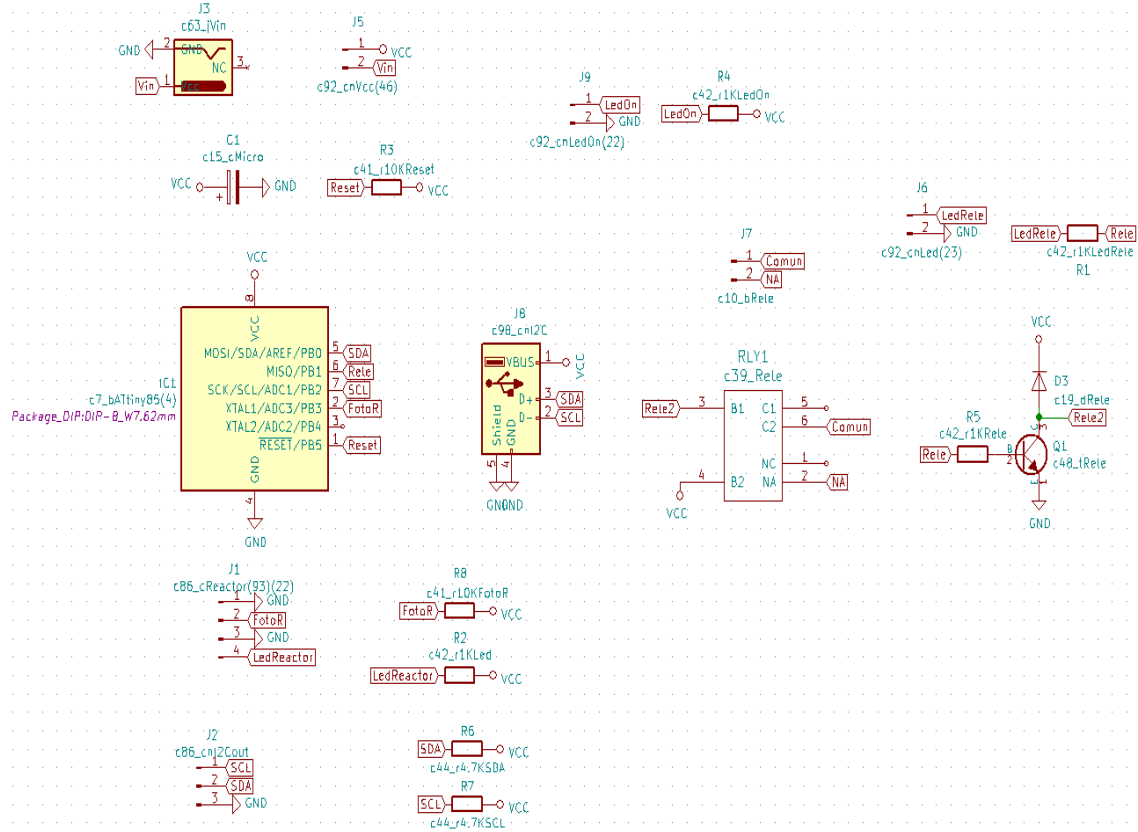
YANG, Shang-Tian. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewal Resources - New Technologies and Applications, 2007. p. 135-137.

## **ANEXOS**

## ANEXO A.

### ESQUEMÁTICO CIRCUITO MEDIDOR

Figura 48. Esquemático circuito medidor.

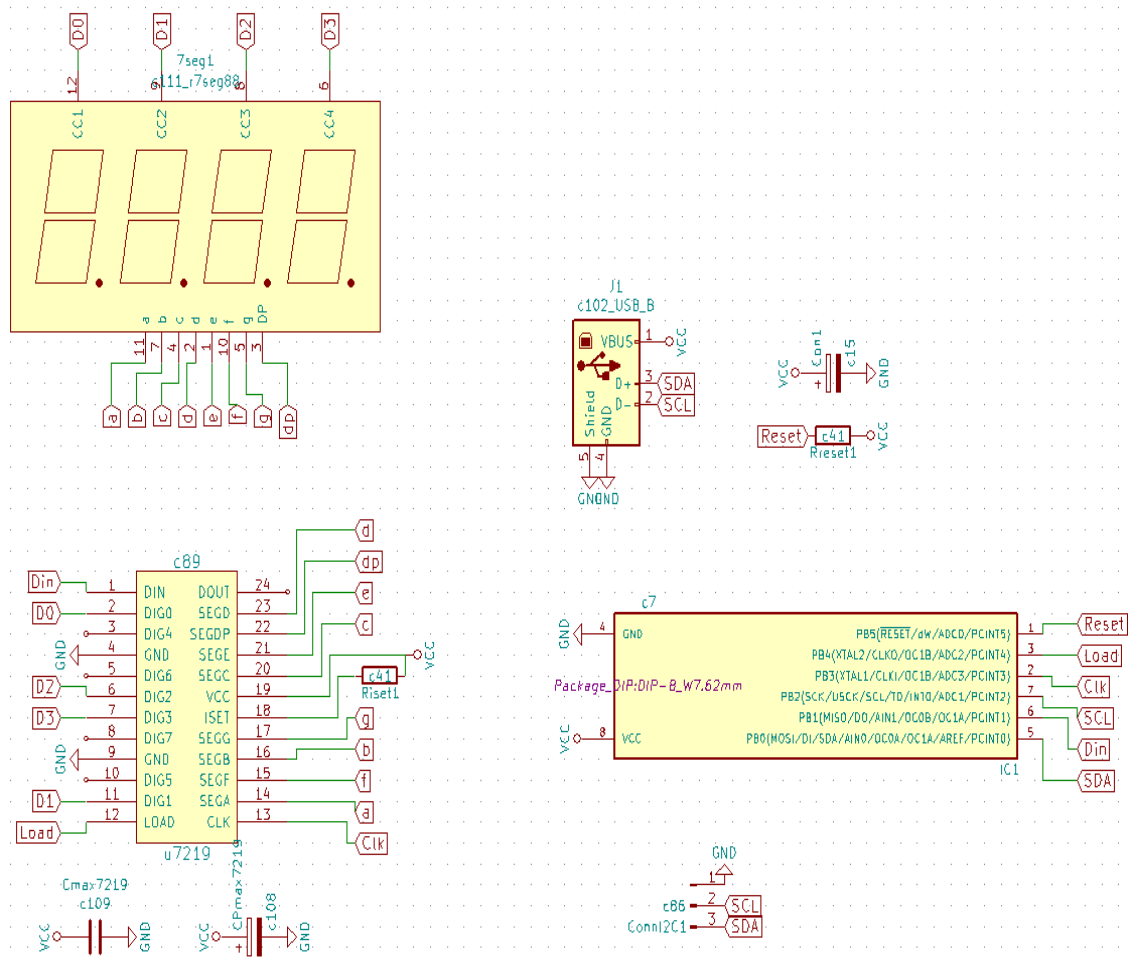


Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO B.

### ESQUEMÁTICO CIRCUITO VISUALIZADOR

Figura 49. Esquemático circuito visualizador.



Fuente: Elaboración propia.

## **ANEXO C.**

### **DETERMINACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) MEDIANTE MÉTODOS DE TINCIÓN EN AGAR ROJO NILO Y NEGRO SUDÁN B.**

#### **Objetivo general**

- Determinar la acumulación de polihidroxicanoatos de doce cepas bacterianas aisladas de un biorreactor, mediante tinción en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.

#### **Objetivos específicos**

- Evaluar el crecimiento de las cepas seleccionadas y su producción de PHAs en medio líquido con exceso de glucosa y en medio con presencia de acetato.
- Verificar la acumulación de PHAs evidenciado como gránulos negros mediante tinción en lámina con Negro Sudán B y tinción de Gram.

