

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

**LISETH CAMILA FONSECA AMAYA
MARÍA FERNANDA SÁNCHEZ BEDOYA**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2019**

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

**LISETH CAMILA FONSECA AMAYA
MARÍA FERNANDA SÁNCHEZ BEDOYA**

**Proyecto integral de grado para optar al título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director:
Héctor Javier Luna Wandurraga
Doctor en Ingeniería**

**Codirectora:
Diana Milena Morales Fonseca
Magister en Ingeniería Química**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D. C.
2019**

Nota de aceptación

Ing. Adriana Inés Paez Morales

Firma Jurado 1

. Ing. Duvian Alberto Vera Romero

Firma Jurado 2

Bogotá D. C. Agosto de 2019.

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente institucional y rector del claustro

Dr. MARIO POSADA GARCIA-PEÑA

Vicerrector de desarrollo y recursos humanos

Dr. LUÍS JAIME POSADA GARCÍA- PEÑA

Vicerrectora académica y de posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano general (e) facultad de ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa ingeniería 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.**DEDICATORIA**

A Dios por brindarme salud, fortaleza, optimismo y calma no sólo durante la elaboración de este trabajo, sino también a lo largo de la carrera, a mi abuelo por creer siempre en mi y motivarme a ser mejor todos los días, a mis tías por su apoyo en el cumplimiento de mis metas, a mi mamá y mi hermana por enseñarme disciplina y orden en mi vida. A Camila Fonseca por su comprensión, trabajo en equipo y entusiasmo en momentos difíciles durante el desarrollo del proyecto. A Andrés Felipe Orozco por su apoyo incondicional y optimismo para la culminación del presente, finalmente al cuerpo docente de la Universidad de América por brindarme una excelente formación como profesional, para afrontar cualquier reto.

Gracias.

María Fernanda Sánchez Bedoya

Este trabajo de grado, elaborado con mucho esfuerzo y dedicación en conjunto con María Fernanda Sanchez Bedoya, lo dedico en primer lugar a Dios, por bendecirnos todos los días y acompañarnos en cada etapa del proceso. En segundo lugar, a mi familia hermosa incondicional que siempre me ha inculcado el estudio y me ha apoyado en todas mis metas, al nunca dejarme decaer y solucionar de la mejor manera las barreras, pues sin esos empujones de verraquera y animo no hubiera podido ver este gran proyecto. En tercer lugar, a mi compañera María Fernanda Sanchez Bedoya al inculcarme orden y consistencia, brindarme fortaleza y animo en los momentos difíciles, compartir su sabiduría y mantener siempre una actitud de amistad junto con la constancia del trabajo en equipo. Gracias a Fabian Camilo Otalora Tapiero, por llegar en el momento indicado y brindarme su apoyo.

Liseth Camila Fonseca Amaya

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

Dios por brindarnos siempre la fortaleza, salud y sabiduría para afrontar cada reto que se nos presentó durante la elaboración del presente trabajo.

La Fundación Universidad de América por la completa formación a nivel técnico y ético en la profesión de ingeniería química.

La Universidad Antonio Nariño por abrir las puertas de sus instalaciones para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo y su disposición de colaboración.

Al PhD Héctor Javier Luna por sus enseñanzas, su apoyo incondicional, sus consejos, correcciones y guía a lo largo de este proyecto.

A MEng. Diana Milena Morales por sus aportes en conocimiento, su apoyo, ánimo brindado y continua comunicación durante todo el proyecto de grado.

Al ingeniero Fabián Camilo Otalora Tapiero por su colaboración, apoyo y aportes durante el desarrollo experimental.

Al ingeniero Andrés Valderrama por su colaboración y enseñanzas en automatización.

A la ingeniera Jineth Arango Oviedo por sus apreciaciones, guía y apoyo durante el proyecto.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
OBJETIVOS	21
1.GENERALIDADES	22
1.1 BIOPOLÍMEROS - POLIHIDROXIALCANOATOS	22
1.1.1 Composición	22
1.1.2 La biodegradabilidad	23
1.2 METABOLISMO DE SÍNTESIS DE PHA	24
1.3 PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE ACUMULAN PHA	25
1.4 BIORREFINERÍAS	27
1.4.1 Tipos de biomasa	28
1.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE CULTIVO PURO	29
1.6 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE CULTIVO MIXTO	29
1.7 PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE PHA	30
1.7.1 Etapa acidogénica para la obtención de AGV	30
1.7.2 Etapa de selección de bacterias acumuladoras de PHA	31
1.7.3 Etapa de acumulación de PHA	31
1.7.4 Configuraciones y modos de operación más usados	31
1.7.5 Estrés de bacterias mediante el proceso de abundancia y hambruna (feast and famine)	32
2.MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 MATERIALES	34
2.1.1 Lodo activado	32
2.1.2 Ácido acético	34
2.1.3 Melaza	34
2.2 EQUIPOS	34
2.3 MÉTODOS	37
2.3.1 Identificación de los parámetros de operación	37
2.3.2 Determinación de los tiempos de abundancia y hambruna	38
2.3.3 Operación en SBR	39
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
3.1 ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO	40
3.2 SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN	41
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL LODO	41
3.3.1 Diluciones seriadas del lodo activado	42
3.3.2 Preparación y siembra en medio Rojo Nilo	42
3.3.3 Preparación y siembra en medio Negro Sudán	43

3.3.4 Preparación y siembra en medio nutritivo	43
3.3.5 Elaboración de tinción de Gram	44
3.4 ACONDICIONAMIENTO DEL LODO	44
3.4.1 Inoculo del primer sistema	44
3.4.2 Inóculo del segundo sistema	45
3.4.3 Seguimiento de sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) e índice volumétrico de lodos (IVL)	46
3.4.4 Alimentación con macro y micronutrientes	48
3.5 DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE ABUNDANCIA Y HAMBRUNA	49
3.5.1 Inoculación de los reactores air-lift (cuatro)	50
3.5.2 Preparación de sustratos de 1600mgDQO/L	50
3.5.2.1 Curva de calibración de DQO	51
3.5.2.2 Cantidades de melaza y vinagre para la preparación de los sustratos	51
3.5.3 Seguimiento al crecimiento de la microbiota total y productora de PHA	52
3.5.4 Medición del oxígeno disuelto	52
3.6 OPERACIÓN EN SBR DE LOS BIORREACTORES SELECTORES	53
3.6.1 Inoculación de los 4 biorreactores y preparación de los sustratos	53
3.6.2 Seguimiento de oxígeno disuelto en los reactores	54
3.6.3 Seguimiento de la selección de biomasa durante los tiempos de abundancia y hambruna	54
3.6.4 Medición del consumo de los sustratos	54
4. ANÁLISIS Y RESULTADOS	56
4.1 SELECCIÓN DE PARÁMETROS	56
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LODO	68
4.3 ACONDICIONAMIENTO DEL LODO	74
4.4 DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE ABUNDANCIA Y HAMBRUNA	80
4.4.1 Inoculación de los cuatro reactores selectores	80
4.4.2 Seguimiento al crecimiento de la microbiota total y productora de PHA	81
4.4.3 Medición de oxígeno disuelto	85
4.5 OPERACIÓN EN MODO SBR	90
4.5.1 Comportamiento con ácido acético	90
4.5.2 Comportamiento con la mezcla ácido acético- melaza	93
4.5.3 Comparación de la selección entre sustratos	98
5. CONCLUSIONES	102
6. RECOMENDACIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	110

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura química del Polihidroxicanoato (PHA). El asterisco denota el centro quiral del bloque de construcción del PHA.	22
Figura 2. Vías de biosíntesis de PHA. Las líneas punteadas representan rutas putativas. Los números representan las enzimas implicadas en las reacciones químicas	25
Figura 3. Métodos empleados para cumplir el primer objetivo	38
Figura 4. Determinación de tiempos de abundancia y hambruna	39
Figura 5. Operación en SBR	37
Figura 6. Metodología del análisis bibliométrico	40
Figura 7. Caracterización del lodo	42
Figura 8. Acondicionamiento del lodo	44
Figura 9. Determinación tiempos de abundancia y hambruna	50
Figura 10. Operación en SBR de los biorreactores selectores	53
Figura 11. Representación esquemática de la producción de PHA a partir de diferentes ácidos grasos	86

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Especies acumuladoras de PHA aisladas	25
Cuadro 2. Equipos	34
Cuadro 3. Título de artículos analizados	57
Cuadro 4. Consolidación información de los artículos (*)	58
Cuadro 5. Parámetros y valor.	60
Cuadro 6. Parámetros utilizados en investigaciones de la Universidad Antonio Nariño.	64
Cuadro 7. Parámetros para operación de los airlift	65
Cuadro 8. Caracterización macro/micro de cepas aisladas del lodo activado	71
Cuadro 9. Características de sedimentación de lodos activados con relación al IVL	78

LISTA DE FOTOS

	pág.
Foto 1. Inóculo del primer sistema	45
Foto 2. Inóculo del segundo sistema	46
Foto 3. Reactores air-lift	66
Foto 4. Pantalla de control para etapas de SBR	67
Foto 5. Comparación de diluciones 1×10^{-1} y 1×10^{-4} del lodo activado, en tinción rojo Nilo	69
Foto 6. Cepa patrón, en tinción rojo Nilo	69
Foto 7. Resultados de las cepas aisladas, en tinción Negro Sudán	70
Foto 8. Aspecto del segundo sistema de lodos activados, antes (izquierda) y después (derecha) de controlarse el bulking	80
Foto 9. Crecimiento de biomasa durante ciclo 2, con sustrato ácido acético	82
Foto 10. Crecimiento de la biomasa durante Ciclo 2, con sustrato M+H.Ac	83

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Trazabilidad de SSV, para el primer sistema de lodos activados Vs el tiempo	75
Gráfica 2. Trazabilidad de SSV, para el segundo sistema de lodos activados	76
Gráfica 3. Diagrama de cajas y bigotes con los resultados obtenidos para sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV)	77
Gráfica 4. Trazabilidad del índice volumétrico del primer sistema de lodos activados Vs tiempo de operación	78
Gráfica 5. Trazabilidad del índice volumétrico de lodos vs el tiempo de operación del segundo sistema de lodos activados inoculado	79
Gráfica 6. Crecimiento de biomasa en el tiempo, para el ciclo dos, operando con sustrato ácido acético	81
Gráfica 7. Crecimiento de biomasa en el tiempo, para C2, operando con sustrato ácido acético-melaza	83
Gráfica 8. Porcentaje de B.PHA con respecto a Bm.noPHA, en C2	84
Gráfica 9. OD durante C7, con sustrato ácido acético	86
Gráfica 10. OD para el sustrato ácido acético-melaza, en C ₈	87
Gráfica 11. pH (izq), T (der), sustrato H.Ac C7 (sup), M+ H.Ac C8 (inf)	88
Gráfica 12. OD (sup, izq), pH (sup, der), DQO (inf, izq) y comportamiento de biomasa (inf, der). En C ₅ , sustrato H.Ac	91
Gráfica 13. OD (sup, izq), DQO (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y pH (inf, der). En C ₇ , sustrato H.Ac	92
Gráfica 14. DQO (izq), Comportamiento de biomasa (der). En C ₉ , sustrato H.Ac	92
Gráfica 15. OD (sup, izq), pH (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y En C ₃ , sustrato H.Ac.+ M	94
Gráfica 16. OD (sup, izq), DQO (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y pH (inf, der). En C ₃ , sustrato M + H.Ac	96
Gráfica 17. DQO (izq), Comportamiento de biomasa (der). En C ₇ , sustrato M + H.Ac	97
Gráfica 18. OD (sup, izq), pH (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y DQO (inf, der). En C ₉ , sustrato M + H.Ac	98
Gráfica 19. Comportamiento de la biomasa de S3 (der) y S4 (izq.), con sustrato M + H.Ac	99
Gráfica 20. Comportamiento de la biomasa de S1 (der) y S2 (izq.) con sustrato H.Ac	100

ABREVIATURAS

AGV: Ácido Graso Volátil

B.PHA: bacterias productoras de PHA

Bm.noPHA: biomasa no productora de PHA (no presentan coloración en medio rojo Nilo)

C_n: ciclo n (número del ciclo)

CSRT: Reactor Continuo de Tanque Agitado

DMSO: dimetilsulfóxido

DQO: Demanda Química de Oxígeno

F/F: relación tiempo de abundancia y hambruna

F/M: relación alimento por microorganismo

g: gramos

H.Ac: ácido acético

h: horas

HRT: Tiempo de Retención Hidráulico

IVL: Índice Volumétrico de Lodos

KJ/mol: kilojulios/moles

L: litros

M + H.Ac: mezcla ácido acético con melaza

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

OD: Oxígeno Disuelto

PHA: polihidroxicanoatos (biopolímero intracelular)

PHB: polihidroxiacetato

PVC: policloruro de vinilo

SBR: Reactor Secuencial por Lotes (modo de operación)

S_n: reactor selector (n, número)

SRT: Tiempo de Retención de Lodos

SST: Sólidos Suspendidos Totales

SSV: Sólidos Suspendidos Volátiles

UAN: Universidad Antonio Nariño

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

v/v: volumen a volumen

V_{vm}: volumen de aireación/ volumen del reactor * min

%: porcentaje

°C: grados Celsius

μL: microlitros

GLOSARIO

ABUNDANCIA (feast): condición de exceso de sustrato o alimento en el reactor para aumentar el crecimiento de biomasa.

AIREACIÓN: método para proporcionar un mezclado o agitación en el interior del biorreactor con la finalidad de aumentar la transferencia de oxígeno y de masa.

ETAPA DE SELECCIÓN: subproceso utilizado en la producción de PHA que tiene como objetivo la selección de la biomasa acumuladora del biopolímero empleando una condición de estrés en las bacterias.

HAMBRUNA (famine): condición de estrés para las bacterias que han sido inoculadas, en la cual se limita el sustrato, con el fin de ejercer una presión selectiva sobre el sistema que conlleve a la acumulación del biopolímero como metabolito intracelular.

LODOS ACTIVADOS: proceso principalmente utilizado para el tratamiento de aguas residuales, el cual se caracteriza por poseer una gran variedad de microorganismos (cultivo mixto) y realizar uniones de flocs por polímeros orgánicos producidos y fuerzas electrostáticas.

PRESIÓN SELECTIVA: causa o estímulo que produce la reducción en la reproducción de una especie bacteriana o varias al interior del reactor, generando la selección de un tipo de biomasa en específico.

SBR: *sequential batch reactor*, modo de operación para reactores, el cual consta de diferentes etapas en serie que se realizan en un mismo equipo.

RESUMEN

En la búsqueda de biomateriales que desplacen el uso de plástico convencional, el cual posee un grave problema de acumulación en el medio ambiente debido a su baja biodegradabilidad, los polihidroxicanoatos producidos a partir de bacterias, ofrecen una alternativa como material biodegradable, puesto que en su producción se emplea biomasa de segunda generación (residuos agroindustriales) como sustrato y como fuente de cultivo mixto, lodos activados, provenientes del tratamiento de aguas residuales, reuniendo cada una de las etapas de su producción, bajo el concepto de biorrefinería, permitiendo la transformación de residuos en un biomaterial de valor agregado. Sin embargo, este sistema se encuentra en constante estudio, buscando la reducción de sus costos de manufactura.

Por lo tanto, en el presente trabajo de grado se estudió una de las etapas empleadas para la producción de este biopolímero llamada etapa de selección, la cual busca acumular la mayor cantidad posible de bacterias acumuladoras del biopolímero provenientes de un lodo activado de un sistema de tratamiento de aguas, analizando y comparando como se desarrolla este proceso al emplear un sistema alimentado únicamente con ácido acético proveniente del vinagre y otro con la mezcla ácido acético-melaza. El trabajo se desarrolló de forma experimental en los laboratorios de la Universidad Antonio Nariño, ejecutando técnicas como extensión en placa para el recuento de colonias acumuladoras del biopolímero, titulación de ácidos grasos volátiles (AGV) y DQO por *standard methods* para el monitoreo del consumo de los sustratos, medición de sólidos suspendidos volátiles para el seguimiento del crecimiento de biomasa en los sistemas de lodos activados al igual que el índice de sedimentación, encontrando que el proceso de selección produjo mejores resultados en el sistema alimentado con el sustrato ácido acético, hallando al final de la experimentación que el 44% de la biomasa total pertenecía a bacterias productoras del polihidroxicanoato, contra un 10% producido en el sustrato combinado.

Palabras clave: lodo activado, etapa de selección, PHAs, *air-lift*.