#### **Metodología**

Para reactivar las cepas en cultivo nuevo se repicaron en agar nutritivo, se incubaron a 30°C entre 48 y 72 horas, se realizó coloración de Gram para verificar morfología microscópica y se describieron las morfologías macroscópicas en agar. Por otro lado, se realizó siembra en agar MacConkey como ayuda para determinar bacterias Gram negativas y fermentación de lactosa para su identificación.

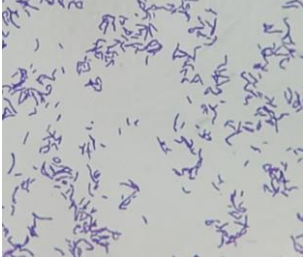
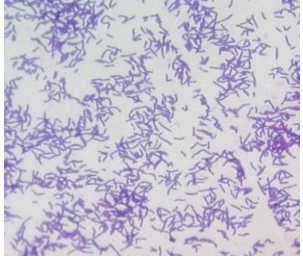
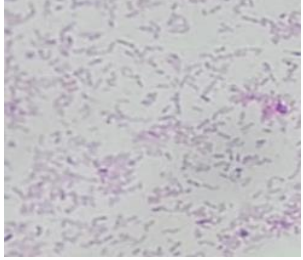
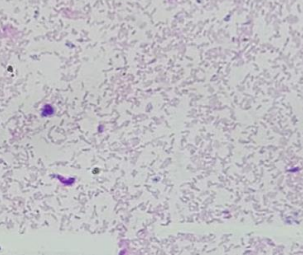
Se determinaron las bacterias productoras de PHAs mediante siembra en agar Rojo Nilo, el cual se incubó a 30°C durante 5 días; una cepa es positiva cuando se evidencia coloración rosada de la colonia. Se confirmó en agar para tinción con Negro Sudán B, incubando a 30°C hasta obtener buen crecimiento de las colonias (2 días), se adicionó colorante Negro Sudán B de manera que las colonias quedarán totalmente cubiertas, posteriormente se lavó con etanol al 96%; se confirmaron como positivas las colonias que tomaron coloración negra a azul oscuro. Para evaluar la producción de PHAs en medio líquido se preparó caldo nutritivo con glucosa, se sembraron las cepas en 10 ml de caldo y se incubaron a 30° C en agitación constante a 240 rpm, se realizó monitoreo diario de la acumulación de PHAs con tinción de Gram y Negro Sudán B en lámina.

Por otro lado, se evaluó el crecimiento en caldo con acetato en proporción de 10 gr por litro a un pH de 7.3, con las mismas condiciones de crecimiento que el anterior. Posteriormente se verificó la producción de PHAs con tinción de Gram y Negro Sudán B en lámina. Para la tinción con Negro Sudán B en lámina se adicionó el colorante hasta cubrir la lámina y se lavó pasado 30 minutos con alcohol al 96 %, como colorante de contraste se utilizó Fucsina de Gram y se lavó con agua.


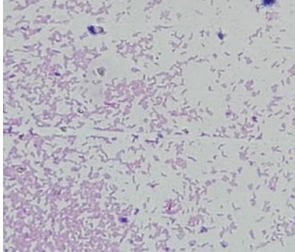
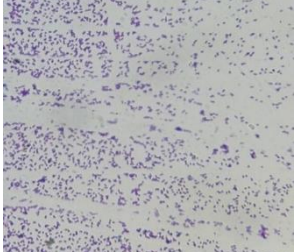
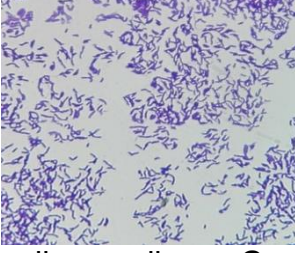
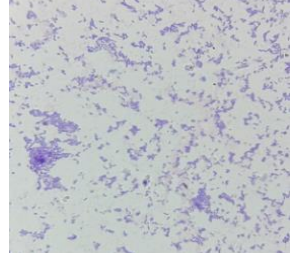
## Resultados

A continuación, se observa la morfología macroscópica y microscópica de las cepas seleccionadas para determinar la acumulación de PHAs:

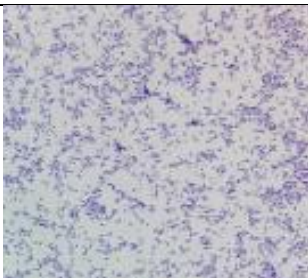
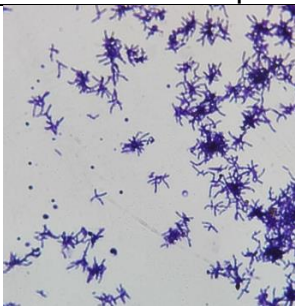
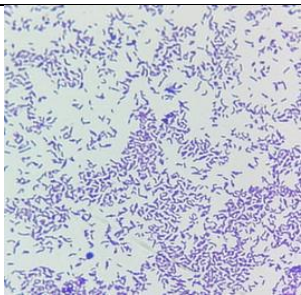
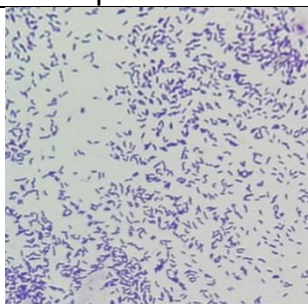
**Cuadro 13.** Morfología macro y microscópica de las cepas.

<b>Macroscopía en agar nutritivo</b>	<b>Microscopía coloración de Gram</b>
<p>Colonia 1: Colonias circulares, pequeñas, blanquecinas, elevadas, borde entero, brillantes. Con el tiempo se tornan amarillas.</p>	 <p style="text-align: center;">Bacilos medianos Gram positivos</p>
<p>Colonia 2: Colonias puntiformes, elevadas, brillantes, borde entero, blanquecinas. Con el tiempo se tornan amarillas.</p>	 <p style="text-align: center;">Bacilos medianos, delgados, Gram positivos.</p>
<p>Colonia 3: Colonias blanquecinas, pequeñas, circulares, convexas, brillantes de borde entero.</p>	 <p style="text-align: center;">Bacilos Gram negativos (confirmar)</p>
<p>Colonia 4: Colonias blanquecinas, pequeñas, circulares, convexas, brillantes de borde entero.</p>	 <p style="text-align: center;">Bacilos cortos Gram negativos (confirmar)</p>

**Cuadro 12.** (Continuación).

<b>Macroscopía en agar nutritivo</b>	<b>Microscopía coloración de Gram</b>
<p>Colonia 5: Colonias blanquecinas, pequeñas, brillantes, borde regular. Colonias circulares, convexas.</p>	 <p>Bacilos largos, delgados Gram negativos (confirmar)</p>
<p>Colonia 6: Colonias blanquecinas, pequeñas, brillantes, borde regular. Colonias circulares, convexas.</p>	 <p>Bacilos cortos Gram negativos (confirmar)</p>
<p>Colonia 7: Colonias amarillas, convexas, de borde entero. Colonias puntiformes, brillantes.</p>	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>
<p>Colonia 8: Colonias blanquecinas, pequeñas, brillantes, de borde regular. Con el tiempo se tornan amarillas. Colonias circulares, convexas.</p>	 <p>Bacilos medianos Gram positivos</p>
<p>Colonia 9: Colonias puntiformes, elevadas, brillantes. Con el tiempo se tornan amarillas. Colonias blanquecinas, borde entero.</p>	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>

**Cuadro 12.** (Continuación).

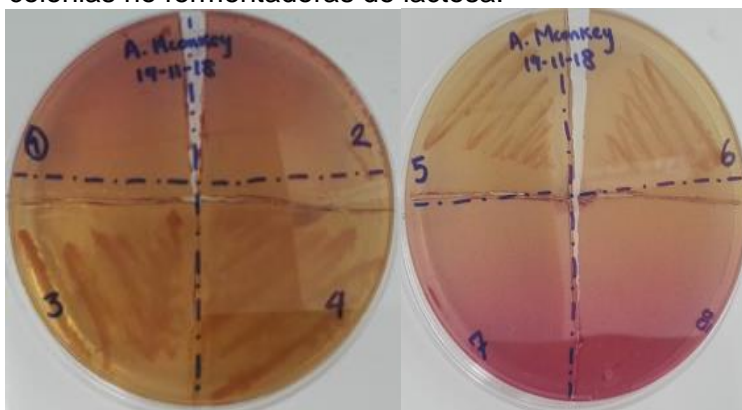
<b>Macroscopía en agar nutritivo</b>	<b>Microscopía coloración de Gram</b>
<p>Colonia 10: Colonias crema, redondas, pequeñas, pulvinadas, brillantes, borde regular</p>	 <p>Bacilos cortos Gram positivos</p>
<p>Colonia 11: Colonias irregulares, medianas, blanquecinas, elevadas, opacas, borde rizado.</p>	 <p>Bacilos medianos Gram positivos agrupados en forma de estrella</p>
<p>Colonia 12: Colonias circulares, medianas, elevadas, blanquecinas, borde regular, brillantes.</p>	 <p>Bacilos medianos Gram positivos</p>
<p>Colonia 13: Colonias circulares, medianas, blanquecinas, elevadas, borde entero.</p>	 <p>Bacilos medianos Gram positivos</p>

**Fuente:** Elaboración Propia



En la siguiente figura se muestra las colonias 3,4, 5 y 6 en agar MacConkey, las cuales fueron las únicas que crecieron en este medio.

**Figura 50.** Crecimiento en agar MacConkey: se observan colonias no fermentadoras de lactosa.



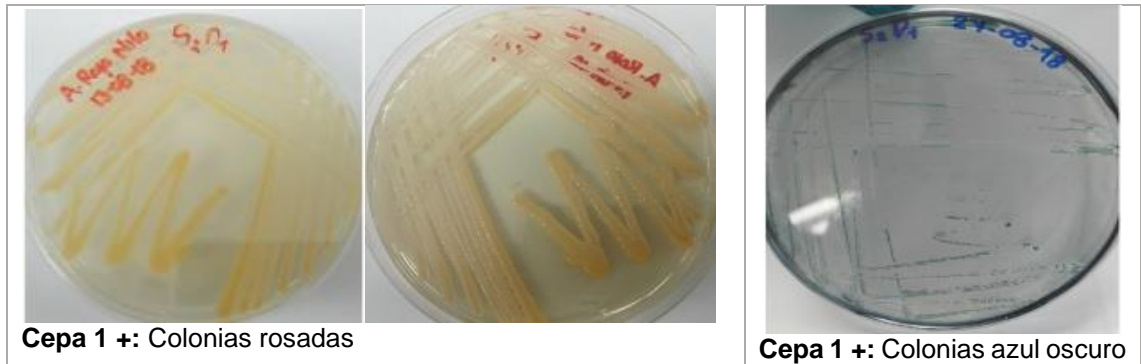
Fuente: Elaboración Propia

**Tabla 23.** Nomenclatura cepas microbiana.

Nomenclatura nueva	Nomenclatura vieja
1	S <sub>2</sub> D <sub>1</sub>
2	S <sub>2</sub> D <sub>2</sub>
3	S <sub>2</sub> D <sub>4</sub> (A) 12-07-18
4	S <sub>2</sub> D <sub>4</sub> (A) 16-07-18
5	S <sub>2</sub> D <sub>4</sub> (B) 12-07-18
6	S <sub>2</sub> D <sub>4</sub> (B) 16-07-18
7	S <sub>2</sub> D <sub>6</sub>
8	S <sub>2</sub> E <sub>1</sub>
9	S <sub>2</sub> E <sub>4</sub>
10	S <sub>2</sub> E <sub>5</sub>
11	S <sub>3</sub> D <sub>3</sub>
12	S <sub>4</sub> D <sub>1</sub>
13	S <sub>4</sub> E <sub>1</sub>

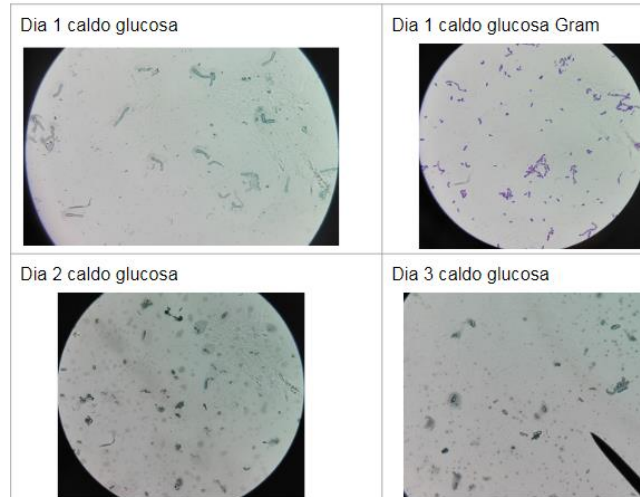
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 51.** Evaluación Cepa 1 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B



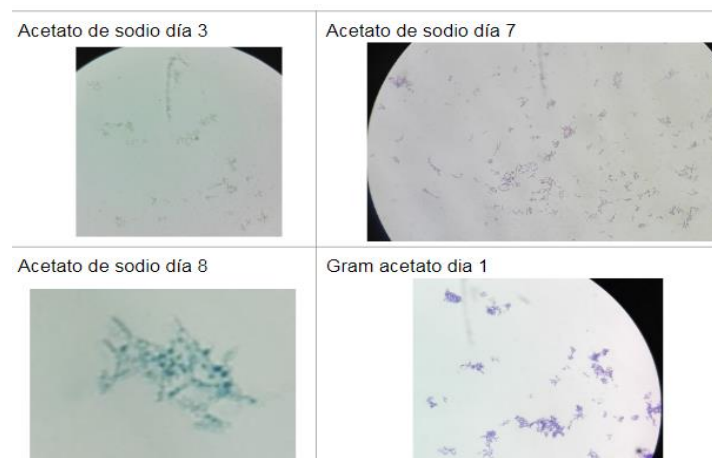
Fuente: Elaboración Propia

**Figura 53.** Evaluación microscópica medio acetato, cepa 1 en tinción Gram y Negro Sudán B.



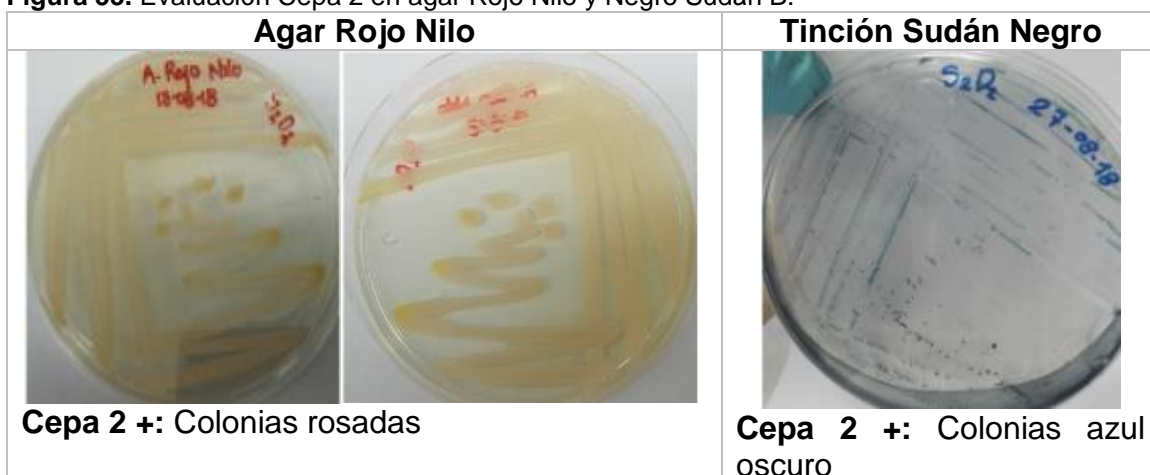
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 54.** Evaluación microscópica medio acetato, cepa 1 en tinción Gram y Negro Sudán B.