ABSTRACT

In the search for biomaterials that displace the use of conventional plastic, which has a serious problem of accumulation in the environment due to its low biodegradability, the polyhydroxyalkanoates produced from bacteria, offer an alternative as biodegradable material, since their production uses second generation biomass (agroindustrial waste) as a substrate and as a source of mixed cultivation, activated sludge from the treatment of waste water, bringing together each stage of its production, under the concept of biorefinery, allowing the transformation of waste into a biomaterial of added value. However, is in constant study, seeking to reduce their production costs.

Therefore, in the present grade work one of the stages used for the production of this biopolymer called the selection stage was studied, which seeks to accumulate as much biopolymer bacteria as possible from an activated sludge in a water treatment system, analysing and comparing how this process develops by using a system fed only with acetic acid from vinegar and another with acetic acid-molasses mixture. The work was carried out in an experimental way in the laboratories of the Antonio Nariño University, executing techniques like extension in plate for the counting of accumulating colonies of the biopolymer, titration of volatile fatty acids (VFA) and COD by standard Methods for the monitoring of substrate consumption, measurement of volatile suspended solids for the monitoring of biomass growth in activated sludge systems as well as the sediment index, finding that the selection process produced better results in the system fed with the acetic acid substrate, finding at the end of the experiment that 44% of the total biomass belonged to bacteria producing polyhydroxyalkanoate, against 10% produced in the combined substrate.

Keywords: activated sludge, selection stage, PHAs, air-lift

INTRODUCCIÓN

La alta demanda de los plásticos se ha traducido en uno de los problemas ambientales de mayor impacto en los ecosistemas y la salud humana, puesto que los residuos de plásticos, se acumulan en gran proporción no solo en el océano pacífico¹, sino en los suministros de agua potable en forma de microplásticos², como consecuencia a su baja degradabilidad.

En la búsqueda de biomateriales que no afecten la producción de la industria plástica, se crea la necesidad de desarrollar nuevas rutas de producción³, donde surgen las biorrefinerías como sustitutos a los procesos derivados del petróleo, las cuales tienen como fin transformar biomasa de manera sustentable en bioproductos o biomateriales que sustituyen muchos de los productos que se encuentran actualmente en el mercado, sin embargo, esta alternativa posee elevados costos de producción comparado con los polímeros convencionales, US\$ 0.60-0.87/lb mientras el costo de los biopolímeros (PHA) están alrededor de US\$ 2.25-2.75/lb⁴, a pesar de dicho costo, mediante esta forma de producción se minimiza las corrientes de desechos finales.

Para ello bajo el concepto de biorrefinería el grupo de investigación GRECIA de la UAN, al igual que investigadores en el mundo⁵, para evitar los costos de cepas puras y/o recombinadas, junto con los costos de esterilidad que estas requieren, se avanza en estudios que aprovechan la biomasa residual de otros procesos, juntando tres etapas claves, la primera es la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en reactores anaerobios, la segunda es de selección de biomasa con capacidad de almacenar PHA utilizando los AGV generados en la primera etapa e implementando una dinámica de abundancia y hambruna (*Feast and Famine*) donde en la fase Famine solo sobreviven los microorganismos capaces de tomar los AGV como fuente de carbono y la última es de acumulación que utiliza la biomasa seleccionada en la segunda etapa.

Como factor que afecta la productividad de este proceso, se encuentra la obtención de una buena selección con gran cantidad de bacterias acumuladoras de PHA y el

¹ LEBRETON, L., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *En: Scientific reports*. [en línea], 2018, marzo. 8, no. 1, p. 4666

² Tyree Chris and Morrison Dan. Invisibles, El plástico dentro de nosotros. [1]. [Consultado el oct 12,2018]. Disponible en: http://orbmedia.org/stories/EI_pl%C3%A1stico/multimedia

³ DIAS, João M. L., et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *En: MACROMOLECULAR BIOSCIENCE*. Nov 9, .vol. 6, no. 11, p. 885-906

⁴ JOHNSTON, Brian, et al. The Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates from Waste Polystyrene Fragments Attained Using Oxidative Degradation. *En: POLYMERS*. Aug 29, .vol. 10, no. 9, p. 957

⁵ OLIVEIRA, Catarina S. S., et al. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *En: NEW BIOTECHNOLOGY*. Jul 25, .vol. 37, no. Pt A, p. 69-79

monitoreo preciso de estas dentro del reactor³, por lo cual en el presente trabajo de grado se evaluó la influencia de la melaza en esta etapa, a partir de un cultivo mixto en un reactor *air-lift*.

Para ello, se recopiló la mayor cantidad de información sobre los parámetros de operación del reactor, mediante un análisis bibliométrico, ampliamente estudiado por el PhD. Héctor Javier Luna, posteriormente se determinó el tiempo de abundancia mediante el seguimiento del oxígeno disuelto y el tiempo de hambruna (tiempo mediante extensión en placa, finalmente por duplicado operando en modo SBR, se comparó la selección con sustratos ácido acético y la combinación de este con melaza, este último con una proporción de 40% ácido acético y 60% melaza. Al delimitar la investigación a la etapa de selección, no fue objeto de estudio la cantidad o tipo de PHA almacenado, al igual que la identificación taxonómica de la biomasa, pero sí de la macro y microscópica de las bacterias productoras del biopolímero.

Al utilizar un cultivo mixto y simular la corriente de AGV provenientes de la primera etapa, se evaluó si es necesario retirar por completo los azúcares residuales de esta corriente, se visualizó el efecto de los parámetros que se utilizan con mayor frecuencia hasta el momento en las investigaciones y se comprobó la fiabilidad de las técnicas rojo Nilo y negro sudan, para la identificación rápida de las bacterias productoras de PHA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar 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*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los parámetros de operación en un reactor SBR, para la selección de bacterias acumuladoras de PHA en un cultivo mixto.
- Establecer los tiempos de Abundancia y Hambruna de un ciclo, usando como sustrato ácido acético y ácido acético/melaza, para la selección de bacterias acumuladoras de PHA.
- Determinar el comportamiento en la selección de bacterias acumuladoras de PHA, al operar en modo SBR con ácido acético como sustrato.
- Contrastar el comportamiento de la selección de bacterias acumuladoras de PHA, al operar en modo SBR con ácido acético/melaza como sustrato.

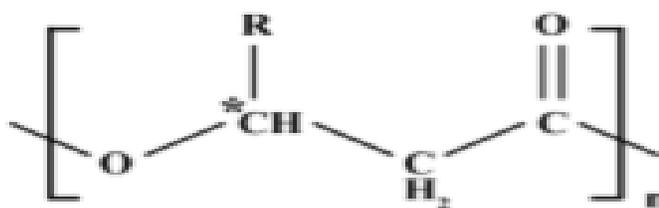
1. GENERALIDADES

1.1 BIOPOLÍMEROS - POLIHIDROXIALCANOATOS

Los Polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros producidos naturalmente por diferentes tipos de bacterias como reservas naturales de carbono y energía. El más abundante PHAs encontrado es el homopolímero poli(3-hidroxicbutirato) (PHB) desde 1926 en el estudio de Lemoigne⁷ los PHA han llamado el interés como bioplástico debido a que estos exhiben propiedades termoplásticas y elastómeras, no son tóxicos, son biocompatibles, son obtenidos de reservas renovables y son biodegradables. Además, estos polímeros pueden ser hidrolizados dando como productos monómeros de hidroxí ácidos grasos que pueden servir como elementos para la producción de bioquímicos.

1.1.1 Composición. En cuanto a su composición una molécula de PHA se compone típicamente de 600 a 35,000 (R) -hidroxí unidades de monómero de ácido graso⁶. Cada unidad de monómero alberga un grupo R de la cadena lateral que suele ser un grupo alquilo saturado (Figura 1) pero también puede tomar la forma de grupos alquilo insaturados, grupos alquilo ramificados y grupos alquilo sustituidos, aunque estas formas son menos comunes⁷. Dependiendo del número total de átomos de carbono dentro de un monómero de PHA, PHA puede clasificarse como PHA de longitud de cadena corta (scl-PHA; de 3 a 5 átomos de carbono), PHA de longitud de cadena media (mcl-PHA; 6 a 14 carbonos átomos), o PHA de longitud de cadena larga (lcl-PHA; 15 o más átomos de carbono).

Figura 1. Estructura química del Polihidroxicanoato (PHA). El asterisco denota el centro quiral del bloque de construcción del PHA.



Poly(3-hydroxyalkanoate)

Fuente: GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda, et al. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *En*: Revista internacional de contaminación ambiental. 2013, vol. 29, no 1, p. 77-115.

⁶ KHANNA, S. y SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* 2005, 40, 607–619.

⁷ LU, J.; TAPPEI, R.C.y NOMURA, C.T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* 2009, 49, 226–248.

Por otro lado, una propiedad muy importante del PHA que cabe resaltar, es la biodegradabilidad.

1.1.2 La biodegradabilidad. Es una propiedad que distingue el PHA del plástico proveniente del petróleo; los microorganismos en la naturaleza son capaces de degradar los PHA mediante el uso de PHA hidrolasas y PHAde polimerasas⁸, estas enzimas descomponen el polímero en sus bloques de formación molecular, llamados hidroxiácidos, los cuales son utilizados como fuente de carbono para el crecimiento, de esta manera la biodegradación del biopolímero bajo condiciones aerobias resulta en dióxido de carbono y agua, mientras que a condiciones anaerobias se obtiene como productos de la degradación el dióxido de carbono y metano⁹.

Es por esta razón que el PHA es una excelente alternativa como sustituto a muchos productos en los cuales se emplea el plástico convencional, por ello este tipo de biopolímero exhibe una gran cantidad de aplicaciones dentro de la industria química, farmacéutica e incluso la ingeniería biomédica.

Inicialmente el PHA se utilizaba en embalajes, principalmente en bolsas, recipientes y revestimientos de papel, usos similares a los del plástico común, incluyendo los artículos desechables, como afeitadoras, utensilios, pañales, productos de higiene femenina, envases cosméticos, botellas, entre otros. Además del potencial como material plástico, los PHA también son útiles como compuestos estereo-regulares que pueden servir como precursores quirales para la síntesis química de compuestos ópticamente activos¹⁰. Dichos compuestos se usan particularmente como se usan particularmente como vehículos biodegradables para la dosificación a largo plazo de fármacos, medicamentos, hormonas, insecticidas y herbicidas. También se utilizan como materiales de osteosíntesis en la estimulación del crecimiento óseo debido a sus propiedades piezoeléctricas, en placas óseas, suturas quirúrgicas y reemplazos de vasos sanguíneos. Sin embargo, las aplicaciones médicas y farmacéuticas son limitadas debido a la lenta biodegradación y la alta estabilidad hidráulica en los tejidos estériles¹¹.

⁸JENDROSSEK, Dieter; HANDRICK, René. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 2002, vol. 56, no 1, p. 403-432.

⁹ REDDY, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 87(2), 137-146.

¹⁰ OEDING, V. y SCHLEGEL, H.G., 1973. Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* HI6 and its significance in the regulation of polybeta-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134, 239–248.

¹¹ WANG, J.G. y BAKKEN, L.R., Screening of soil bacteria for polybeta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb. Ecol.* 1998. 35, 94–101.

1.2 METABOLISMO DE SÍNTESIS DE PHA

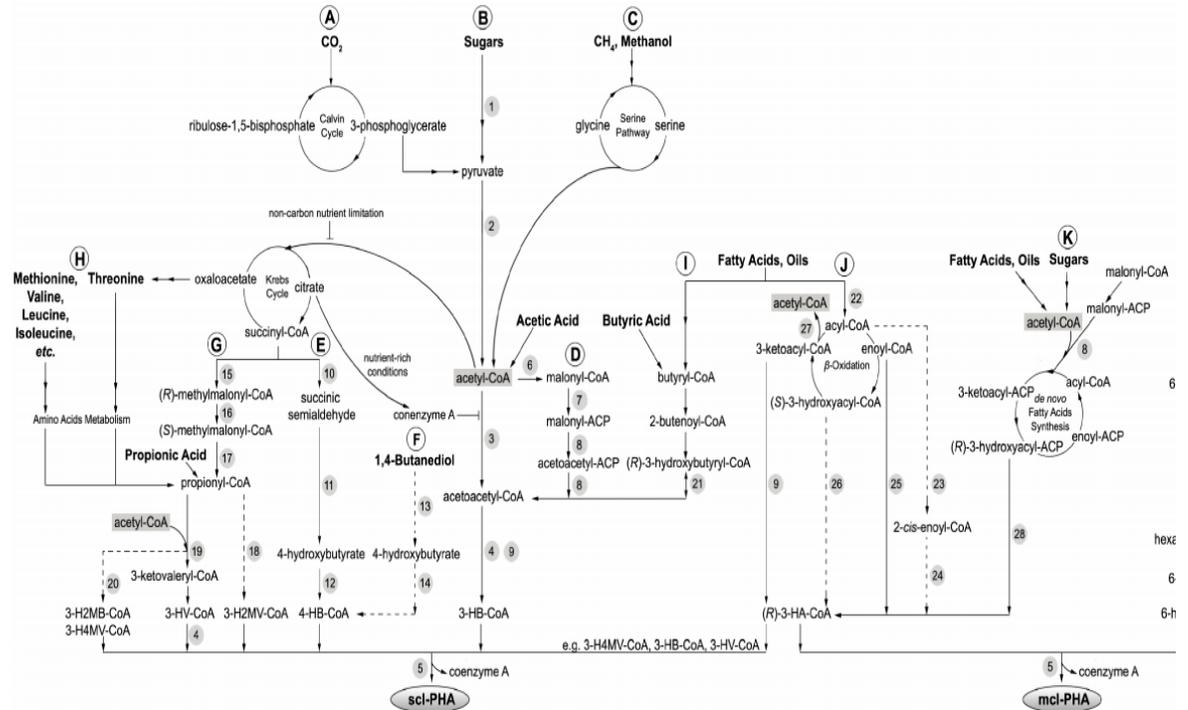
El PHA juega un papel fundamental en la supervivencia de microorganismos ante condiciones de estrés, promoviendo la supervivencia a largo plazo de las bacterias en condiciones de escasez de nutrientes actuando como reservas de carbono y energía. Las vías biosintéticas de la PHA están estrechamente relacionadas con las vías metabólicas centrales de la bacteria, incluida la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -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, la producción de altas cantidades de coenzima A del ciclo Krebs bloquea la síntesis de PHA al inhibir la 3-ketotiolasa (PHA) de modo que el acetil-CoA se canaliza al ciclo Krebs para la producción de energía y el crecimiento celular¹² (Figura 2). Por el contrario, 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^{14,13}. 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.¹⁴

¹² RATLEDGE, C.y KRISTIENSEN, B. Basic Biotechnology, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001.

¹³JUNG, Y.M.y LEE, Y.H. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Biosci. Bioeng.* 2000, 90, 266–270.

¹⁴ 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. *Polymers.* 2014. 6(3), 706-754.

Figura 2. Vías de biosíntesis de PHA. Las líneas punteadas representan rutas putativas. Los números representan las enzimas implicadas en las reacciones químicas.



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.

1.3 PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE ACUMULAN PHA

El avance en la biología molecular ha permitido identificar una serie de especies de bacterias que acumulan el PHA, estas especies son provenientes de diferentes residuos industriales como se muestra en la Cuadro1. Estas bacterias son aisladas lo que quiere decir que pueden acumular el PHA como cultivo puro, pero esto es un avance para realizar algunos ensayos de cultivo mixto e identificarlas en los consorcios. Durante los experimentos de acumulación, los cultivos puros consumen glucosa mientras el consumo de ácido acético fue bajo, aunque ambos siguen la misma ruta metabólica.

Cuadro 1. Especies acumuladoras de PHA aisladas.

Especie	Tipo de PHA	Sustrato
<i>Alcaligenes latus</i> DSM 1124	P(3HB)	Residuo de soya, residuo de malta

Cuadro 1. (continuación)

Especie	Tipo de PHA	Sustrato
<i>Burkholderia</i> sp. USM (JCM 15050)	P(3HB)	Derivados del aceite de palma, ácidos grasos volátiles, glicerol
<i>Comamonas testosteroni</i>	MCL-PHA	Aceite de oliva, aceite de castor
<i>Cupriavidus necator</i>	P(3HB)	Aceite crudo de palma, aceite de oliva, oleína de palma
<i>Cupriavidus necator</i> H16	P(3HB-Co-3HV)	Residuo de glicerol
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	P(3HB)	Aceite ácido de palma, aceite de palma
Recombinant <i>cupriavidus necator</i>	P(3HB-con-3HHx)	Aceite de soya grano

Fuente: AKARAONYE, E; KESHAVARZ, T. y ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. En: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2010, vol. 85, no 6, p. 732-743.

1.4 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PHA Y DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DEL BIOPOLÍMERO

Actualmente existen gran cantidad de métodos y técnicas que gracias al avance de la tecnología permiten una rápida y confiable detección de la inclusión de PHA en los microorganismos, lo cual también posibilita conocer los potenciales microorganismos productores del biopolímero. Sin embargo, todas las técnicas poseen ventajas y limitaciones como se menciona a continuación:

Uno de los métodos más empleados hoy en día es la detección de genes de reacción en cadena de polimerasa (PCR) en este caso del gen *phaC*, la cual posee como ventaja su alta sensibilidad y especificidad, además de su alto rendimiento y pequeñas muestras para su análisis, sin embargo, como todas las técnicas posee limitaciones en cuanto a que los primers son inadecuados para la detección de todos los genes *phaC*, haciendo está más propensa a errores.

Por otro lado una de las técnicas más usadas, tanto por costos como por facilidad es la tinción de rojo Nilo y azul de Nilo A, la cual posee como ventajas la observación directa de células vivas y en crecimiento activo, además se requiere de una muestra pequeña para su elaboración, mientras que por el lado de las desventajas se encuentra que este método no discrimina entre lípidos y PHAs y también es menos

eficaz para distinguir entre cepas negativas a PHA y positivas de PHA de bacterias Gram positivas.

Además, se encuentra la técnica de microscopía de transmisión de electrones la cual permite la visualización directa de la medida del tamaño de los gránulos de PHA, pero la preparación de la muestra es tediosa y durante esta las células mueren, adicionalmente involucra químicos peligrosos y radioactivos.

Otro método empleado actualmente en el ensayo con ácido Crotonico, el cual brinda beneficios como su fácil operación y bajo costo por análisis, adicional a ello es una prueba específica para la determinación de P3HB; sin embargo el resultado obtenido puede tener interferencia como producto de componentes endógenos e interferencia de la matriz, lo cual puede resultar en la sobrestimación del contenido de P3HB y de igual manera es un método que está limitado a la determinación de este copolímero.

En quinto lugar se encuentra la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), esta al igual que las expuestas anteriormente requiere muestras de tamaño muy pequeño, el tiempo de análisis es corto, puede proveer información cuantitativa, además permite el análisis en tiempo real y online del PHAs, sin dejar atrás su alto rendimiento; por otro lado en cuanto a sus desventajas encontramos que el método no puede discriminar entre diferentes unidades monoméricas de PHAs, ni tampoco distingue entre PHAs homogéneo y copolímero de PHAs.

Finalmente se tiene, tal vez uno de los métodos más comunes que es la cromatografía líquida y de gas donde ambas proveen datos tanto cuantitativos como cualitativos de una muestra pequeña y brindan una tentativa a la identificación de nuevos monómeros de PHA mientras que en cuanto a sus limitaciones ambas técnicas son incapaces de distinguir entre polímeros homogéneos de PHA y copolímeros.

1.4 BIORREFINERÍAS

Alrededor del concepto de biorrefinerías, existen varias definiciones, entre las cuales se encuentra, el procesamiento sostenible de la biomasa en un espectro de productos comercializables y energía¹⁵. Esta definición implica que los bienes producidos en una biorrefinería son ambientalmente superiores en comparación con los productos convencionales y portadores energéticos que se pueden sustituir en el mercado.

¹⁵IEA (2008) Bioenergy task 42 on biorefineries, minutes of the third task meeting, international energy agency. Copenhagen, Denmark, 25 and 26 March 2008. www.biorefinery.nl/IEABioenergy-Task42

Entre todas las fuentes de energía renovable, la biomasa es el recurso más grande, más diverso y más fácilmente disponible que ofrece la oportunidad de generar una amplia gama de nuevos polímeros y productos biológicos¹⁶. En los últimos años, se ha realizado extensa investigación sobre la generación de biocombustibles, incluido el bioetanol, el biodiesel y otros productos de base biológica mediante el uso de varias tecnologías emergentes y rutas de conversión. A diferencia de los procesos de refinación de petróleo convencionales, la biorrefinería es una instalación que integra procesos y equipos de conversión de biomasa para producir alimentos, combustibles, productos químicos de valor agregado y energía (energía y calor) a partir de biomasa¹⁷.

El enfoque de la biorrefinería puede ser un buen ejemplo de un proceso multifuncional para generar múltiples productos energéticos y materiales¹⁸, maximizando así el valor económico de la materia prima utilizada y minimizando la producción de flujos de desechos.¹⁹

1.4.1 Tipos de biomasa. Las biorrefinerías pueden sintetizar la biomasa a bioproductos a partir de la biomasa, la cual está clasificada en biomasa de primera generación que son los cultivos como el maíz, la soja, y diferentes granos, la de segunda generación que se basa en los residuos orgánicos y la de tercera generación que son las microalgas²⁰. Los tres tipos de biomasa han enfocado su investigación y desarrollo en la producción de biocombustibles, algunas como la de primera generación ha tenido un impacto negativo debido a la sustitución de cultivos que lleva al monocultivo de las regiones aumentando su valor y llevando a una crisis o desabastecimiento de las principales fuentes de alimento en las comunidades. Esta problemática llevó a su sustitución de dicha materia prima por la de segunda generación que es donde se está desarrollando actualmente las biorrefinerías debido a que además de cerrar el ciclo de vida contribuyen al tratamiento y aprovechamiento de este tipo de residuos. La biomasa de tercera generación está en pleno desarrollo debido al surgimiento de las microalgas que son una abundante fuente de biomasa y que se puede cultivar de forma fácil y económica.²¹

¹⁶CHERUBINI, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 7, 1412–1421

¹⁷SUHAG, M., & SHARMA, H. R. Biorefinery Concept: An Overview of Producing Energy, Fuels and Materials from Biomass Feedstocks

¹⁸CHERUBINI, F., STROMMAN, A.H.y ULGIATI, S. Influence of allocation methods on the environmental performance of biorefinery products-A case study. 2011. *Resources, Conservation and Recycling*, 55, 1070–1077.

¹⁹THOMSEN, M. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. 2005. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 598–606.

²⁰GONZÁLEZ, M, A.y CASTAÑEDA Z, Y. (2008). Biocombustibles, biotecnología y alimentos: Impactos sociales para México. *Argumentos (México, DF)*, 21(57), 55-83.

²¹PINILLA y TORRES, L. *Análisis de tendencias en biocombustibles para la definición de líneas estratégicas de investigación y desarrollo en Colombia* (Master's thesis, Facultad de Estudios Ambientales y Rurales).

1.5 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE CULTIVO PURO

La producción de PHA a partir de cultivo puro surge como respuesta a las necesidades de sustituir la industria de los biocombustibles, el proceso se basa en el metabolismo de algunos microorganismos que pueden almacenar productos de la fermentación de la biomasa como los AGV y sintetizarlos como PHA.

Sin embargo, este proceso no ha alcanzado el punto de equilibrio económico en el mercado debido a que el proceso se basa en un microorganismo específico que tiene un elevado de venta, por ejemplo, la producción comercial de PHB emplea actualmente clases de bacterias genéticamente modificadas, especies de *Escherichia coli* y *Alkaligenes*²². Adicionalmente dentro de las desventajas de la producción de cultivo puro se incluyen los altos costos para los sustratos puros utilizados, los costos de inoculación estéril de las bacterias utilizadas y la operación estéril del proceso de producción final. Por esta razón, se encuentra en investigación el uso potencial de cultivos microbianos mixtos para la producción de PHA a partir de corrientes de desechos que son ricas en compuestos orgánicos²³.

1.6 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRODUCCIÓN DE PHA A PARTIR DE CULTIVO MIXTO

Una de las ventajas de los procesos usando cultivos mixtos radica en que estos pueden usar una amplia variedad de sustratos complejos ricos en nutrientes, ya que, a diferencia de los cultivos puros, el almacenamiento de PHA no es inducido por la limitación de nutrientes. Esto es particularmente ventajoso si las materias primas de residuos industriales contienen compuestos de con una composición indefinida.

Por ello, se han tomado enfoques diferentes, como el estudiado en el artículo "Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications"²⁴, en el cual 5 tipos diferentes de lodos como desechos de cochinilla, incluidos la sangre de cerdo y los desechos metabólicos, lodos principalmente de aguas domésticas, Leche, fango residual de soja con lodo residual de carbohidratos, lodos biológicos filtrados y por último lodos con alta carga en carbohidratos, fueron aisladas por FTIR y posteriormente acondicionadas a diferentes aguas residuales

²² JOHNSTON, Brian, et al. Op. cit., p. XXX.

²³ REIS M, SERAFIM L, LEMOS P, RAMOS A, AGUIAR F y VAN LOOSDRECHT M: Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *En: Bioprocess Biosyst Eng* 2003, 25:377-385.

²⁴ LAM, Wai, et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *En: ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY*. Jul 18, .vol. 38, no. 13-14, p. 1779-1791

como fuente de sustrato, con DBO: 15000 mg/L, DQO: 17000 mg/L, SS: 6000 mg/L, provenientes de industrias alimenticias, que contienen leche, haba de soja y zumo de frutas.

Otro ejemplo de la utilización de diferentes tipos de lodos, provenientes del tratamiento de aguas residuales, es el desarrollado por la empresa PHARIO²⁵ en los países bajos, a escala piloto e industrial. Esta empresa ha encontrado que las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales a gran escala, pueden servir como suministro de biomasa funcional (lodo activado) con capacidades de almacenamiento de PHA, al obtener biomasa con un contenido de PHA de hasta 0.47 gPHA/gVSS, utilizando lodo con alta DQO fácilmente biodegradable.

1.7 PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE PHA

Diferentes tipos de biomasa pueden ser utilizados para la conversión a polímeros, la literatura muestra una cantidad de sustratos reales y sintéticos. Algunos que se pueden tomar de la literatura son AGV especialmente combinaciones de ácido acético con ácido butírico y ácido valérico. Por otro lado, sustratos reales también han sido estudiados, como el suero lácteo, aguas residuales de la industria papelera, melaza, aguas residuales de la industria de la palma de aceite.

1.7.1 Etapa acidogénica para la obtención de AGV. La fermentación acidogénica es la primera fase de la digestión anaerobia, por lo tanto, la fase metanogénica se debe inhibir para que los AGV producidos no sean consumidos. La fase limitante de la fermentación acidogénica es la hidrólisis de compuestos insolubles, por lo tanto, la complejidad del sustrato influye en la producción de AGV, para el caso de fermentación de residuos se debe tener en cuenta el tipo de residuo a utilizar como materia prima.

Existen diversos métodos para evitar la metanogénesis que es el consumo de ácido acético a metano, esto se puede realizar usando estrategias de operación como bajo TRH, baja temperatura, bajo pH o una combinación de lo mencionado. En esta fase es importante conocer la composición de los AGV obtenidos debido a que son utilizados como fuente de carbono en el proceso de acumulación que es donde se sintetiza el PHA y dependiendo de la disponibilidad del tipo de AGV (acético, propiónico, butírico y valérico) se produce el tipo de PHA. Los tipos de PHA van a tener diferentes propiedades mecánicas por lo tanto van a tener una diversidad de

²⁵ WERKER, Alan, et al. Consistent production of high quality PHA using activated sludge harvested from full -scale municipal wastewater treatment – PHARIO, En: Water Science and Technology. Dic 10,. Vol. 78, no. 11, p. 2256-2269

aplicaciones industriales²⁶, evaluaron el efecto del pH en la fermentación de acidogénica de melazas provenientes de la caña de azúcar y encontraron que el pH influye en la composición de los AGV producidos, como conclusión obtuvieron que el tipo de PHA puede ser manipulado y controlado desde la fase de fermentación acidogénica.

1.7.2 Etapa de selección de bacterias acumuladoras de PHA. El proceso de selección de bacterias o microorganismos con capacidad de almacenar PHA en cultivo mixto se realiza operando en el modo de abundancia y hambruna del sustrato, donde ocurre la presión selectiva ya que las bacterias que no acumulan el PHA no pueden utilizarlo como fuente de carbono y energía durante el modo de hambruna. La operación de este proceso se lleva bajo condiciones aerobias en reactores secuenciales donde se lleva a cabo el ciclo de la fase de abundancia y hambruna.

Esta fase es importante porque las bacterias o biomasa seleccionada en esta fase del proceso son utilizadas en el proceso de acumulación para generar o producir el tipo de PHA. La calidad y la cantidad de las bacterias acumuladoras de PHA deben ser de óptima calidad²⁷, debido a que si no cumplen con estas condiciones pueden generar algún efecto en el proceso de acumulación y aumentan los costos de la extracción del PHA.

1.7.3 Etapa de acumulación de PHA. En esta etapa, el inóculo del reactor se realiza con el lodo proveniente de la fase de selección, en esta fase el objetivo es que la biomasa seleccionada aumente la capacidad de almacenamiento de PHA utilizando como fuente de carbono los AGV producidos en la fase de fermentación. Algunos autores presentan que en esta etapa se requiere una limitación de nutrientes mientras que otros muestran que no es necesaria esta limitación, esta discusión es propuesta por Dionisi, et al., los principales parámetros²⁸ para evaluar la eficiencia de esta etapa son contenido celular, la productividad volumétrica y la composición del polímero.

1.7.4 Configuraciones y modos de operación más usados. El proceso de producción de polímeros en sus diferentes etapas se lleva a cabo en reactores que tienen diferentes configuraciones. Los reactores más comunes en la fase

²⁶ALBUQUERQUE, MGE, et al. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. En: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. vol. 130, no. 4, p. 411-421

²⁷CUI, Y, ZHANG, Y, LU, P.y PENG, Z. Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. 2017. *Scientific reports*, 6, 30766.

²⁸ DIONISI, D., CARUCCI, G., PAPINI, M. P., RICCARDI, C., MAJONE, M., y CARRASCO. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water research*, 2005, vol. 39, no 10, p. 2076-2084.

acidogénica son reactores del tipo de mezcla completa (CSTR), los cuales han mostrado buenos resultados, pero pueden ser mejorados con otras configuraciones. Este mismo tipo de reactores se utilizan en la literatura para el proceso de selección²⁹ alimentado de modo secuencial utilizando el concepto de abundancia y hambruna. Para la fase de acumulación se han operado reactores del tipo CSTR²⁶ y batch, ambos operados de modo continuo y discontinuo.

Existen configuraciones de reactores reportadas en la literatura que podrían mejorar la operación y la eficiencia del proceso, este tipo de reactores son el de manto de lodos de flujo ascendente para el caso del proceso acidogénico utilizando lodo granular. Este además de mejorar la eficiencia podría ser más económico y reducir los costos del proceso, el cual consiste en inocular el manto de lodos con lodo granular y alimentar el sustrato de forma ascendente, donde se mejoraría el contacto entre la fase sólida (biomasa) y la fase líquida sustrato, lo cual permitirá reducir el tiempo de retención hidráulico y aumentar la OLR para tratar una mayor concentración y mayor concentración del sustrato (residuo).

Para la fase de selección se podría implementar la configuración air-lift³⁰ alimentado de modo secuencial, las ventajas de este tipo de reactor son que se puede construir a bajo costo y permitirá un mayor mezclado y una mejor transferencia del oxígeno. El reactor air-lift consiste de dos tubos concéntricos donde en el tubo interior se adapta la oxigenación y también se opera de modo secuencial donde también posiblemente contribuirá a la fase de sedimentación que la realizará en menos tiempo.

1.7.5 Estrés de bacterias mediante el proceso de abundancia y hambruna (feast and famine). Los principales factores que afectan el proceso de abundancia y hambruna ³¹durante la operación del reactor selector son: tiempo de retención de lodos (SRT), tiempo de retención hidráulico (HRT), pH, temperatura, longitud del ciclo, carga orgánica, relación carbono nitrógeno.

Para este proceso se sugiere un SRT entre 1 a 20 días, este parámetro es importante debido a que es una medida del inverso de la velocidad de crecimiento, por lo cual se sugiere que sea un valor bajo, algunos autores muestran que valores por encima de 2 días la velocidad de crecimiento de vuelve constante por lo tanto se vuelve independiente a valores altos.

²⁹ALBUQUERQUE, MGE; TORRES, CAV and REIS, MAM. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. En: WATER RESEARCH. vol. 44, no. 11, p. 3419-3433.

³⁰ OLIVEIRA, Catarina S. S., et al. Op. cit., p.