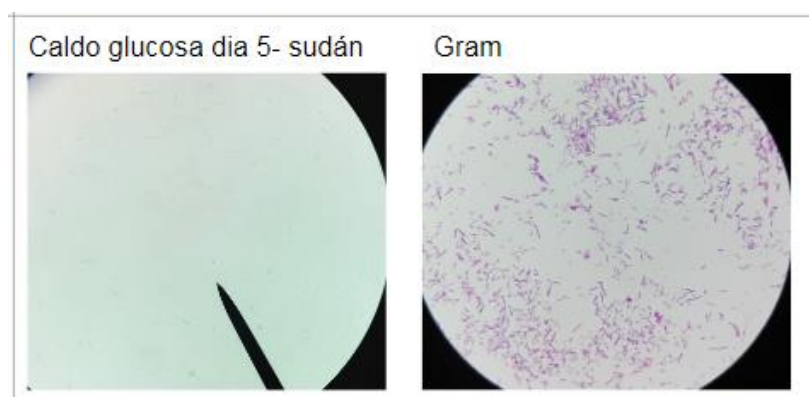
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 55.** Evaluación Cepa 2 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



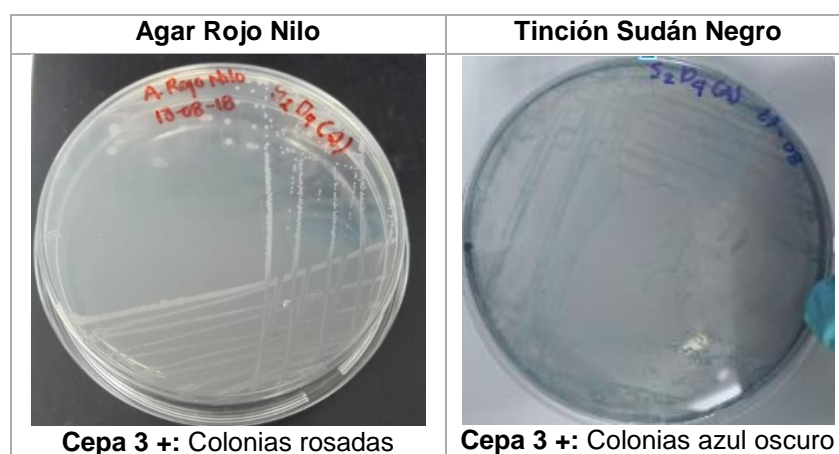
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 56.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 2 en tinción Gram y Negro Sudán B.



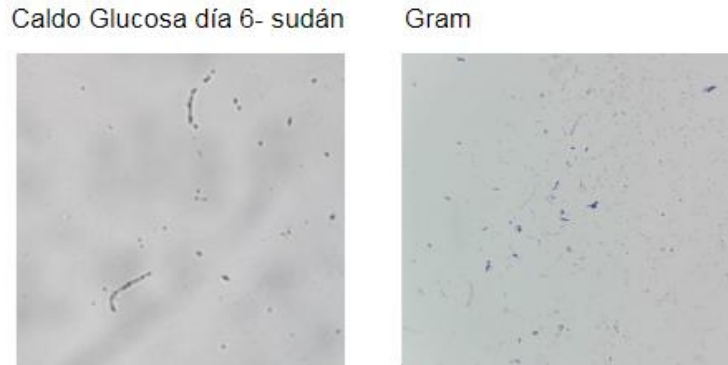
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 57.** Evaluación Cepa 3 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



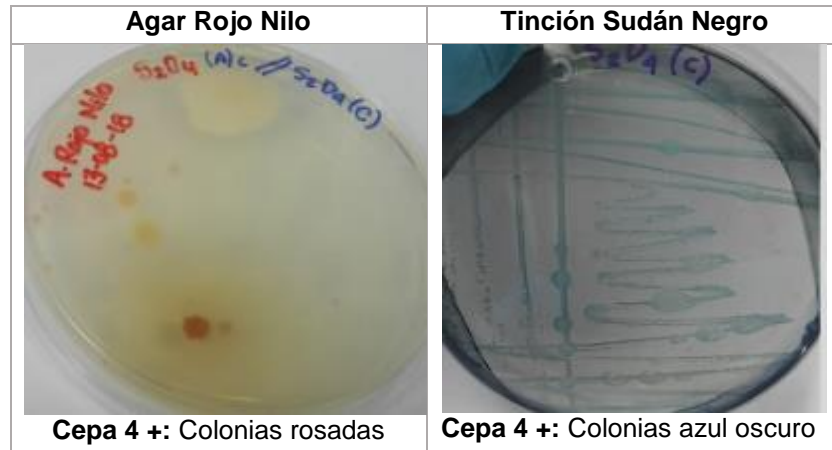
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 58.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 3 en tinción Gram y Negro Sudán B.



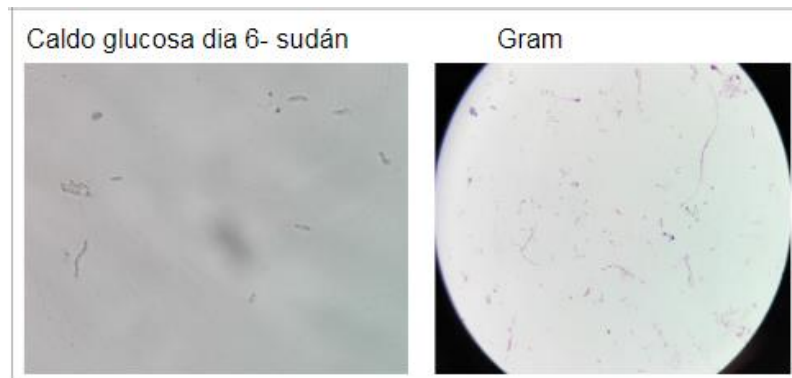
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 59.** Evaluación Cepa 4 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



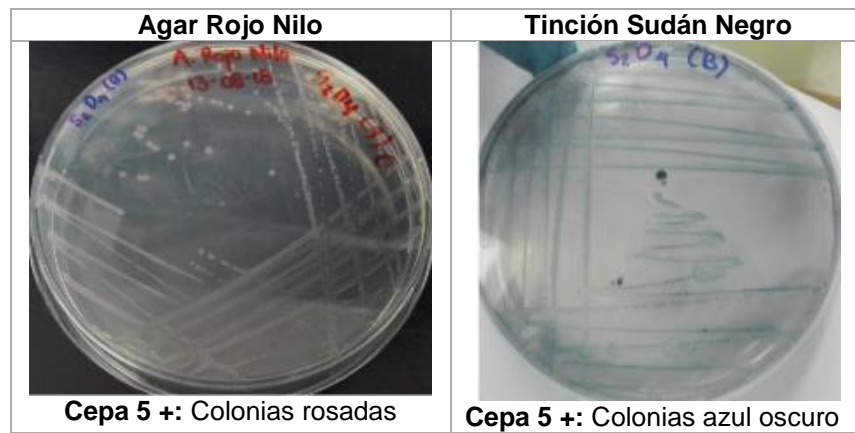
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 60.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 4 en tinción Gram y Negro Sudán B.



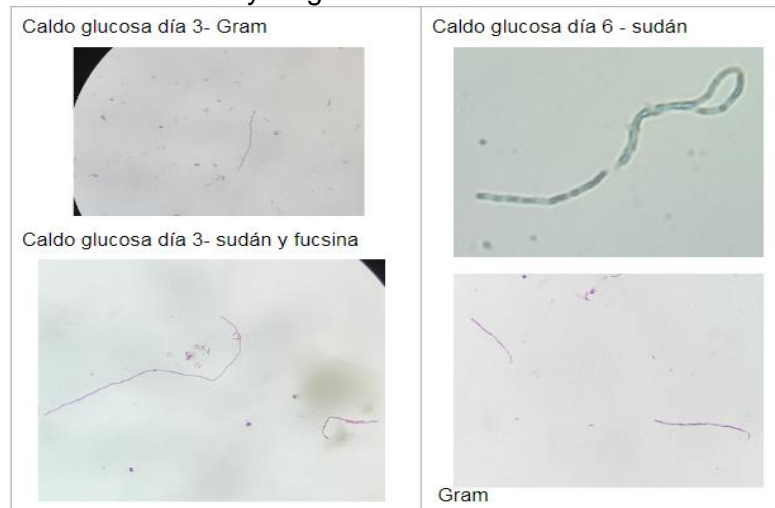
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 61.** Evaluación Cepa 5 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



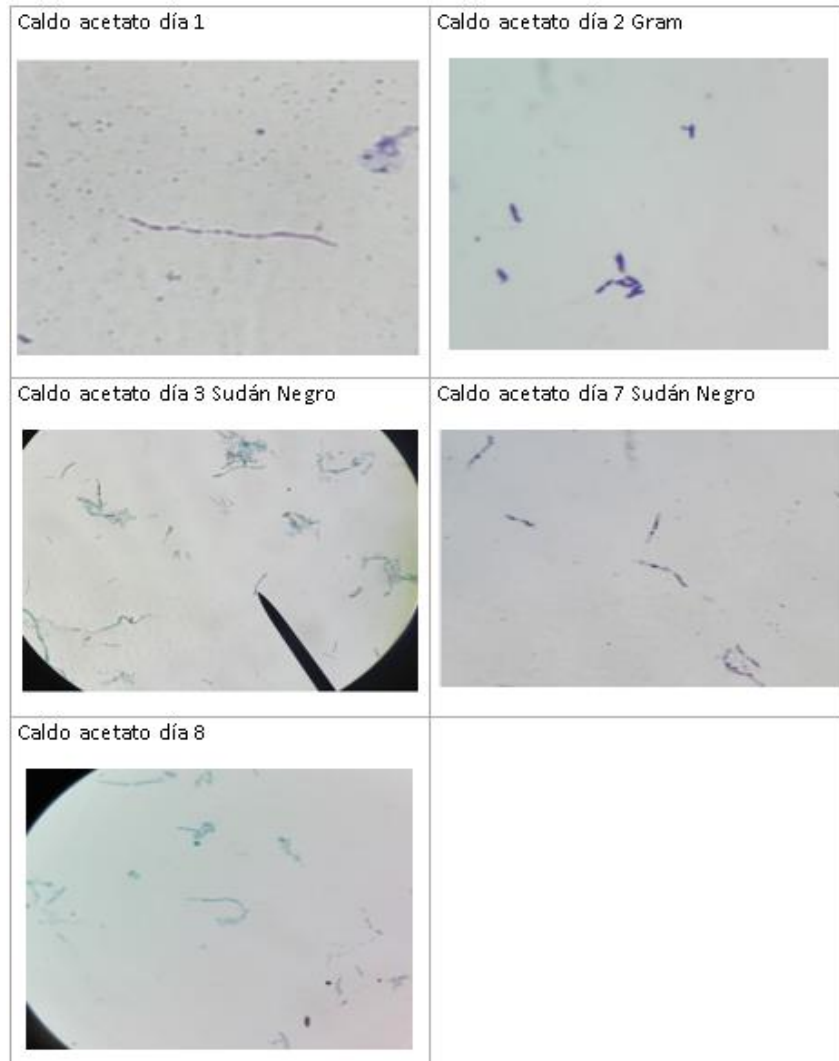
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 62.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 5 en tinción Gram y Negro Sudán B.



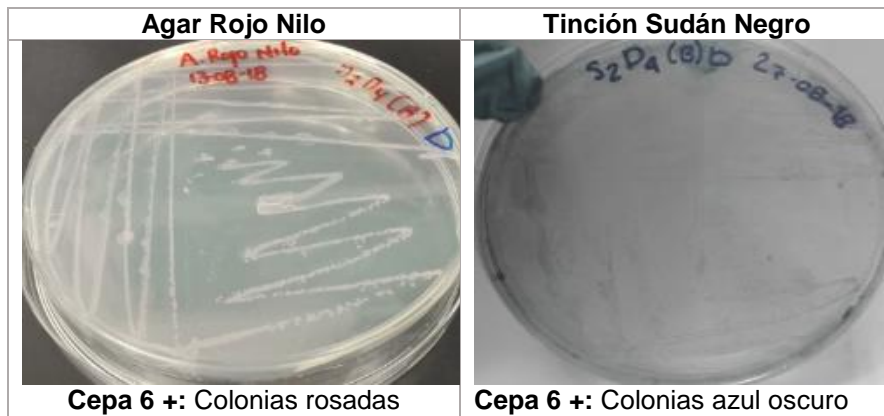
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 63.** Evaluación microscópica medio acetato, cepa 5 en tinción Gram y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 64.** Evaluación Cepa 6 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



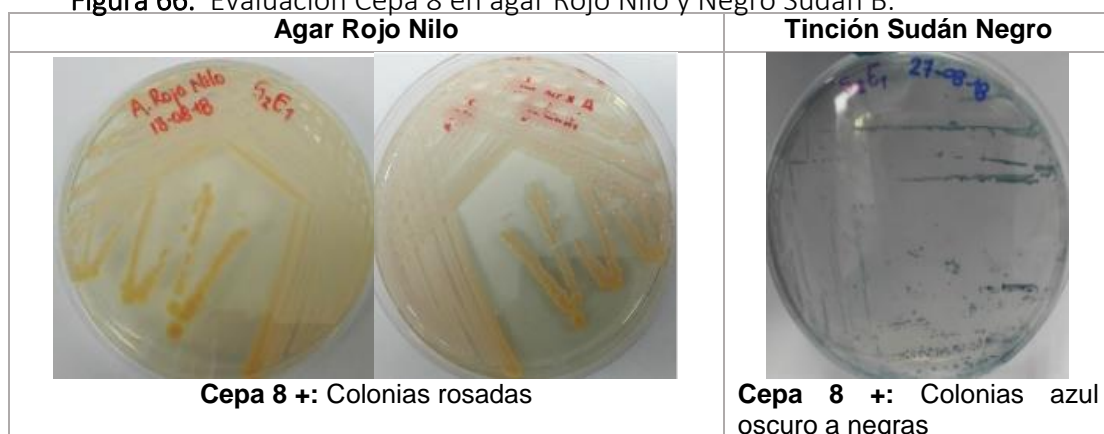
Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 65.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 6 en tinción Gram y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 66.** Evaluación Cepa 8 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



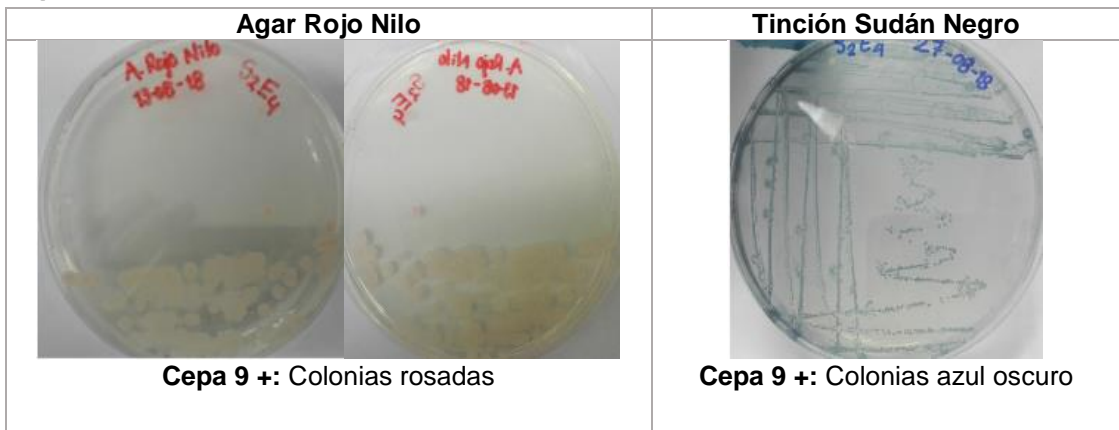
Fuente: elaboración Propia.