³¹ SALEHIZADEH, H. and VAN LOOSDRECHT, MCM. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. En: BIOTECHNOLOGY ADVANCES. vol. 22, no. 3, p. 261-279

La relación F/F es otro parámetro²⁹ que es utilizado para controlar la selección de los microorganismos acumuladores de PHA, esta puede ser variada por los parámetros de la OLR y la concentración del sustrato. El mecanismo de este modo de operación se basa en la limitación de crecimiento para que los microorganismos logren almacenar el PHA. Por otro lado, la fase de hambruna debe ser un tiempo considerable puesto que, si es muy corta o no se alcanza la limitación del crecimiento, los microorganismos usan la fuente de carbono para crecimiento y no la almacenan. La mayoría de los estudios reportados en la literatura se han llevado a una baja OLR, donde se ha encontrado que la biomasa tiene un buen comportamiento de almacenamiento de PHA. Altas relaciones F/F no favorecen el almacenamiento solo parcialmente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se muestran los principales materiales para llevar a cabo el desarrollo experimental, los equipos que se emplearon para dar cumplimiento a las diferentes actividades planteadas y finalmente los métodos explicados de manera concisa, los cuales se llevaron a cabo para efectuar resultados concretos para cada uno de los objetivos.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Lodo activado. El lodo activado utilizado para la inoculación de los reactores selectores, para el cual se hizo un montaje de sistema de lodos activados, extraído de la PETAR del tratamiento de lavado de canastillas plásticas con residuos de gaseosa, que ya cumplieron su tiempo de vida útil y regresan al proceso para ser convertidas de nuevo en materia prima para la producción de nuevas canastillas, por lo tanto, el agua que se trata en el sistema contiene un bajo contenido de materia orgánica. Adicionalmente la empresa, contrata el servicio de una empresa para que trate los residuos de lodos activados del sistema.

2.1.2 Ácido acético. Para la obtención de este material se empleó el ácido acético existente en el vinagre comercial de cocina, para este caso se empleó marca San Jorge.

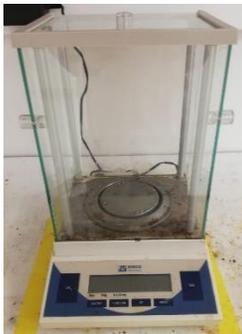
2.1.3 Melaza. Es el residuo de la cristalización del azúcar, se empleó como sustrato tanto para el sistema de lodos activados, como para el sustrato combinado de los reactores selectores, fue suministrada por la Universidad Antonio Nariño, quienes emplean este compuesto para la alimentación de otros reactores de la biorrefinería.

2.2 EQUIPOS

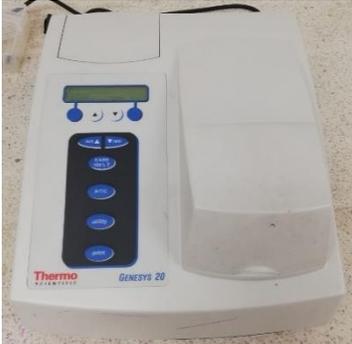
Cuadro 2. Equipos.

Equipo	Procedimiento/ Marca/Modelo	Imagen
Microscopio	Permitió observar los microorganismos a los cuales se les realizó tinción de Gram, para la caracterización microscópica de los mismos. Marca: Leica Modelo MD500	

Cuadro 2. (continuación)

Equipo	Procedimiento/ Marca/Modelo	Imagen
Autoclave	<p>Esteriliza los medios de cultivo antes de la siembra de microorganismos y los instrumentos a utilizar para procesos microbiológicos, emplea una temperatura de 121°C y 15lb de presión.</p> <p>Marca: All American Modelo: 50X-120</p>	
Balanza analítica	<p>Instrumento utilizado para medir el peso de los reactivos y filtros de la prueba de SST y SSV con precisión de 4 cifras decimales.</p> <p>Marca: BOECO Germany Modelo: BBL52</p>	
Incubadora	<p>Equipo que permite el control de la humedad y la temperatura para el crecimiento de un cultivo microbiológico bien sea en caldo o cajas de Petri.</p> <p>Marca: Memmert. Modelo: 100-800</p>	
Horno	<p>Elimina la humedad en cualquier instrumento de laboratorio o muestra, para el trabajo se empleó en la prueba de SSV.</p> <p>Marca: HUMBOLDT Modelo: H-30145E</p>	

Cuadro 2. (continuación)

Equipo	Procedimiento/ Marca/Modelo	Imagen
Sistema de filtración al vacío	Sistema empleado para la filtración de muestras para el análisis de SSV y las pruebas de DQO soluble. Marca: Thomas Modelo: 1630.	
Mufla	Es un horno de calcinación de muestras. Marca E&Q electrónica y química. Modelo MID2,2.	
pH-metro	Es un sensor que mide el pH de diferentes soluciones, se empleó para el ajuste del pH de la solución de alimentación para los biorreactores <i>air-lift</i> y en la titulación de AGVs. Marca: HANNA Modelo: HI2210	
Espectrofotómetro	Instrumento que mide la cantidad de luz absorbida por una muestra que ha sido sometida a un haz de luz a cierta longitud de onda. Se emplea para la medición de absorbancias en la prueba de DQO. Marca: Genesys 20. Modelo: Thermo	

Cuadro 2. (continuación)

Equipo	Procedimiento/ Marca/Modelo	Imagen
Sonda Multiparamétrica	Medidor con sensores de pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura, con capacidad de toma y almacenamiento de estos datos, utilizado para las mediciones en el segundo, tercer y cuarto objetivo. Marca: HANNA Modelo: HI9829	
Reactor DQO	Instrumento utilizado para completar la reacción de oxidación en la medición de DQO por standard methods 5220-D Marca HANNA Modelo: HI839800	

Fuente: elaboración propia.

2.3 MÉTODOS

En el siguiente apartado se muestran las técnicas utilizadas de forma puntual, que se ejecutaron para las actividades propuestas en cada uno de los objetivos.

2.3.1 Identificación de los parámetros de operación. A grandes rasgos, para llevar a cabo una selección satisfactoria de los parámetros de operación, se realizó un análisis bibliométrico empleando diferentes softwares que permitieran sintetizar y depurar los artículos a analizar, posteriormente se identificaron los parámetros empleados en la investigación previa de la UAN con el fin de comparar estos con los obtenidos a partir de la bibliografía y de esta manera escoger los más apropiados para la operación en los reactores airlift, que ya se encontraban construidos, la

Figura 3 muestra los métodos de forma sintetizada, empleados para llegar al cumplimiento del primer objetivo.

Figura 3. Métodos empleados para cumplir el primer objetivo.

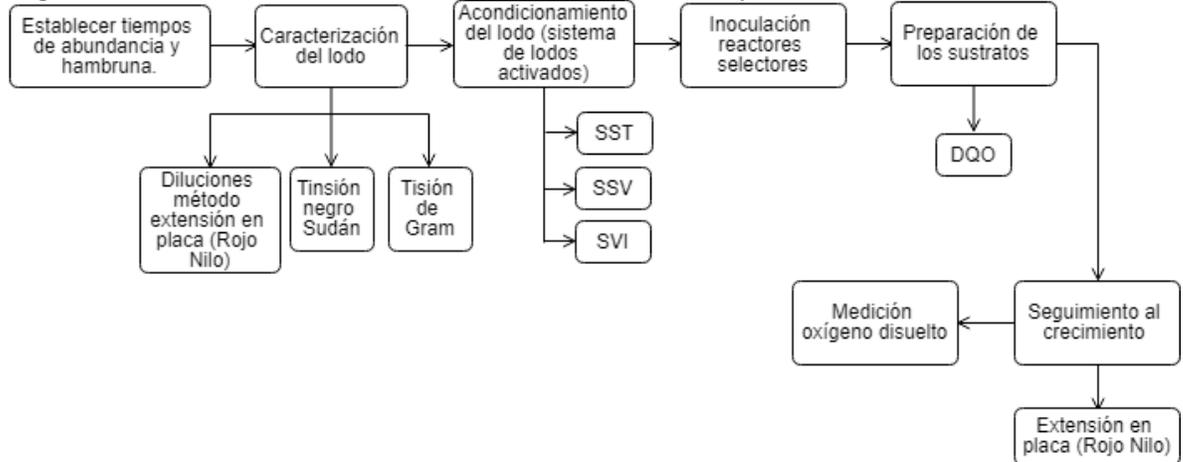


Fuente: elaboración propia.

2.3.2 Determinación de los tiempos de abundancia y hambruna. Para el cumplimiento del segundo objetivo se emplearon las técnicas mostradas en la Figura 4, iniciando con la caracterización del lodo, extraído del tratamiento de aguas de la empresa IBERPLAST S.A, permitiendo conocer la presencia o no de las bacterias productoras de PHAs en este, así realizar el montaje del sistema de lodos monitoreándolo con las mediciones de sólidos suspendidos totales (SST), volátiles (SSV) y finalmente el índice volumétrico de lodos (SVI), de esta manera se aseguraba tener una muestra fresca y similar microbiológicamente para la inoculación de los reactores selectores, alimentados por los sustratos ácido acético y la mezcla ácido acético melaza confirmando sus concentraciones por medio de la DQO.

Durante la operación los reactores airlift, se monitoreó el crecimiento de la biomasa productora como no productora, únicamente durante un ciclo y al mismo tiempo se realizó la medición de oxígeno disuelto.

Figura 4. Determinación de tiempos de abundancia y hambruna.



Fuente: elaboración propia.

2.3.3 Operación en SBR. Finalizado el objetivo número dos, los cuatro reactores selectores fueron inoculados nuevamente, con el fin de desarrollar el cumplimiento del objetivo tres y cuatro al mismo tiempo, midiendo a lo largo de los ciclos el oxígeno disuelto, siguiendo el consumo a la DQO, empleando la técnica del standard methods 5220-D y a cada una de estas mismas muestras se le realizó el protocolo de titulación de AGVs descrito en el libro de Arranque y operación de sistemas de flujo ascendente con manto de lodo UASB, seguido del monitoreo del crecimiento de la biomasa empleando el método de extensión en placa en medio rojo Nilo.

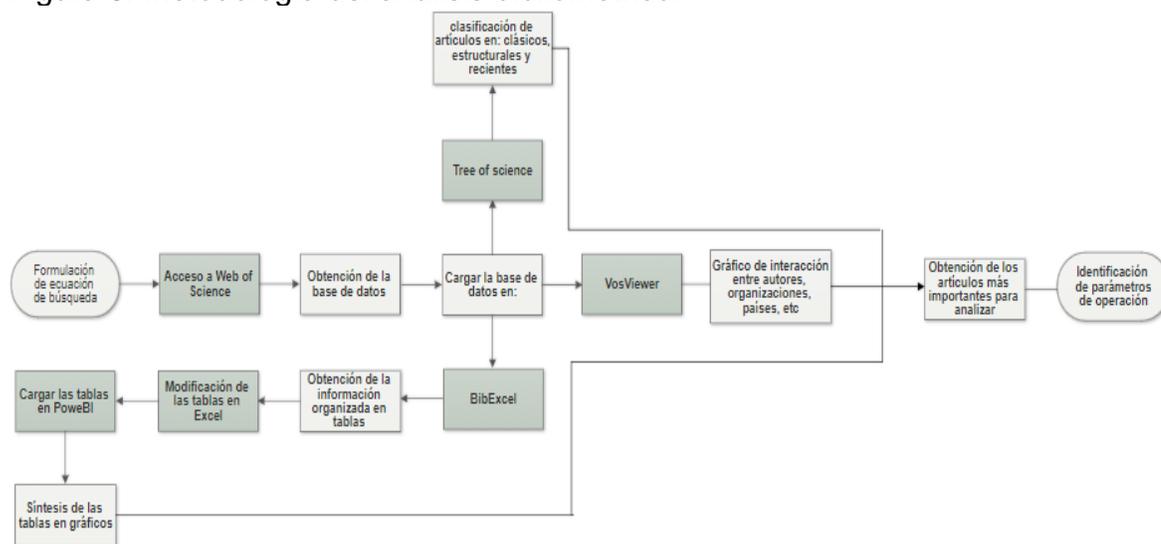
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación, se presenta el procedimiento de forma detallada que se llevó a cabo para el desarrollo de las actividades propuestas para el cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados, donde los correspondientes resultados se exponen y discuten en apartado número cuatro.

3.1 ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO

En la Figura 6, se sintetiza los pasos para obtener los documentos de mayor relevancia publicados entre los años 2008 a 2018 en la plataforma Web of Science; Con el fin de identificar los parámetros de operación para la selección de bacterias acumuladoras de PHAs, utilizados actualmente.

Figura 6. Metodología del análisis bibliométrico.



Fuente: elaboración propia.

En la anterior metodología, estudiada por el doctor Héctor Javier Luna, se recopila los pasos y software utilizados para la búsqueda precisa de artículos tanto generales de descripción del tema (*review*) como experimentales; esto permitiendo de una forma rápida y sencilla organizar, seleccionar y analizar los documentos que aportaron las bases de la presente investigación.

Iniciando con la lectura del top 5 de los autores según su h-index, el cual relaciona la calidad de los artículos publicados, al ser h-index el número de documentos publicados que han sido citados esta misma cantidad; continuando con los títulos más citados y las circunferencias más grandes en el árbol de *tree of science* y finalmente con los artículos realizados por 2 o más autores del top 5, esto último

visualizando un análisis de frecuencias en VosViwer. (Gráficos contenidos en el Anexo A).

3.2 SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN

Una vez leídos y analizados los artículos más relevantes, se extrajeron de estos los parámetros de operación utilizados en la experimentación, organizando por título del documento y valores de operación empleados. Dichos valores según su repetición en distintos documentos se sintetizaron, para posteriormente compararlos con la investigación realizada por la estudiante Jineth Andrea Arango, de la universidad Antonio Nariño, quien operó los reactores air-lift utilizados en el presente trabajo.

Con el fin de determinar la influencia del pH de la alimentación y el tipo de lodo activado a inocular en los reactores selectores, la estudiante anteriormente mencionada, presento sus resultados en el II congreso Internacional de Desarrollo Sostenible y III Encuentro Internacional de Semilleros de Investigación.

De esta manera se compararon dichos resultados con los obtenidos a partir del análisis bibliométrico detallado, consiguiendo un cuadro con los principales y más destacados parámetros, los cuales han sido empleados en trabajos similares, para la selección de bacterias acumuladoras de PHAs a partir de un cultivo mixto.

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL LODO

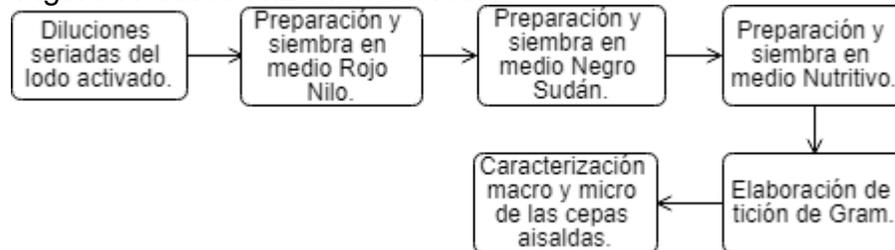
Con el objetivo de verificar la presencia de bacterias acumuladoras de PHAs en la microbiota del lodo activado, extraído de la planta de tratamiento de agua de la empresa, se empleó la metodología descrita en la Figura 7, también utilizada de manera similar en el artículo “Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique”³²; iniciando con la técnica de diluciones seriadas del lodo, seguido de la siembra de cada una de ellas en medio agar rojo de Nilo, por la técnica de extensión en placa con rastrillo, siguiendo el proceso descrito en el libro de Brock³³, pasados 3 días fue posible identificar las colonias teñidas de rojo, es decir aquellas positivas a esta tinción (posibles acumuladoras de PHAs) y continuar con su siembra individual por agotamiento (aquellas positivas con morfología diferente fueron sembradas en cajas aparte) en medio Negro Sudán, adicionalmente estas también fueron replicadas en medio nutritivo, asegurando su supervivencia, ya que al realizar la tinción con el colorante Negro Sudán B (las colonias que se tiñen confirman la producción de

³² SÁNCHEZ MORENO, Silvia, et al. Identificación de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. En: Revista Colombiana de Biotecnología. Dec 1, vol. 14, no. 2, p. 89-100.

³³ MADIGAN, Michael T. MARTINKO, John M. y PARKER, Jack. Crecimiento microbiano. En: Biología de los microorganismos. 10 ed. Southern Illinois University Carbondale. Pearson, 2009. p.146 y 147.

PHAs), las bacterias murieron. Finalmente se realizó el correspondiente procedimiento para la elaboración de la tinción de Gram, terminando con la caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas.

Figura 7. Caracterización del lodo.



Fuente: elaboración propia.

3.3.1 Diluciones seriadas del lodo activado. Para la dilución de 10 g de muestra de lodo activado se prepararon 90 mL de agua peptonada (15 g de agua peptonada en polvo, aforando con 1 L de agua destilada), la cual se repartió de a 9 mL en 10 tubos falcón. Una vez preparado el material, por medio de esterilización en la autoclave, se tomó 1 mL de la primera dilución (10 g de lodo en 90 mL de agua peptonada), el cual se adicione en uno de los tubos falcón, para completar 10 mL y obtener la dilución 1×10^{-2} , posteriormente, de esta dilución nuevamente se tomó 1 mL y se adicione en otro tubo falcón, obteniendo una dilución de 1×10^{-3} , proceso el cual se repitió hasta llegar a la dilución 1×10^{-10} , con el fin de diferenciar entre colonias de la microbiota.

3.3.2 Preparación y siembra en medio Rojo Nilo. Para la preparación de 200 mL de medio, se tomaron 2 g de glucosa, 3 g de agar, 1,6 g de agar nutritivo los cuales se aforaron con agua destilada, posteriormente se esterilizó y paralelamente se preparó 500uL de colorante rojo de Nilo con 0,0005mg del colorante en polvo aforado con 500uL de DMSO, este se adicionó (100uL para 200mL de medio) al medio al finalizar la esterilización. Esta técnica útilmente utilizada en el artículo "Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats"³⁴

Con el medio estéril, en cabina de reflujo cruzado, se procedió a servir el medio en las cajas de Petri, esperando a que este se gelificara para realizar la siembra. Marcando las cajas con la dilución a sembrar en cada una, se dispuso a tomar 100µL de cada dilución realizada previamente, usando para esto una micropipeta, a continuación, el volumen tomado se expulsó en cada caja de Petri repartiéndolo por todo el agar cuidadosamente mediante un rastro de desechable. Para cada siembra, por técnica de extensión en placa con rastrillo, se tuvo en cuenta empezar

³⁴ Mercedes Berlanga, M. Teresa Montero, Jordi Hernández-Borrell, Ricardo Guerrero. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. En: INTERNATIONAL MICROBIOLOGY. 20 de febrero.vol. 9, no. 95-102, p. 95-102

desde la dilución más pequeña a la más grande para no contaminar o alterar los resultados en la siembra puesto que no se cambió de rastrillo a lo largo del procedimiento.

3.3.3 Preparación y siembra en medio Negro Sudán. El siguiente apartado se basó en la técnica descrita en el artículo “fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations”³⁵. Las colonias que arrojaron un resultado positivo a la siembra en medio Rojo de Nilo, es decir, aquellas que después de tres días tomaron una coloración rojo claro, se disponen a sembrarse de forma aislada al resto de las colonias de microorganismos, en el medio para la tinción con Negro Sudán B, nombrándose 1,2,3,4,7, A, B, B´ y E.

Para la preparación de 200mL de este medio, se pesaron 1g de peptona, 2g de glucosa, 1g de cloruro de sodio y 3g de agar, aforando al volumen con agua destilada, el cual también debió pasar por el proceso de esterilización en autoclave a 15 lb y 121°C por 20 min, para posteriormente servirse en las cajas de Petri en cabina estéril.

Al gelificar el medio, se dispuso a sembrarse las colonias positivas que poseían morfología diferente, las cuales se obtuvieron como resultado de la siembra de las diluciones del lodo; la técnica empleada para este caso fue la de agotamiento.

Las colonias aisladas, se incubaron a 35°C y después de 2 días en incubación se realizó la tinción empleando el colorante negro Sudán, para lo cual a cada caja de Petri se le adicionó dicho colorante, asegurando la cobertura completa de la caja con este, pasados 30 min se retiró el colorante y se lavaron las cajas con etanol al 96% para visualizar los resultados, esta técnica se empleó para confirmar que las colonias coloreadas en la primera tinción fueran realmente positivas a la producción de PHAs, ya que el negro Sudán B únicamente tiñe dichas bacterias, pues el colorante se adhiere a la capa lipídica que recubre al polihidroxialcanoato producido en los cuerpos de inclusión de la bacteria.

3.3.4 Preparación y siembra en medio nutritivo. con el objetivo de realizar la caracterización macro y microscópica de las cepas (1,2,3,4,7, A, B, B´ y E) que se comprobaron cómo productoras de PHAs, se preparó medio nutritivo para sembrarlas allí, pesando 8,4g de Agar nutritivo y 3g de Glucosa, aforando con agua destilada hasta un volumen de 300 mL.

De igual manera que en las anteriores siembras, se esterilizó el medio y posteriormente se sirvió en la cabina de extracción en las cajas de Petri, empleando la técnica de agotamiento para el replique de las cepas.

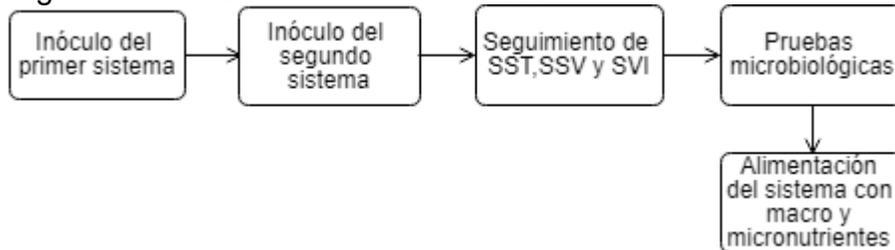
³⁵ SUDAN BLACK B FAT STAIN FOR FIXED PREPARATIONS. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, FIXED SLIDE PREPARATIONS

3.3.5 Elaboración de tinción de Gram. El proceso se inició distribuyendo el espacio para visualizar tres muestras en una sola lámina portaobjetos y marcando la misma con el nombre de las cepas a analizar, seguido a esto, se realizó el frotis de cada muestra en las láminas, asegurándose de fijar de forma correcta la misma. A continuación, se realizó el protocolo de tinción de Gram para cada muestra, para ser vistas detenidamente cada una al microscopio, enfocando con el lente 100x para tal propósito, siguiendo el procedimiento expuesto en la norma NTC 4092 ³⁶.

3.4 ACONDICIONAMIENTO DEL LODO

Una vez visualizado y confirmado la presencia de bacterias productoras de PHAs en el lodo, con el fin de asegurar una muestra fresca y uniforme para los reactores selectores airlift, se procede a realizar dos montajes de lodos activados, el cual se operó de la siguiente manera.

Figura 8. Acondicionamiento del lodo.



Fuente: elaboración propia.

3.4.1 Inoculo del primer sistema. A partir de la primera muestra de 112g de lodo húmedo, se utilizó 102g para empezar el sistema de lodos activados, puesto que no se disponía de un licor mixto, en el cual la medida de sólidos suspendidos volátiles perteneciera únicamente a los microorganismos, sino que, al proceder del tratamiento de agua, del proceso de lavado de canastillas plásticas a ser reincorporadas en la producción, la muestra contaba con residuos de micro plástico, que podían alterar esta medición al volatilizarse junto con los microorganismos; por esta razón, fue necesario inocular sin conocer la concentración exacta de sólidos suspendidos volátiles, con la cual se asegurara una relación F/M igual a 0,4 para sistemas de lodos convencionales³⁷.

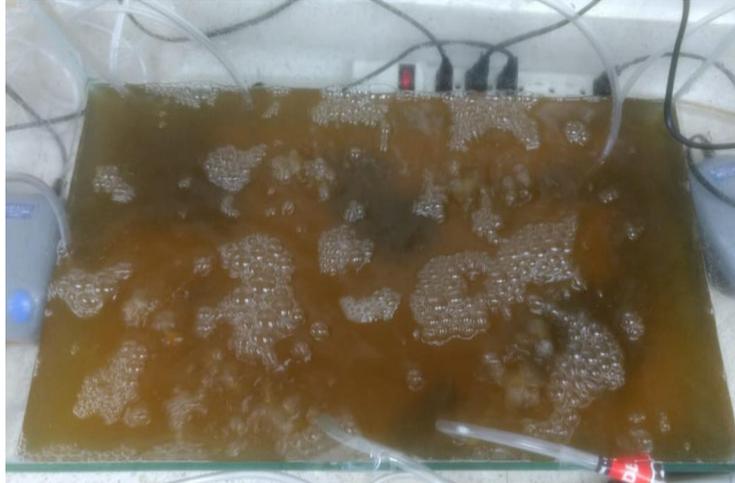
Posteriormente, se aforó con el alimento de melaza a 8L, en un prisma rectangular de vidrio, introduciendo en su interior tres difusores en barra para homogeneizar el oxígeno en el sistema y al mismo tiempo favorecer el crecimiento de la microbiota

³⁶ MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL. REQUISITOS GENERALES Y DIRECTRICES PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS. NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 4092. 2009.

³⁷ RITTMAN, B. Mc Carty. 2001. En: Biotecnología del medio ambiente: principios y aplicaciones. Sexta Edición. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill. p. 626-647.

presente, permitiendo con este confirmar la reproductividad de los microorganismos mediante las condiciones mencionadas, como se muestra en la Foto 1.

Foto 1. Inóculo del primer sistema.



Fuente: elaboración propia.

El sustrato de melaza, fue preparado teniendo en cuenta una concentración de 2000 mgDQO total/L adicionando 2,72g de melaza por cada litro preparado, valores estandarizados anteriormente en las investigaciones realizadas en la Universidad Antonio Nariño, el cual se alimentó diariamente, deteniendo la aireación para permitir la sedimentación de la biomasa y posteriormente retirar 4L de sobrenadante, los cuales se reemplazaban por la adición de sustrato fresco en igual cantidad, retomando la aireación, para completar un ciclo de operación SBR de forma manual.

3.4.2 Inóculo del segundo sistema. Una vez visualizado el crecimiento del primer sistema en pocos días, previó nuevamente una muestra fresca de mayor tamaño a la inicial, de la cual se tomó 80 g, peso húmedo, aforados en 20L de alimento de melaza, descrito anteriormente, en otro prisma rectangular.

De igual manera, que en el sistema previo no se midieron sólidos suspendidos volátiles, debido a la presencia de microplástico, por lo cual fue necesario operar durante 2 ciclos SBR, retirando el polímero durante la etapa de sedimentación, aprovechando la separación de fases por densidades entre el plástico (suspendido en la superficie) y el resto de licor mixto.

Adicionalmente para este sistema se dispuso de difusores en esfera, proporcionando burbujas más finas, como se muestra en la Foto 2, capturada el primer día de operación del sistema

Foto 2. Inóculo del segundo sistema.



Fuente: elaboración propia.

3.4.3 Seguimiento de sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV) e índice volumétrico de lodos (IVL). Después de 11 días de operación de los sistemas de lodos ya mencionados, se observó la desaparición por completo de las partículas de plástico en el licor mixto, puesto que durante este tiempo se utilizó un trozo de malla de abertura pequeña para la limpieza del sistema, durante el proceso de alimentación; por esta razón se inició la trazabilidad del crecimiento microbiano mediante la medida de SST y SSV siguiendo el procedimiento establecido en la NTC 897.³⁸

El procedimiento iniciaba con el secado en el horno a 105°C, durante 1h, de tres cápsulas de porcelana con su respectivo filtro de fibra de vidrio para cada sistema de lodos, es decir que la medición se llevaba a cabo por triplicado, al finalizar el tiempo de secado, se esperaba 1h más con las capsulas en el disecador para dejar enfriarlas y tomar el primer peso de estas en balanza analítica, a continuación se extraía de cada sistema de lodo, en constante agitación, entre 5mL y 10mL de muestra dependiendo la cantidad de sólidos observados a simple vista, las cuales se filtraban en sistemas al vacío, con su respectivo filtro seco, seguido a esto se volvía a secar en el horno, esta vez la capsula, el filtro y la torta, durante 1h, para ser registrado su nuevo peso al cumplirse 1h de enfriamiento en los disecadores, así, las cápsulas, el filtro y la torta seca se calcinaban en la mufla a 550°C, evaporando toda la materia orgánica, de nuevo durante 1h, para finalmente dejar reposar y pesar de nuevo.

Para obtener los resultados de SST y SSV del procedimiento se emplearon las fórmulas descritas a continuación:

$$SST = \frac{(p2 - p1) * 1x10^6}{V}$$

³⁸ CALIDAD DEL AGUA; DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SÓLIDOS. NORMA TÉCNICA NTC COLOMBIANA 897. 2015.

Dónde:

p2: peso de la cápsula, el filtro y la torta, después del secado.

p1: peso de la cápsula y el filtro, después de haber realizado secado en el horno.

V: volumen de la muestra filtrado.

El valor de los sólidos suspendidos volátiles es una medida indirecta por lo cual primero es necesario el cálculo de los sólidos suspendidos fijos, es decir la cantidad de materia inorgánica presente en la muestra, la cual no se evapora en la calcinación, por el contrario, persiste en la torta, así esta medida se obtiene con la ecuación:

$$SSF = \frac{(p3 - p1) * 1 * 10^6}{V}$$

Dónde:

p3: peso de la cápsula, el filtro y la torta, al finalizar el tiempo en la mufla.

p1: peso de la cápsula y el filtro, después del secado.

V: volumen de la muestra filtrado.

De este modo, los SSV se calculan a partir de la ecuación:

$$SSV = SST - SSF$$

Por otro lado, el índice volumétrico de lodos es una medida que brindó información acerca de la calidad de sedimentación del lodo, el cual se define como el volumen de sólidos suspendidos del licor mezclado³⁹. Para lo cual se realizó la prueba de sólidos sedimentables, siguiendo de igual manera la NTC 897 que se empleó para SST y SSV; extrayendo 1L de muestra de lodo, perfectamente agitado, en un cono Imhoff, dejando sedimentar durante 1h; pasado el tiempo se observaba el volumen en mL de lodo sedimentado.⁴⁰

Teniendo el valor en volumen de sólidos suspendidos sedimentables se calculó el índice volumétrico empleando la siguiente ecuación:

$$IVL = \frac{SS_{1h} * V_{cono}}{SST}$$

Dónde:

SS_{1h}: Volumen sedimentado de lodo en el cono Imhoff. (mL/L)

³⁹ SÁNCHEZ MORENO, Silvia, et al. Op. cit., p. 140.

⁴⁰ NORMA NTC 897, et al. Op. cit., p. 10.

V_{cono} : Volumen total de muestra utilizado para la prueba en el cono Imhoff (mg/g)
 SST: medida de los sólidos suspendidos totales de la muestra.

Esperando obtener una medida entre 300 a 200 mL/g de sólidos sedimentables, medidos desde las referencias del cono Imhoff, puesto que este valor, proporciona una aproximación de la cantidad máxima de microorganismos a recircular al sistema de lodos y que cantidad se debe purgar, para mantener la relación F/M estable⁴¹.

3.4.4 Alimentación con macro y micronutrientes. Al realizar las mediciones anteriores a los sistemas de lodos, se observó una baja sedimentabilidad que imposibilitó el paso de la microbiota del sistema de lodos a los reactores selectores, por ello se estudió la causa de este fenómeno; reportado comúnmente en literatura de lodos activados, como bulking, en el cual la baja sedimentación genera una pérdida masiva de biomasa y puede ser causado por diferentes factores, entre ellos la carencia de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, que al no estar presentes en el alimento, favorece el enriquecimiento de bacterias filamentosas dentro el licor mixto, creando puentes que imposibilitan el paso del agua entre los flocs y por ende la microbiota queda suspendida⁴².

Se adicionó 0,5 g/L de cloruro de amonio, por ser una fuente de nitrógeno, que facilita el crecimiento microbiano al ser agente de donadores de electrones, para la generación de aminoácidos, ácidos nucleicos y peptidoglicanos; el fosfato mono potásico (KH_2PO_4) y el fosfato di potásico (K_2HPO_4), generalmente utilizados como macronutrientes para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos, los dos últimos de un alto costo para esta investigación.

Por esta razón, se realizó el cálculo mostrado a continuación, con el fin de conocer la cantidad de fosfato trisódico (Na_3PO_4) por estequiometría, que compensara la cantidad de fosforo que aportaban los dos compuestos anteriormente mencionados, en el caldo de macronutrientes preparado para la alimentación del sistema de lodos activados:

$$0,25 \frac{g KH_2PO_4}{L} \times \left(\frac{1 mol KH_2PO_4}{136,086 g KH_2PO_4} \right) \times \left(\frac{1 mol P}{1 mol KH_2PO_4} \right) \times \left(\frac{30,9738 g P}{1 mol P} \right) = g de P$$

$$0,0569 = g de P$$

$$0,25 \frac{g K_2HPO_4}{L} \times \left(\frac{1 mol K_2HPO_4}{174,2 g K_2HPO_4} \right) \times \left(\frac{1 mol P}{1 mol K_2HPO_4} \right) \times \left(\frac{30,9738 g P}{1 mol P} \right) = g de P$$

$$0,04445 = g/L de P$$

⁴¹ RITTMAN, B. Mc Carty. Op. cit., p. 638.