**Figura 67.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 8 en tinción Gram y Negro Sudán B.



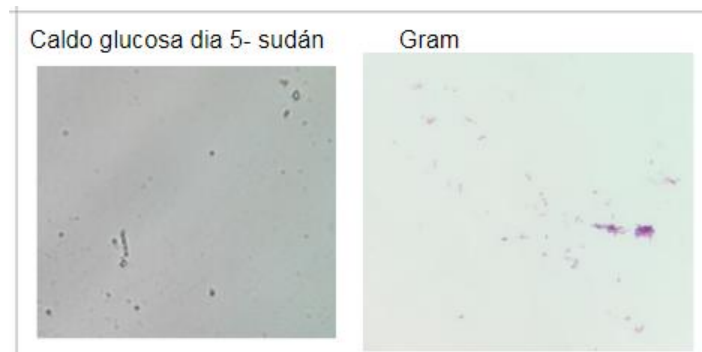
Fuente: Elaboración Propia.

Figura 68. Evaluación Cepa 9 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



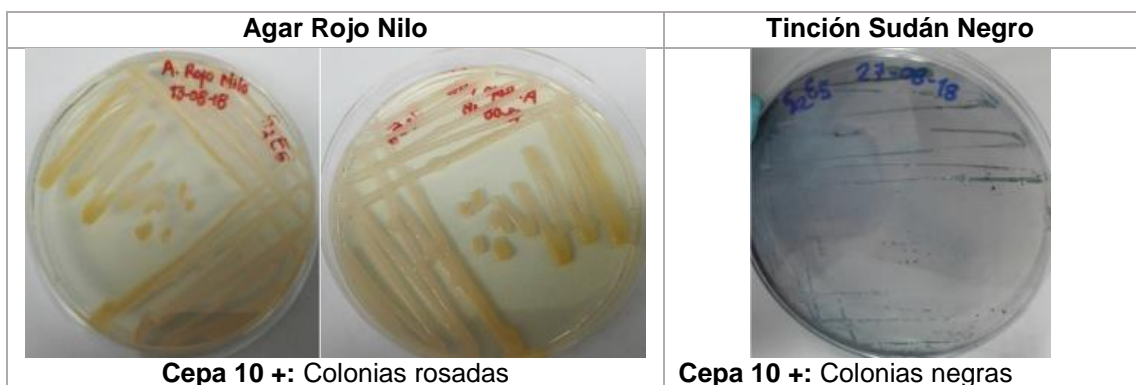
Fuente: Elaboración Propia.

Figura 69. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 9 en tinción Gram y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

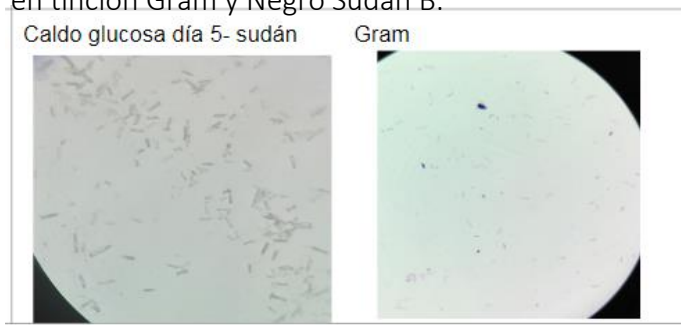
Figura 70. Evaluación Cepa 10 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

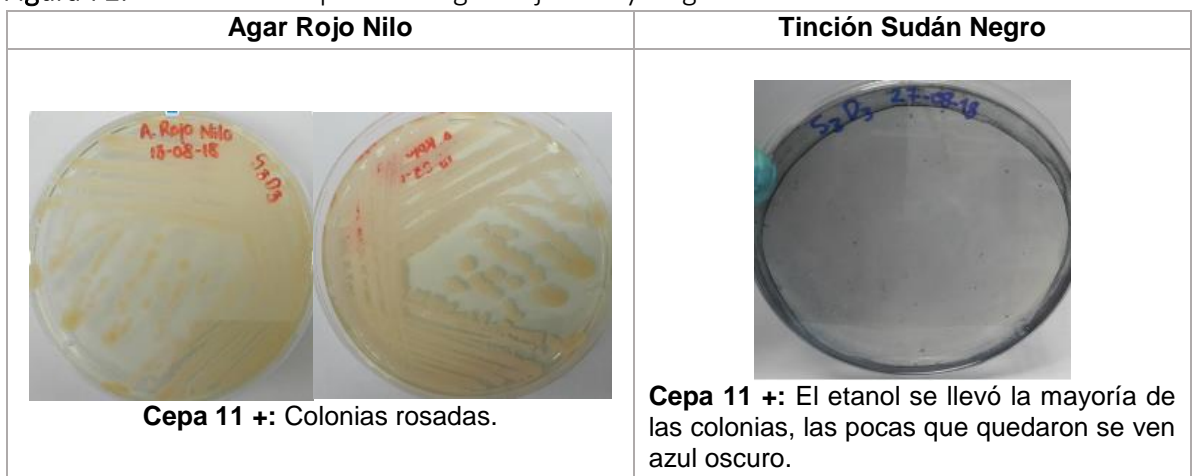


**Figura 71.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 10 en tinción Gram y Negro Sudán B.



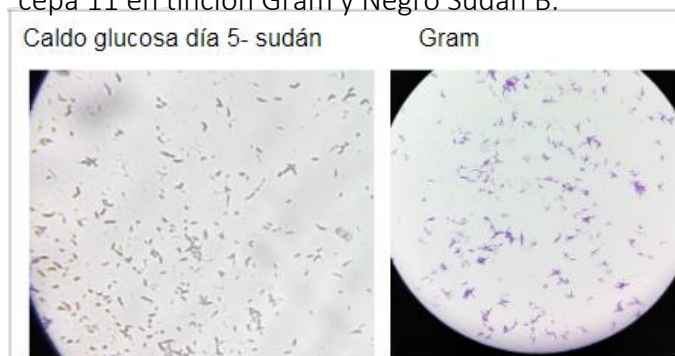
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 72.** Evaluación Cepa 11 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



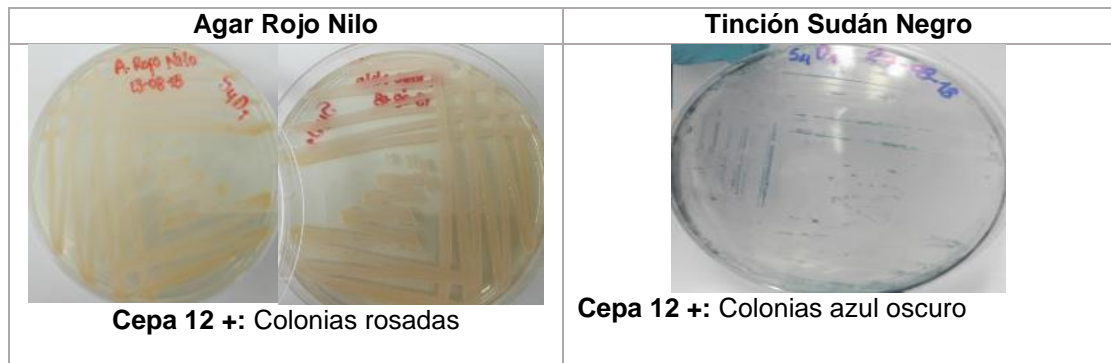
**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 73.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 11 en tinción Gram y Negro Sudán B.



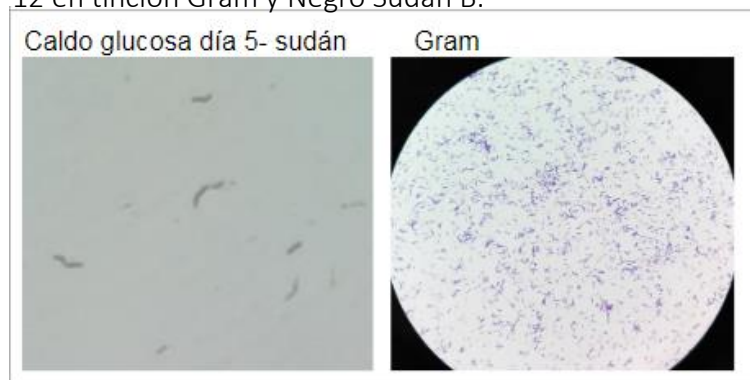
**Fuente:** Elaboración Propia.

Figura 74. Evaluación Cepa 12 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán.



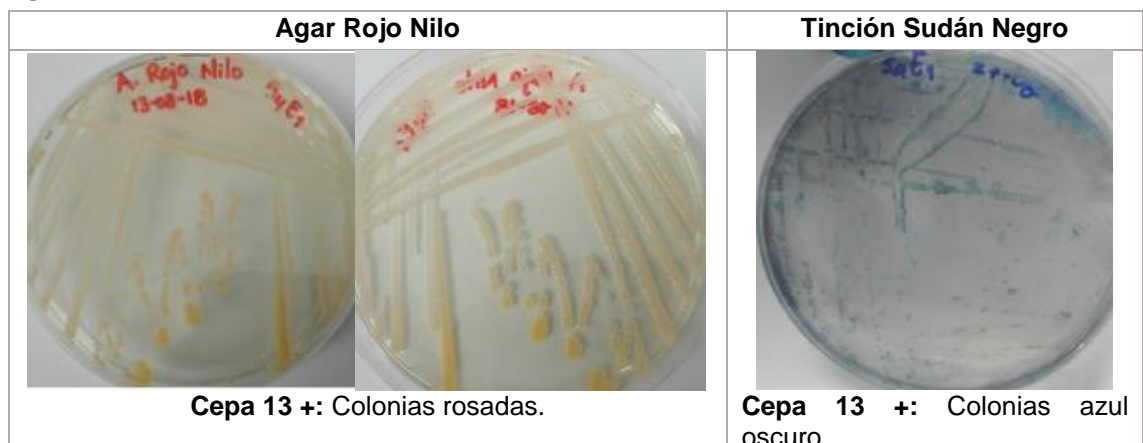
Fuente: Elaboración Propia.

Figura 75. Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 12 en tinción Gram y Negro Sudán B.



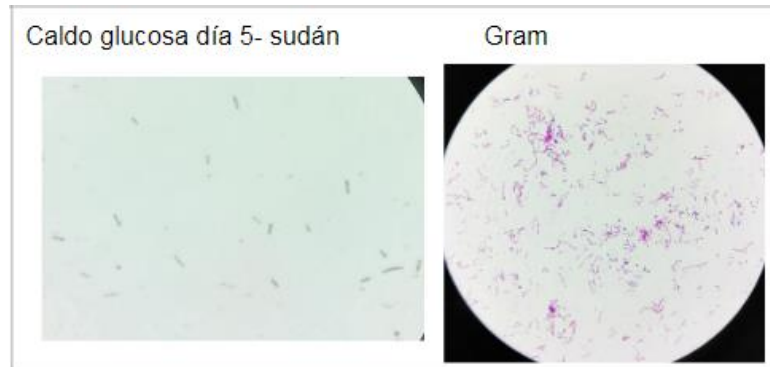
Fuente: Elaboración Propia.

Figura 76. Evaluación Cepa 13 en agar Rojo Nilo y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

**Figura 77.** Evaluación microscópica medio glucosa, cepa 13 en tinción Gram y Negro Sudán B.



Fuente: Elaboración Propia.

## Conclusiones

- Las bacterias que mejor acumulan PHAs en condiciones de exceso de glucosa son las cepas 1, 5, 6 10 y 11. A su vez fueron las cepas que mejor se comportaron en los medios con presencia de acetato.
- De acuerdo con los estudios realizados, las cepas 3, 4, 5 y 6 pertenecen a la misma especie y/o género bacteriano, ya que presentan morfología macroscópica y microscópica muy similar y las condiciones de crecimiento en caldo en cuanto al tiempo y adaptación al acetato se asemejan, además de su crecimiento en agar MacConkey, el cual ayuda a confirmar que las cuatro cepas son bacterias Gram negativas y se presume que hacen parte de las bacterias no fermentadoras de lactosa.
- Las cepas 3, 4, 5 y 6 toleran la temperatura de 37°C, no crecen pero sobreviven al bajar de nuevo la temperatura a 30° C. Las cepas 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 no toleran temperaturas mayores a 30°C, una temperatura de 37°C provoca inmediatamente la muerte de estas cepas bacterianas.
- La cepa 7 resultó negativa en todas las pruebas realizadas en agar Rojo Nilo y en la confirmación en agar con tinción Negro Sudán B.

## Recomendaciones

- Se considera pertinente identificar las cepas, ya que las características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas son deficientes para llegar a un género bacteriano, y así poder discriminar que sean o no las mismas especies.
- Se deben seguir con los estudios de estas cepas modificando las condiciones de crecimiento como la aireación, la agitación y los nutrientes, para determinar la mejor metodología que optimice la acumulación de PHAs por estas cepas bacterianas.
- Se debe confirmar si las cepas 3, 4, 5 y 6 son Gram negativas o positivas debido a que no se pudo detallar en la observación microscópica realizada.

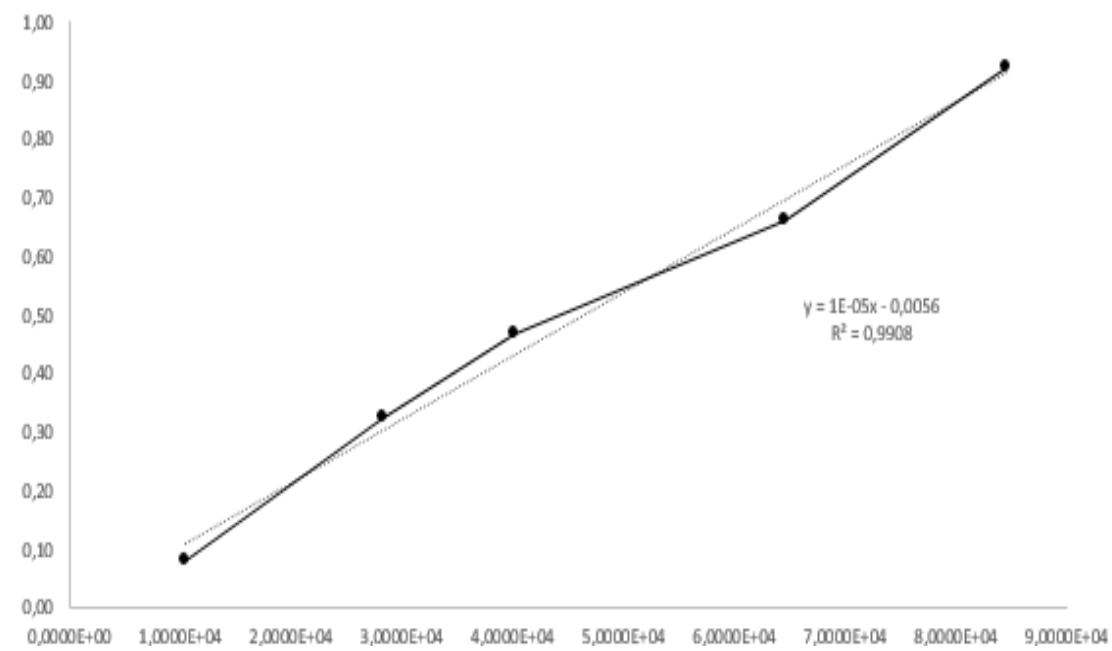
## Referencias

1. Cardona EA, Mora MA, Marín MM. Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar [Internet]. 2013 [citado 28 nov 2018] 66(2): 7129-7140 Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v66n2/v66n2a13.pdf>
2. Ecoinventos. Bioplásticos: La única alternativa para el futuro. [Internet]. 2016 [citado 28 nov 2018] Disponible en: <https://ecoinventos.com/bioplasticos/>
3. EcoInteligencia. La contaminación del plástico no entiende de fronteras. [Internet]. 2013 [citado 28 nov 2018] Disponible en: <https://www.ecointeligencia.com/2013/09/contaminacion-plastico-fronteras/>