⁴² SÁNCHEZ MORENO, Silvia, et al. Op. cit., p. 126.

Sumando los gramos de fósforo (P) a compensar, se obtiene que:

$$g \text{ de P (aportados por } KH_2PO_4) + g \text{ de P (aportados por } K_2HPO_4) \\ = g \text{ de P por } Na_3PO_4 + g \text{ de P por } PO_4$$

$$0,04445 \frac{g \text{ P}}{L} \times \left(\frac{1 \text{ mol } Na_3PO_4}{30,9738 \text{ g P}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mol de P}}{1 \text{ mol } Na_3PO_4} \right) \times \left(\frac{30,9738 \text{ g P}}{1 \text{ mol P}} \right) = g/L \text{ de P}$$

Teniendo en cuenta este requerimiento en gramos de fósforo aportados por:

$$0,0569 \text{ g de P (aportados por } KH_2PO_4) + 0,04445 \text{ g de P (aportados por } K_2HPO_4) \\ = 0,10135 \text{ g/L necesarios de P aportados por } Na_3PO_4$$

$$0,10135 \frac{g \text{ P}}{L} \times \left(\frac{1 \text{ mol } Na_3PO_4}{30,9738 \text{ g P}} \right) \times \left(\frac{163,94 \text{ g } Na_3PO_4}{1 \text{ mol } Na_3PO_4} \right) = 0,5364 \text{ g/L de } Na_3PO_4$$

En síntesis, con el propósito de suministrar una fuente de magnesio, azufre, nitrógeno y fósforo se adicionaron los siguientes compuestos para la suplementación del sistema de lodos activados:

Cuadro 3. Concentración de macronutrientes.

Compuesto	Concentración (g/L)
NH ₄ Cl	0,5
Na ₃ PO ₄	1,44
MgCl	0,3
Na ₂ SO ₄	1,7

Fuente: elaboración propia.

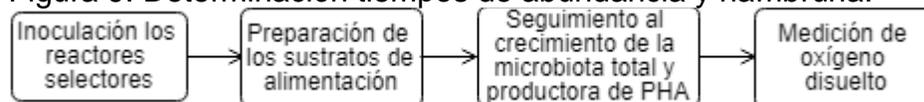
Paralelamente, se adicionaron los micronutrientes de FeCl₃, CaCl₂, CoCl₂, MnCl₂, ZnSO₄ y CuSO₄, fomentando la actividad enzimática al interior de las células bacterianas⁴³.

3.5 DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE ABUNDANCIA Y HAMBRUNA

En esta parte del proyecto, se requería identificar el intervalo de tiempo adecuado de aireación de un ciclo, en el cual se favoreciera el aumento y supervivencia de la población de bacterias productoras de PHAs de la biomasa total de la cantidad de lodo activado inoculado en los biorreactores airlift. Así, se realizaron los siguientes procedimientos (Figura 9).

⁴³ SERAFIM, Luísa S., et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. Op. cit., p. 147.

Figura 9. Determinación tiempos de abundancia y hambruna.



Fuente: Elaboración propia.

3.5.1 Inoculación de los reactores air-lift (cuatro). Teniendo un sistema de lodos activados con un funcionamiento estable y una medición de sedimentabilidad estándar, se calculó la concentración de microorganismos requerida del licor mixto para emplear como inóculo de los biorreactores selectores, teniendo en cuenta la relación de la concentración de alimento por concentración de microorganismos óptima para la operación de selección, se encontró y estableció dicho valor en 1,2⁴⁴, considerando también el valor fijo de 1600mgDQO/L como la concentración del sustrato.

$$\frac{F}{M} = \frac{mgDQO/L}{mgSST/L}$$

$$1,2 = \frac{1600mgDQO/L}{\text{cantidad de microorganismos a inocular}}$$

$$\text{Cantidad de microorganismos a inocular} = 1333,33mgSST/L$$

Finalmente se calculó el volumen necesario a tomar del licor mixto del sistema de lodos activados, como se muestra a continuación, con el objetivo de obtener la concentración aproximada de microorganismos calculada previamente, teniendo en consideración la concentración de 3260 mgSSV/L, a la cual se encontraba el segundo sistema de lodos activados en dicho momento, el cual se utilizó para tal fin.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$3260 \frac{mgSST}{L} * V_1 = 1333,33mgSST/L * 1,45L$$

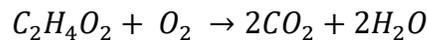
$$V_1 = 0,593L$$

3.5.2 Preparación de sustratos de 1600mgDQO/L. De acuerdo a el proyecto desarrollado en la Universidad Antonio Nariño, sobre la implementación de un prototipo de biorrefinería para la producción de PHAs, compuesto en general por tres etapas secuenciales, se plantea que la primera etapa acidogénica (productora de AGV con trazas de azúcares) sea el sustrato para la microbiota a seleccionar de la segunda etapa y esta última el inóculo de la tercera etapa de acumulación del biopolímero. En el presente trabajo de grado, se preparó dos tipos de sustratos, el primero con un contenido únicamente de ácidos grasos al utilizar vinagre como fuente de ácido acético y el segundo, para simular la corriente proveniente de la primera etapa acidogénica, utilizando vinagre mezclado con melaza.

⁴⁴ LIU,Hsin-Ying, et al. Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater. En: WATER ENVIRONMENT RESEARCH. Apr.vol. 80, no. 4, p. 367-372

Puesto que la concentración actual de la corriente compleja de salida del reactor acidogénico se encuentra entre los valores de 1500 a 2000 mgDQO/L, se escogió un valor de 1600mgDQO/L para los sustratos de alimentación de los reactores selectores, donde el valor de esta concentración, es total para el sustrato comprendido únicamente por ácido acético, mientras que para la mezcla melaza-ácido acético, el 60% de la concentración (960 mgDQO/L) pertenecía a la melaza y el 40% restante (640 mgDQO/L) al ácido acético disponible en el vinagre.

Por esta razón, fue necesario realizar una curva de calibración de DQO, con el propósito de medir y confirmar dicha concentración del ácido acético en el vinagre, lo cual, permitió calcular la cantidad necesaria de este para cumplir con las concentraciones mencionadas anteriormente, en los sustratos de alimentación teniendo en cuenta los siguientes cálculos teóricos, empezando por la reacción de oxidación del ácido acético, la cual se empleó para obtener un factor de conversión a mgDQO.



$$\frac{1mmol C_2H_4O_2}{2mmol O_2} * \frac{60mg C_2H_4O_2}{1mmol C_2H_4O_2} * \frac{1mmol O_2}{32mmol O_2} = 0,9375 \frac{mg C_2H_4O_2}{mg DQO}$$

Calculando el valor de la DQO teórica del ácido acético en el vinagre, suponiendo una concentración del 5% v/v :

$$0,05 \frac{mL C_2H_4O_2}{mL solución} * \frac{1049 mg C_2H_4O_2}{mL C_2H_4O_2} * \frac{mg DQO}{0,9375 mg C_2H_4O_2} * \frac{1000 mL}{1L}$$

$$= 55946,6 \frac{mg DQO}{L}$$

La medición de DQO se llevó a cabo mediante el *standard methods* 5220D y de igual manera se realizó para la melaza según la concentración requerida comentada antes.

3.5.2.1 Curva de calibración de DQO. La curva de calibración para la medición de DQO, fue realizada siguiendo una adaptación del *standard methods* 5220D de reflujó cerrado/colorimetría, denominada “Estandarización y validación de una técnica para medición de la demanda química de oxígeno por el método colorimétrico”.(Curva patrón presentada en el Anexo C).

3.5.2.2 Cantidades de melaza y vinagre para la preparación de los sustratos. Una vez se comprobó la concentración del ácido acético en el vinagre y la correspondiente a la melaza para el sustrato complejo, se calcularon las cantidades

a tomar para la elaboración de 10L, en primer lugar, del sustrato simple de ácido acético, de la siguiente manera:

$$V_{vinagre} = \frac{1600 \frac{mgDQO}{L} * 1302,6860L}{52860 \frac{mgDQO}{L}} * 1000mL = 302,686mL$$

En segundo lugar, se calcularon las cantidades tanto de melaza como de vinagre para la elaboración del sustrato complejo, cumpliendo con las concentraciones de 960 y 640mgDQO/L, respectivamente:

$$Peso\ de\ melaza(g) = 960 \frac{mgDQO}{L} * \frac{1,308g}{888 \frac{mgDQO}{L}} * 10L = 14,14g\ Melaza$$

$$V_{vinagre} = \frac{640 \frac{mgDQO}{L} * 10L}{52860 \frac{mgDQO}{L}} * 10000mL = 121,07mL$$

Finalmente, a cada sustrato se adicionó la respectiva cantidad de macronutrientes y micronutrientes, que fueron empleados en la alimentación del sistema de lodos activados, teniendo en cuenta el volumen preparado.

3.5.3 Seguimiento al crecimiento de la microbiota total y productora de PHAs.

Con los sustratos preparados y los reactores inoculados, se procedió a operar los reactores durante dos ciclos, el primero como acondicionamiento de la microbiota a los sustratos y el segundo siendo monitoreado, con el fin de encontrar el ajuste a los tiempos de abundancia y hambruna, por lo tanto, durante esta operación los reactores selectores funcionaron con los tiempos de referencia hallados en el literal 3.1, a lo largo de la operación de los reactores selectores durante el segundo ciclo, se tomaron muestras cada hora durante las primeras tres horas de operación, después se tomaron cada 2h durante el tiempo restante de aireación, sembrando cada una en medio rojo Nilo, por medio del método en extensión en placa por duplicado, realizando diluciones de 1×10^{-5} y 1×10^{-6} , con el objetivo de realizar un conteo de células viables tanto de bacterias productoras de PHAs (teñidas en rosa tenue) y la biomasa total.

3.5.4 Medición del oxígeno disuelto. Otro parámetro medido de vital importancia durante la operación del segundo ciclo, fue el oxígeno disuelto mediante la sonda multiparamétrica HI9829, esto como medida intrínseca de consumo del sustrato al interior del biorreactor, el cual, permitía tener una mayor precisión encontrando el tiempo de abundancia (etapa de alimentación del biorreactor, en la cual el sustrato se encuentra en exceso), adicionalmente la sonda también permitió realizar la medición del pH y la temperatura al mismo tiempo, soportando los resultados obtenidos con el oxígeno disuelto.

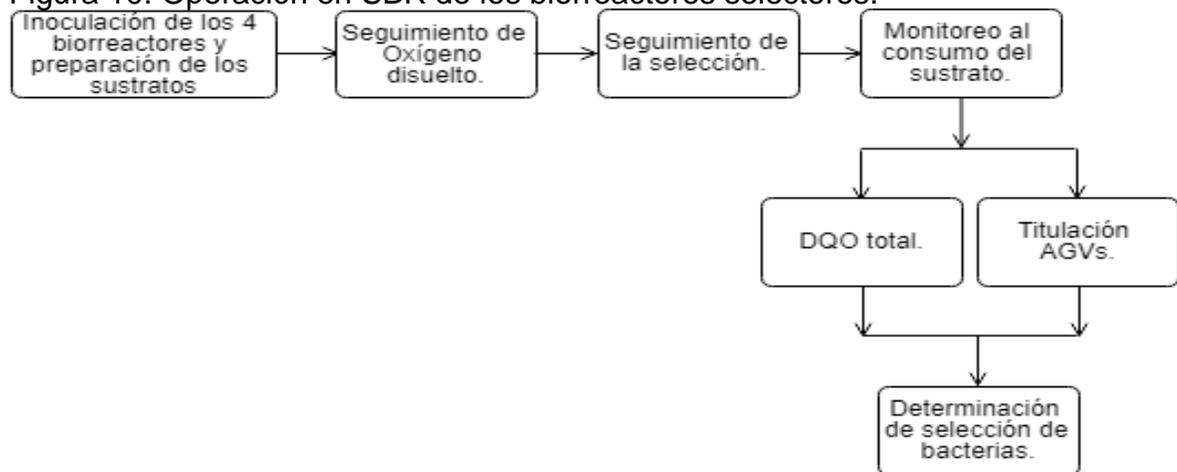
3.6 OPERACIÓN EN SBR DE LOS BIORREACTORES SELECTORES

Una vez establecidos los tiempos adecuados para ejercer la presión selectiva de abundancia y hambruna para ambos sistemas, se procedió a la operación en SBR, es decir a la continuidad de los ciclos (10 ciclos). En los cuales se contabilizó la microbiota al inicio y fin en cada ciclo de los 4 reactores, se tomó muestras cada 30 minutos durante las primeras dos horas de los ciclos impares (en la mañana) para el cálculo de DQO_{total} y $DQO_{noAGV/L}$, finalmente se monitorio el oxígeno disuelto, la temperatura y pH, de los siguientes ciclos específicos.

Para el ciclo 1, 2, 3, 7 y 9 en los reactores S4, S1, S3, S2 y S4 respectivamente; teniendo en cuenta que S1 y S2 se manejó bajo el sustrato ácido acético y S3 y S4 con sustrato ácido acético-melaza, por tal razón se siguieron los siguientes pasos (Figura 10).

Esta metodología se realizó en simultaneo para los dos sustratos, utilizando dos biorreactores con ácido acético y los otros dos biorreactores con ácido acético más melaza.

Figura 10. Operación en SBR de los biorreactores selectores.



Fuente: elaboración propia.

3.6.1 Inoculación de los 4 biorreactores y preparación de los sustratos. De igual forma que en los apartados 3.5.1 y 3.5.2, en primer lugar, se realizaron los cálculos de la biomasa a tomar del lodo activado ajustando una relación F/M de 1,2 y en segundo lugar de las cantidades a medir de melaza y de vinagre que aportaran las concentraciones ya mencionadas.

Con el fin de mantener estas concentraciones iniciales de alimentación (960mgDQO (no AGV) /L de melaza, 640 y 1600 mgDQO_(AGV)/L de ácido acético) los sustratos se prepararon cada 36h, puesto que después de este tiempo, la aparición de biomasa

no deseada dentro de los tanques de almacenamiento, era evidente y esto podía alterar el proceso de selección de biomasa en los biorreactores.

3.6.2 Seguimiento de oxígeno disuelto en los reactores. Dicha medición se realizó con el fin de monitorear la actividad microbiana dentro de los reactores, para ello se utilizó la sonda multiparamétrica que registró cada 3 minutos la concentración en ppm de oxígeno en el caldo fermentativo.

Las mediciones de los cuatro biorreactores se realizaron por la duración de todo un ciclo, comenzando por S4C1 (biorreactor selector 4, ciclo 1), seguido por S1C2, S3C3, S2C7 y finalizando con S4C9; donde S1 y S2 se operaron bajo el sustrato ácido acético y S3 y S4 bajo la combinación de ácido acético más melaza.

3.6.3 Seguimiento de la selección de biomasa durante los tiempos de abundancia y hambruna. Dado que, el objetivo de este proyecto consistió en visualizar la influencia de los sustratos, en la selección de biomasa productora de PHAs con respecto a la biomasa total, esta solamente se podía realizar por medio del recuento de células viables en agar rojo Nilo, se tomó muestras de los cuatro biorreactores y se sembraron por método de extensión en placa con un factor de dilución de 1×10^{-5} , en medio rojo Nilo como se expuso en la sección 3.3.2. En todos los ciclos se tomaron muestras al inicio y fin de estos, para visualizar el comportamiento de la biomasa con el paso de cada ciclo.

3.6.4 Medición del consumo de los sustratos. La medición de DQO por el método modificado del standard methods 5220D aprobado por la Guía técnica colombiana (GTC) 229⁴⁵, se llevó a cabo de las muestras recolectadas en los ciclos a los que se midió el oxígeno disuelto (mencionados en el literal 3.6), puesto que este parámetro al ser una medida indirecta al consumo del sustrato, los resultados podían ser comparados.

Adicionalmente a estas muestras, también se les realizó la medición de AGVs por medio de titulación potenciométrica, utilizando el método de G. K. Anderson, G. Yang 1992⁴⁶ utilizando NaOH (0,1N) y HCl en la misma concentración. Este método cuantifica los ácidos grasos contenidos en la muestra, iniciando con la disminución del pH a 3 para obtener en su forma más estable los ácidos, seguido de un calentamiento para la eliminación de CO₂, finalmente aumentando el pH a 6,5 para

⁴⁵ GUÍA DE MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL AGUA. MÉTODOS DE ENSAYO. Guía técnica colombiana GTC 229. 2012

⁴⁶ G. K. Anderson and G. Yang. Determination of Bicarbonate and Total Volatile Acid Concentration in Anaerobic Digesters Using a Simple Titration. En: WATER ENVIRONMENT RESEARCH. Jan 1, vol. 64, no. 1, p. 53-59

provocar la disociación de los ácidos y poderlos cuantificar por el volumen gastado de la base.

Las actividades del desarrollo experimental llevado a cabo en la sección 3.6 se realizaron con el fin de dar cumplimiento a los objetivos tres y cuatro, los cuales se ejecutaron en simultaneo junto con su repetición.

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

En el presente capítulo, se exponen los resultados del proyecto con su respectivo análisis, obtenidos a partir de la metodología planteada para dar cumplimiento a los objetivos del proyecto.

4.1 SELECCIÓN DE PARÁMETROS

De acuerdo al análisis bibliométrico realizado como parte de la metodología, al redactar primeramente la ecuación de búsqueda en la plataforma Web of Science, se distinguieron algunos de los documentos publicados sobre la acumulación de bacterias productoras de PHAs, lo que permitió obtener una idea global de los conceptos claves para una búsqueda detallada, empleando la misma plataforma de búsqueda.

Para lo cual, se utilizó la opción de análisis de resultados proporcionada por Web of Science y con respecto a esta, la ecuación inicial fue modificándose hasta obtener los documentos con mayor relación y precisión de los parámetros en la selección de bacterias productoras de PHAs, alcanzando una base de datos con 75 registros. Por lo anterior, las herramientas empleadas (Bibexcel, Tree of Science, PowerBi y VOSviewer), en la elaboración del análisis bibliométrico, contribuyeron a organizar la información de forma rápida y eficiente, permitiendo la comprensión de la información en la base de datos, desde la perspectiva gráfica y de tablas dinámicas, para reducir notablemente la cantidad de documentos a analizar y extraer los valores utilizados en cada variable de operación.

Tangencialmente, se identificaron los campos de mayor relevancia (autor, país, organización, año de publicación y título más citado), teniendo en cuenta el h-Índex, indicador del número de documentos citados por lo menos el mismo número de veces; es decir, si un autor contiene un h-Índex de 15, esto quiere decir que a pesar de la cantidad de documentos que haya publicado, 15 de estos han sido citados por mínimo 15 veces, siendo así un indicio de la calidad de los 15.

Una vez comparados los resultados obtenidos en cada uno de los programas, anteriormente mencionados, de los 75 documentos iniciales se redujeron a 10, debido a que los procedimientos realizados permiten llegar a los documentos de una mayor fiabilidad y precisión en la información contenida, sin tener que realizar una lectura exhaustiva previa.

Cuadro 4. Título de artículos analizados.

Nombre artículo	Número asignado
Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties.	1
Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions.	2
Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process: from activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures.	3
Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection	4
Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen	5
Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology	6
Improving PHA production in a SBR of coupling PHA-storing microorganism enrichment and PHA accumulation by feed-on-demand control	7
Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding	8
Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture	9
Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture	10

Fuente: elaboración propia.

El cuadro 4 muestra el título de los 10 artículos analizados, mediante una lectura detallada, con el fin de extraer los parámetros de operación empleados en cada uno y condensar la información en el cuadro 5.

Cuadro 5. Consolidación información de los artículos (*).

Art	Ciclos								Alimentación			Anti nitrificación	Aireación vvm (L/Lmin)	T (°C) / pH en el reactor
	V (mL)	t _r / tipo de reactor	LI (min)	A&H (min)	Sed (min)	Vac (min)	HRT (días)	SRT (días)	pH	Tipo de sustrato	Macro y micro nutrientes			
1	800	12h/SBR	5	660	45	10	1	10	8+-0.05	Melaza Fermentada Clarificada	--	Tiourea 10mg/L	--	23°-25°
2	800	12h/SBR	--	630	60	30	1	10	7.2	Acetato	MgSO ₄ /NH ₄ Cl/K ₂ HPO ₄ / CaCl ₂ /FeCl ₃ /H ₃ BO ₃ /CoCl ₂ /MnCl ₂ /ZnSO ₄ /CuSO ₄	Tiourea 10mg/L	1	22°/ sin control
3	4000	12h/SBR	10	660	660-710	710-720	1	5	7+-0,01	Aguas residuales de caña de azúcar fermentada	NH ₄ Cl/ KH ₂ PO ₄ /MgSO ₄ /CaCl ₂	Tiourea	--	20°+-3°/ sin control
4	800	12h/SBR	5	660	45	10	1	10	8+-0,05	Melaza fermentada clarificada	--	Tiourea 10mg/L	--	23°-25°/ No se controló
5	1000	12h/ 2 SBR	5	680	20	15	1	4	--	Ácidos orgánicos y metano	--	Allitiourea 10mg/L	1	23°-25°
6	1200	24h	--	15, 80,24 5,600 mL/min	--	--	4	4	--	Ácidos Grasos volátiles	--	--	--	22°-25°

Cuadro 5. (continuación)

Art	Ciclos								Alimentación			Anti nitrificación	Aireación vvm (L/Lmin)	T (°C)/ pH en el reactor
	V (mL)	t _T / tipo de reactor	LI (min)	A&H (min)	Sed (min)	Vac (min)	HRT (días)	SRT (días)	pH	Tipo de sustrato	Macro y micro nutrientes			
7	3400	18h	15	360 A; 695 H	--	3	--	1	--	Solución de acetato de sodio	(NH ₄) ₂ SO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ ·7H ₂ O, KCl, ZnSO ₄ ·7H ₂ O, CaCl ₂ ·7H ₂ O, MnCl ₂ ·4H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, O, CuSO ₄ ·5H ₂ O, CoCl ₂ ·6H ₂ O,	--	2 mg/L.	30°
8	1000	12h	15	630	60	30	1	10	7,2	Acetato, propionato, butirato y valerato	FeCl ₃ ·6H ₂ O, H ₃ BO ₃ , CoCl ₂ ·6H ₂ O, MnCl ₂ ·4H ₂ O, ZnSO ₄ ·7H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, O, CuSO ₄ ·5H ₂ O y KI.	Tiourea (10 mg/l)	1	22°
9	2000	12h	7	10 A; 693 H	10	10	--	--	--	Agua residual municipal	--	--	--	30°
10	800	12h/SB R	4	675	40	5	1	5	--	Agua residual municipal	--	--	6L/min	25°/ 8,8

Fuente: Elaboración propia.

(*) V: volumen del reactor; t_T: tiempo total de un solo ciclo; LI: tiempo de llenado del reactor con el alimento; A&H: tiempo de duración de la etapa de abundancia y hambruna; Sed: tiempo establecido para la etapa de sedimentación del lodo; Vac: tiempo de vaciado del reactor, en el cual se retira el sobrenadante de la sedimentación; HRT: tiempo de retención hidráulico; SRT: tiempo de retención de lodos.

Así, se extrajeron los valores utilizados con mayor frecuencia en los artículos listados del Cuadro 5, que mostraron una estrecha relación con lo trabajado en el proyecto, para posteriormente ser comparados con los empleados en las previas investigaciones de la Universidad Antonio Nariño, por ello se obtuvo el Cuadro 6.

Cuadro 6. Parámetros y valor.

Parámetro		Valor
Volumen (mL)		1000
Ciclos	tiempo total/tipo de reactor/ adecuación de lodo	12h/SBR/24h
	Abundancia y hambruna (min)	630
	HRT (días)	1
SBR	SRT (días)	10
Tipo de sustrato/ pH		Acetato/ 7,2
Macro y micronutrientes		MgSO ₄ /NH ₄ Cl/ K ₂ HPO ₄ /CaCl ₂ /FeCl/CoC L ₂ /MnCl ₂ /ZnSO ₄ /CuSO ₄
Anti-nitrificación (mg/L)		Tiourea
Aireación en el reactor (vvm)		1
Temperatura (°C)/ pH en el reactor		22°C / sin control

Fuente: elaboración propia.

En la primera fila del Cuadro 6, se muestra el volumen de reactor, trabajado en diferentes publicaciones, esto debido a que la economía juega un papel crucial en el desarrollo de la producción del PHA industrialmente, puesto que el 50% de los costos de la producción, se originan desde el precio de la fuente de carbono utilizada, ya que en la mayoría de investigaciones se han trabajado con sustratos sintéticos. Además de esto, actualmente los rendimientos del PHA no son lo suficientemente altos para llevar a cabo una producción de mayor volumen, sin embargo, los estudios a nivel laboratorio son importantes, ya que permiten el aprendizaje de la cinética de producción, los rendimientos del PHA alcanzados y otros factores que dependen de la fuente de carbono⁴⁷.

⁴⁷ KOLLER, Martin, et al. producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. En: NEW BIOTECHNOLOGY. Jul 25, .vol. 37, no. Pt. A, p. 24-38.

Por otra parte, el reactor denominado como reactor batch secuencial (SBR), permite llevar a cabo en un solo tanque las etapas más importantes en la selección, como lo son la abundancia y hambruna, adicionalmente la longitud de estas puede ser modificadas sin cambiar otras variables de operación, brindando una flexibilidad al proceso de selección.⁴⁸ Así mismo, esta configuración al poseer un grado de libertad más, que un reactor de tanque agitado de flujo continuo, el comportamiento de la biomasa transitorio y la retención de esta en el reactor, es independiente del tiempo de retención hidráulico.⁴⁹

La implementación de las fases de alimentación, abundancia y hambruna, sedimentación y vaciado, repetidas veces por ciclos, constituye un proceso periódico que ejerce una fuerte presión sobre las poblaciones microbianas, estableciendo así una selección a favor de los microorganismos más adaptables.⁵⁰ Por otro lado, el tiempo total de un ciclo que en la mayoría de casos son 12 horas, depende directamente de la relación F/F (abundancia/ hambruna), como lo expone la autora Albuquerque y conjunto, este tiempo de un ciclo se ve alterado por esta relación puesto que a mayor valor se favorece el crecimiento de la microbiota no acumuladora del polímero.⁵¹

En la tercera fila, se determinó el tiempo total de aireación durante el cual se lleva a cabo la abundancia y la hambruna, tiempo utilizado únicamente como punto de referencia para la medición de los propios, puesto que este depende de la concentración del sustrato de alimentación y el tipo de esta, como también de la ORL inicial. La importancia de estas dos fases, radica debido a que el almacenamiento del PHA se produce en consecuencia a una limitación interna del crecimiento, es decir de componentes intracelulares insuficientes, como enzimas o ARN, durante la fase de hambruna mientras que, en la fase de abundancia, el donador de electrones como el aceptor se encuentran presentes⁵².

En cuanto al tiempo de retención hidráulico (HRT), se encontró que es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta, debido a que estima el tiempo de residencia en los reactores selectores, que logra la eliminación de la DQO biodegradable de la fase líquida⁵³.

⁴⁸ SERAFIM, Luisa, et al. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. En: APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Dec.vol. 81, no. 4, p. 615-628

⁴⁹ PAUL, Etienne and LIU, Yu. Biological sludge minimization and biomaterials/bioenergy recovery technologies. John Wiley & Sons, 2012.

⁵⁰ DIONISI, Davide, et al. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. En: WATER RESEARCH. vol. 39, no. 10, p. 2076-2084

⁵¹ ALBUQUERQUE, M. G. E.; TORRES, C. A. V. and REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. En: WATER RESEARCH. vol. 44, no. 11, p. 3419-3433

⁵² RITTMAN, B. Op. cit., p. XXX.

⁴⁷KOLLER, Martin, et al. Op. cit., p. XXX.

El tiempo de retención de lodos (SRT), determina teóricamente la vida microbiana media y, por lo tanto, la población microbiana, con lo cual un SRT más corto, puede seleccionar una comunidad microbiana con mayor capacidad de producción de PHAs que la seleccionada que en un SRT más largo⁵⁴. Adicionalmente, este factor modifica la relación F/F, debido a que, una baja concentración de biomasa al inicio de la fase de abundancia, puede convertirse en el factor restrictivo de la tasa de absorción volumétrica del sustrato, lo que lleva a una fase de fiesta relativamente más larga y una fase de hambruna más corta, que se cree que tiene efectos negativos en el enriquecimiento de los organismos que acumulan PHAs.⁵⁵

Con relación al sustrato de alimentación (acetato), según el artículo de Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures, este ha sido la sustancia de alimentación con la cual se ha obtenido una mayor acumulación de biomasa productora de PHAs, e incluso producción del biopolímero, usando cultivos mixtos el contenido máximo de PHA en el lodo fue del 67%⁵⁶, por medio del método de abundancia y hambruna, esto puede ser explicado además porque el acetato es uno de los ácidos grasos volátiles más simples que ayuda a regular el pH y a su vez es una fuente de carbono, la cual es convertida fácilmente a acetil-CoA, transformado posteriormente a PHB⁵⁷. Adicionalmente en el estudio de Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection, se concluye que, el acetato fue consumido en mayor velocidad en comparación al propionato, butirato y valerato⁷.

Respecto al proceso de nitrificación, este se evita, con la finalidad de impedir el crecimiento de las bacterias quimo autotróficas-oxidantes, las cuales obtienen su energía para el crecimiento por la oxidación, del amoníaco a nitrito y posteriormente a nitratos, proceso que se busca reprimir, ya que el amonio adicionado en forma de macronutriente, como se mencionó anteriormente, se desea conservar de esta manera para que las bacterias del cultivo mixto lo tomen en forma de nitrógeno, para su crecimiento; así, gracias a la búsqueda bibliográfica se encontró el uso de Tiouria como inhibidor de este proceso, sustancia que actúa sobre la enzima amonio

⁵⁴ CHUA, Adeline S. M., et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. En: WATER RESEARCH. vol. 37, no. 15, p. 3602-3611

⁵⁵ Zhiqiang Chen Long Huang Qinxue Wen Huichao Zhang Zirui Guo. Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process : from activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. En: Revista de ciencias ambientales: Inglés. vol. 52, no. 2, p. 76-84

⁵⁶ REIS, M., et al. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. En: BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING. Jul.vol. 25, no. 6, p. 377-385

⁵⁷ OHNSON, Katja, et al. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. En: BIOMACROMOLECULES. Apr 13,.vol. 10, no. 4, p. 670-676

monooxigenasa, compitiendo por el cobre del centro activo con dicha enzima en las bacterias nitrificantes⁵⁸.

Además, la presencia de la nitrificación trae consigo grandes inconvenientes como, la alta demanda de oxígeno en la oxidación del amoníaco y el aumento de acidez en el licor mixto.

En la penúltima fila del Cuadro 6, se estableció un valor de 1 vvm (volumen de aireación/ volumen del reactor * min), esto debido a dos factores. El primero, para asegurar una aireación excesiva en la cual el oxígeno no limita la reacción bioquímica para la producción de PHAs; y segundo, puesto que en el estudio de Serafim y conjunto, la mayor acumulación de PHA se benefició con el aumento de la tasa de aireación de 0,4 a 1 vvm⁵⁹. Resaltando que este valor debe tomar mayor importancia y establecerse cuando se aumente el volumen de producción, al ser una variable que influye directamente en los costos de obtención del biopolímero⁶⁰. Finalmente, el control del pH en el reactor selector, no posee efectos significativos en el enriquecimiento de microorganismos productores de PHA, como lo demuestran los estudios de Chua y Zhiqiang, concluyendo que este factor no afecta al proceso de selección entre los rangos 7 a 8⁶¹ y de 8 a 9⁶², respectivamente.

Por otro lado, la temperatura al igual que el pH no se controló a lo largo de la operación del biorreactor, pues en diferentes fuentes se ha concluido que a temperaturas altas, el almacenamiento del biopolímero en las bacterias es menor, como también, se expone que a temperaturas entre 20 y 25°C, se ha obtenido una mayor acumulación de biomasa productora de PHAs⁶³. Sin embargo se ha encontrado que las diferentes clases de PHA por ejemplo, el PHB puede cambiar sus propiedades fisicoquímicas según su peso molecular, lo cual depende de las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas del productor; por tal motivo se

⁵⁸ IIZUMI, Taro; MIZUMOTO, Masahiro and NAKAMURA, Kanji. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. En: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Oct 1, .vol. 64, no. 10, p. 3656-3662.

⁵⁹ SERAFIM, Luísa S., et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. Jul 20, .vol. 87, no. 2, p. 145-160.

⁶⁰ COATS, Erik R.; WATSON, Benjamin S. and BRINKMAN, Cynthia K. Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. En: WATER RESEARCH. Dec 1, .vol. 106, p. 26-40.

⁶¹ DIONISI, Davide, et al. Op. cit., p. XXX.

⁶² CHEN, Zhiqiang, et al. A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure. En: INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. Jan.vol. 72, p. 1329-1334.