## ANEXO D.

### CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA CEPA 6

**Gráfica 33.** Curva calibración cepa 6 (Absorbancia Vs Concentración en células/ ml).

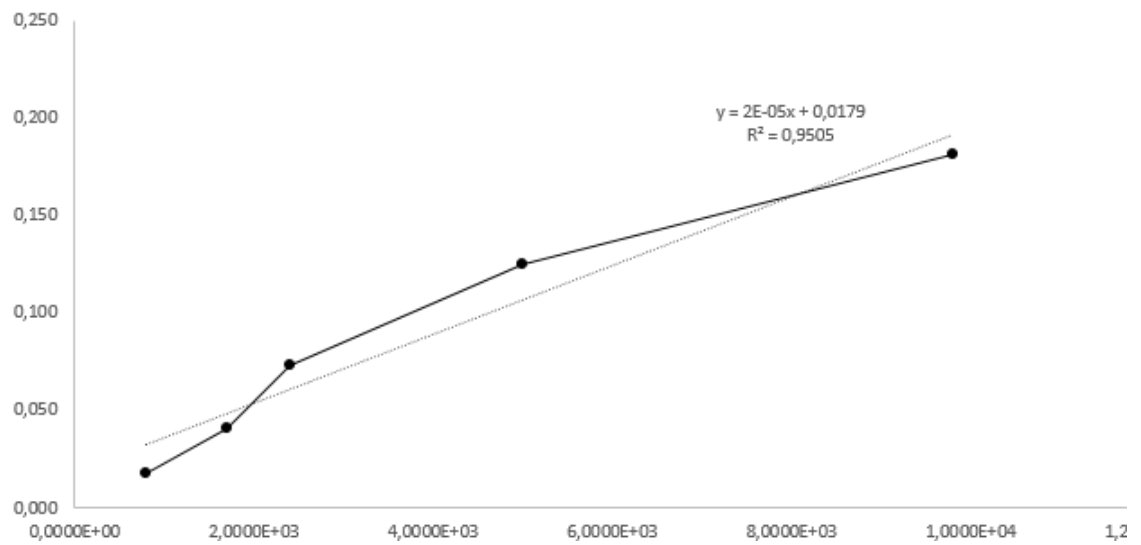


**Fuente:** Elaboración propia.

## ANEXO E.

### CURVA DE CALIBRACIÓN MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS SP.*

**Gráfica 34.** Curva calibración microalga (Absorbancia Vs Concentración en células/ml).



Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO F.

### PROTOCOLOS PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO USADOS EN BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA (GRESIA).

- Protocolo para preparación de medios de cultivo para evaluar bacterias productoras de polihidroxicanoatos y adicionar Rojo de Nilo como indicador de fluorescencia.

#### ❖ COMPONENTES:

- 8 gramos de agar nutritivo.
- 15 gramos de agar-agar.
- 10 ml de glucosa (reactivo debe estar preparado a 100% (p/v) y filtrado de forma estéril antes de agregarlo).

\*Cantidades por litro.

\*Tener en cuenta el volumen final de medio preparado y la cantidad de solución de glucosa a adicionar para mantener la relación, por ejemplo para 1L de medio se pesa la cantidad del agar nutritivo y agar-agar para 1L de solución pero se hidratan en 90 ml de agua destilada y se autoclavan, posteriormente se agregan los 10 ml de glucosa al 100% (p/v) para obtener el volumen a 1 L.

❖ **PREPARACIÓN:** Se agregan los componentes, exceptuando la glucosa, en un litro de agua destilada para hidratarlos, y se disuelven en la mezcla posteriormente se autoclavan a 15 libras, 121°C durante 15 minutos para esterilizarlos. Sí se requiere realizar confirmación de producción de PHA para bacterias se le adiciona colorante como se describe a continuación. Se agregan 500 µL del colorante Rojo Nilo al medio (cantidad para 1L de medio) y la cantidad de glucosa al 100% (p/v), el colorante y la glucosa se agregan a medio a 40°C. Luego servir los medios en las cajas de Petri estériles, hasta aproximadamente la mitad de la caja.

❖ **PREPARACIÓN DE ROJO NILO A UNA CONCENTRACIÓN DE 0,5 µg/ML:** Se pesan 0,0005 mg de colorante Rojo de Nilo en polvo y se agregan a 500 µL de DMSO, en un frasco ámbar, se agita bien, y posteriormente se agregan al medio autoclavado, cuando esté a 40°C.

- Protocolo para preparación de medios de cultivo para evaluar bacterias productoras de polihidroxicanoatos, para realizar la tinción con Negro Sudán B.

❖ **COMPONENTES**

- 10 gramos de glucosa
  - 10 gramos de peptona
  - 5 gramos de cloruro de sodio
  - 15 gramos de agar-agar
- \*Cantidades por litro.

❖ **PREPARACIÓN:** Se agregan los componentes en un litro de agua destilada para hidratarlos, se disuelven y posteriormente se autoclavan a 15 libras, 121°C durante 15 minutos. Luego servir los medios en las cajas de Petri estériles, hasta aproximadamente la mitad de la caja.



## ANEXO G.

### TÉCNICA BASADA EN NEGRO DE SUDAN PARA LA DETERMINACIÓN DE PHA

#### Preparación de sudan negro al 0.3

1. Para prepara 50 mL se pesan 0.15 g de sudan negro B, y se le adicionan 50 mL de etanol al 70 %
2. Filtrar la tinción con una membrana

#### Preparación de etanol al 70 %

1. Adicionar 35 mL de etanol al 96 %+ 15 mL de agua destilada

#### Técnica de Negro Sudán B en eppendorf

**Nota:** Tiempo de duración 2 horas

1. Cultivar 100 mL de la muestra en caldo nutritivo con glucosa
2. Sacar 1 mL de la muestra obtenida
3. Colocar la muestra obtenida en un tubo eppendorf
4. Centrifugar durante 10 minutos
5. Observar la formación del pellet
6. Descartar el sobrenadante
7. Adicionar 440  $\mu$ L de sudan negro al 0.3 %
8. Dejar incubar durante 20 minutos a 37<sup>a</sup>C con agitación constante
9. Centrifugar durante 10 minutos
10. Descartar el sobrenadante
11. Adicionar 450  $\mu$ L de agua destilada y resuspender.
12. Centrifugar a durante 10 minutos.
13. Descartar el sobrenadante.
14. Repetir pasos 10 y 11, hasta completar tres lavados con agua destilada.
15. Adicional 1 mL de agua destilada.
16. Homogeneizar la solución con ayuda del vórtex.
17. Medir en el espectrofotómetro a 580 nm, diluyendo la muestra 1:10 (2700  $\mu$ L de agua destilada + 300  $\mu$ L de la muestra).

**Nota:** Dejar calentar el espectrofotómetro durante 20 minutos, ya que si no se hace puede alterar la lectura.