⁶³ KRISHNA, Chundakkadu and VAN LOOSDRECHT, Mark C. M. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. En: WATER RESEARCH. vol. 33, no. 10, p. 2374-2382

halló que la temperatura de crecimiento no tuvo prácticamente ningún efecto en la acumulación de PHB o el peso molecular dentro de 30–37°C⁶⁴.

En síntesis, según el análisis bibliométrico realizado es necesario emplear para la operación del biorreactor selector, acumulador de bacterias productoras de PHAs. Primero, volúmenes bajos a escala laboratorio, debido a los altos costos del proceso tanto en materias primas (sustrato) y aireación. Segundo, la configuración del reactor en SBR, que le proporciona una flexibilidad a la operación por etapas, donde una de ellas es la fase de abundancia y hambruna, necesaria para ejercer una presión selectiva sobre la microbiota del lodo activado. Tercero, los tiempos de retención hidráulico y de lodos, donde uno tiene en cuenta la eliminación de la DQO del sustrato y el otro suministra información sobre la vida de los microorganismos al interior del biorreactor. Cuarto, se estableció la tiourea como agente inhibidor de la nitrificación, finalmente, se encontró que no es necesario el control del pH, ni de la temperatura.

Los anteriores parámetros, fueron comparados con estudios anteriores de la Universidad Antonio Nariño, quienes estudiaron el efecto del pH y del tipo de inóculo de lodos activados, utilizando como sustrato los AGV producto de la etapa acidogénica, en reactores air-lift, empleando los parámetros de operación descritos en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Parámetros utilizados en investigaciones de la Universidad Antonio Nariño.

V (mL)	HRT (días)	SRT (días)	[AGV] (mg HAc/L)	pH alimento	Tipo de inóculo	Concentración inóculo	F/M
1600 (S ₁ ,S ₂) 1500(S ₃ , S ₄ y S ₅)	1	5,5	600	Sin control (S ₁ , S ₂ y S ₃) 6,5 (S ₄) 8 (S ₅)	PETAR doméstica (S ₁ ,S ₂) Lodos activados industria láctea (S ₃ , S ₄ y S ₅)	1291 mgSSV/L	0,35 mg A.A/mg SSV

Fuente: elaboración propia.

El Cuadro 7 muestra parámetros de vital importancia tenidos en cuenta, pues dieron razón al ajuste del pH para el sustrato en los rangos elegidos bibliográficamente, permitió contrastar los volúmenes y tener una idea de la concentración apropiada del inóculo en sólidos suspendidos volátiles, adicionando la relación F/M, la cual mide la razón entre la concentración de alimento y la cantidad de microorganismos

⁶⁴ MYSHKINA, V., et al. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. En: APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY. Sep.vol. 44, no. 5, p. 482-486.

presentes en el licor fermentativo, factor asociado a la velocidad de crecimiento de los microorganismos⁶⁵.

En el trabajo Valorización de residuos orgánicos en un prototipo de biorrefinería para la producción de biopolímeros (polihidroxialcanoatos-PHA), de la Universidad Antonio Nariño, analizado anteriormente con el Cuadro 7, se concluyó, que los reactores selectores S1 y S2, presentaron una concentración de AGV remanente, independiente de la concentración de AGV del alimento, la duración del ciclo y el tipo de lodo. Este fenómeno, se le atribuyó en este estudio a la DQO no AGV del alimento proveniente de los reactores acidogénicos y por la influencia del pH del alimento.

De lo anterior, cabe destacar que los biorreactores utilizados en el desarrollo de este proyecto serían los mismos que se mencionan en el estudio de la UAN, por tal motivo al comparar los parámetros empleados para su operación y los obtenidos a partir del análisis bibliométrico, se consiguió contener los más importantes y definitivos para la operación de los airlift en este trabajo, en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Parámetros para operación de los airlift.

Parámetro		Valor
Volumen (mL)		1450
Ciclos	tiempo total/tipo de reactor/ adecuación de lodo	12h/SBR/24h
	Feast & Famine (min)	630
	HRT (días)	1
SBR	SRT (días)	5
Tipo de sustrato/ pH		Ácido acético/ melaza+ ácido acético/ 7,5
Concentración del sustrato (mgDQO/L)		1600
Macro y micronutrientes		NH ₄ Cl/ MgCl ₂ / MgSO ₄ / Na ₃ PO ₄ /CaCl ₂ / FeCl/ CoCl ₂ /MnCl ₂ /ZnSO ₄ /CuSO ₄
Tipo de inóculo		Lodos activados
Concentración Inoculo (mgSST/L)		1333,33
F/M (mgDQO/L/mgSST/L)		1,2
Anti-nitrificación (mg/L)		Tiourea
Aireación en el reactor (vvm)		1
Temperatura (°C)/ pH en el reactor		Ambiente (17°- 23°C) / sin control

Fuente: Elaboración propia.

⁶⁵ SETIADI, Tjandra, et al. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Ralstonia eutropha* JMP 134 with volatile fatty acids from palm oil mill effluent as precursors. En: WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY: A JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER POLLUTION RESEARCH. vol. 72, no. 11, p. 1889-1895

Los reactores airlift fueron contruidos a partir de cilindros de polietileno tereftalato de 3.5" de diámetro y 13.77" de altura, con un tubo concéntrico de PVC de diámetro 1½" en su interior con altura de 7.78", este acoplado a la base de polietileno tereftalato con resina poliéster. A 4" de altura se realizó un agujero para la elaboración del sistema de vaciado al cual se le ensambló un tubo en PVC de ½" de diámetro, junto con un empaque para evitar fugas, al que se le conectó una unión de plástico, con el fin de poder separar el biorreactor del sistema de vaciado para posibles mantenimientos de forma fácil y rápida; a esta unión se ensambló otro tubo el cual contenía en su interior otro de menor diámetro que permitiera vincular la electroválvula de vaciado, ajustando todas las piezas con silicona para PVC. Por otro lado, en la parte superior, el biorreactor cierra con una tapa de 3,6" de diámetro de PVC, a la cual se le realizaron tres agujeros uno para el sensor de nivel, otro para la manguera de aireación y otro para el sistema de alimentación con una válvula check. El sistema fabricado se puede observar en la Foto 3.

Foto 3. Reactores air-lift.



Fuente: elaboración propia.

Por otro lado se construyó un sistema de automatización mostrado en la Foto 4, basado en un módulo de 4 relés, programado para el control de la operación de las etapas SBR por tiempo (llenado, aireación, sedimentación y vaciado), conectado a un sistema de pantalla y teclado para la visualización y modificación de los parámetros de control, así cada equipo se conectó a este sistema para su manejo de forma automática, el llenado depende de un sensor de nivel magnético de flotador ajustado para un volumen determinado, el alimento es impulsado a través de un sistema de manguera siliconada por una motobomba de agua de 12V, donde del otro extremo en el biorreactor una válvula check controla el paso del líquido, mientras que la aireación al interior del biorreactor se proporciona por medio de un aireador rs electrical- 610, que conduce el aire hasta el biorreactor, de igual manera

que el alimento, sino que al final de este se instaló un difusor esférico para reducir el tamaño de las burbujas.

Foto 4. Pantalla de control para etapas de SBR.



Fuente: elaboración propia.

En resumen, se escogió un volumen entre los valores utilizados bibliográficamente y los rangos empleados por la UAN, los tiempos de cada ciclo y HRT coinciden tanto los extraídos del análisis bibliométrico como los del estudio de la UAN, el tiempo de retención de lodos fue establecido a partir del análisis bibliométrico, mientras que el tiempo de abundancia y hambruna únicamente sirvió como punto de partida para la determinación del tiempo real, la concentración del sustrato se escogió en base a la concentración en DQO de la corriente de producto de AGV del reactor acidogénico que se opera actualmente en la Universidad Antonio Nariño, el tipo de inóculo se tuvo en cuenta según la conclusión del estudio previamente citado, en la cual se expresa que el tipo de lodo de agua residual no influye en gran medida en la operación de los biorreactores selectores.

La concentración del inóculo se calculó en base a la relación F/M escogida, donde el almacenamiento de PHAs y eliminación de DQO, en el transcurso de la etapa de abundancia y hambruna cíclicamente, se beneficia en relaciones relativamente altas entre 0,4 y 2⁶⁶, finalmente el compuesto anti-nitrificación, la aireación la temperatura y pH en el reactor fueron seleccionados en la discusión de parámetros a partir de lo analizado bibliográficamente.

⁶⁶ KRISHNA, Chundakkadu and VAN LOOSDRECHT, Mark. Op. cit., p. XXX.

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LODO

Este procedimiento, se llevó a cabo para visualizar la presencia de bacterias productoras de PHAs en la microbiota del lodo activado, empleando para este fin el colorante rojo Nilo, como primer indicador, el cual se ha utilizado en la técnica de tinción durante la siembra de las bacterias a analizar, puesto que, al diluirlo en el agar, no afecta el crecimiento de los microorganismos cultivados.

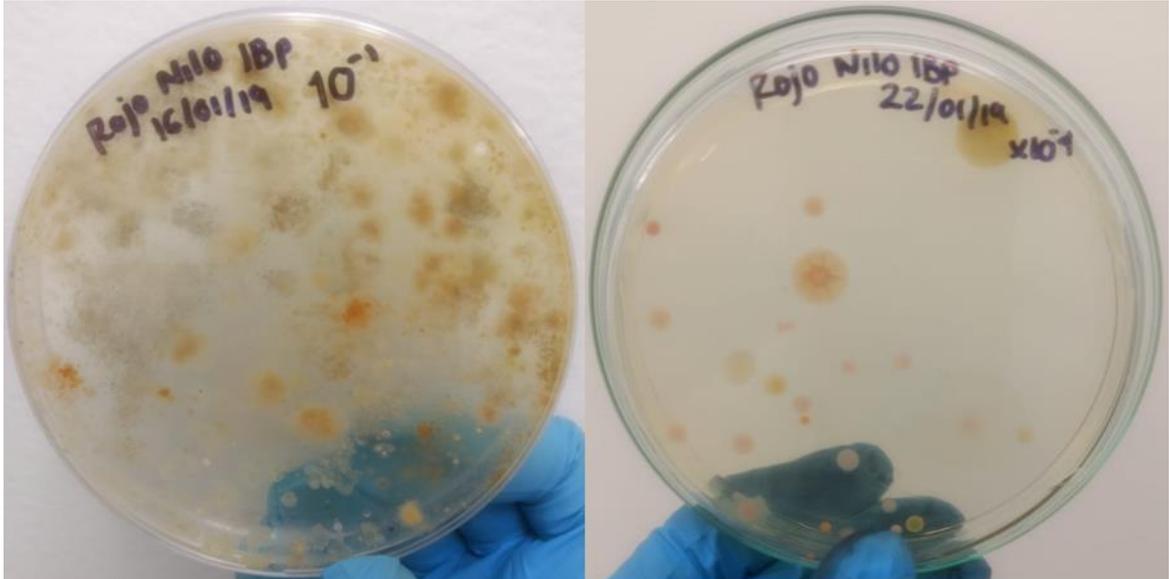
Este indicador, se adhiere a lípidos intracelulares, creando fluorescencia al diluirse en medios no polares como el dimetilsulfóxido (DMSO)⁶⁷, de esta manera permite observar un resultado positivo a polihidroxicanoatos, pues estos al acumularse en el citoplasma de las células son protegidos por una capa de fosfolípidos⁶⁸, los cuales poseen afinidad por el colorante rojo Nilo, así, las bacterias acumuladoras del biopolímero, al crecer en el agar manifiestan una coloración rosa tenue.

Por este motivo, se siembran las diluciones mencionadas en la sección 3.3.1, empleando la técnica de extensión en placa, en el agar con rojo Nilo, obteniendo coloración en la mayoría de las colonias, como se muestra en la foto 5.

⁶⁷ GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda, et al. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Feb 1, .vol. 29, no. 1, p. 77-115.

⁶⁸ SAHAI, A., et al. Original paper. En: International Journal of Clinical Practice. Dec 1, .vol. 61, no. 12, p. 2026.

Foto 5. Comparación de diluciones 1×10^{-1} y 1×10^{-4} del lodo activado, en tinción rojo Nilo.



Fuente: elaboración propia.

Adicionalmente, los resultados de las diluciones sembradas, fueron comparadas con una cepa positiva a tinción rojo Nilo, aislada en el laboratorio de la Universidad Antonio Nariño, como patrón, la cual se presenta en la Foto 6.

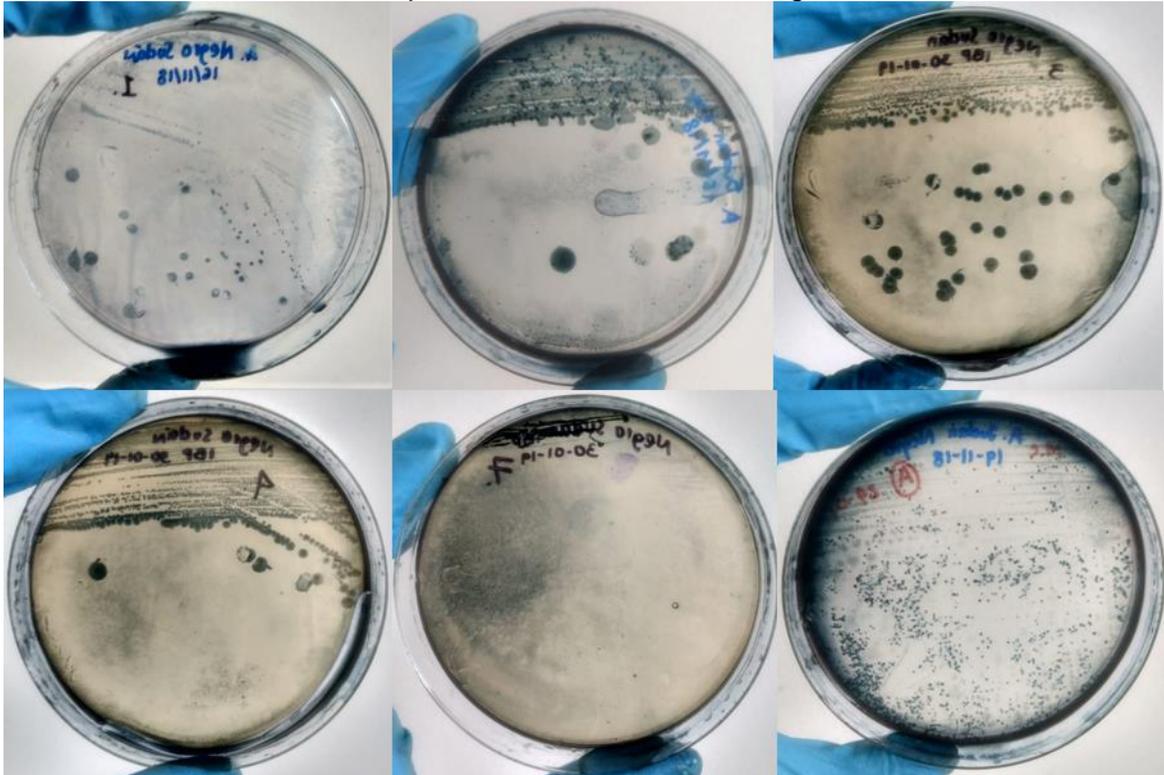
Foto 6. Cepa patrón, en tinción rojo Nilo.



Fuente: elaboración propia.

De esta forma, se aislaron las colonias teñidas de rosa en agar mencionado en la sección 3.3.2, sembradas por la técnica de agotamiento y al recubrirlas con negro Sudán, durante 30 min, este se adhirió a la capa lipofílica que recubre la inclusión de PHAs, visualizando un resultado positivo para todas las cepas aisladas (1,2,3,4,7, A, B, B' y E), como se muestra en la Foto 7.

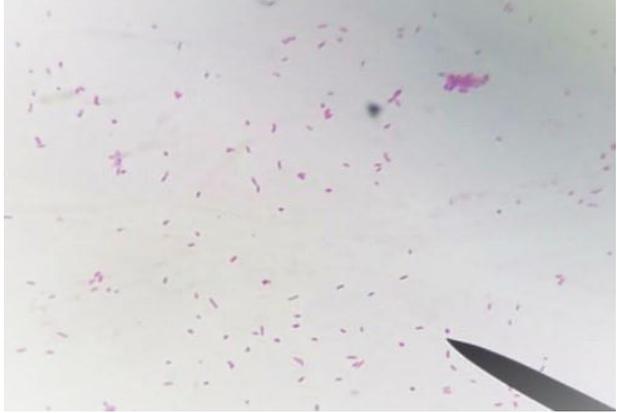
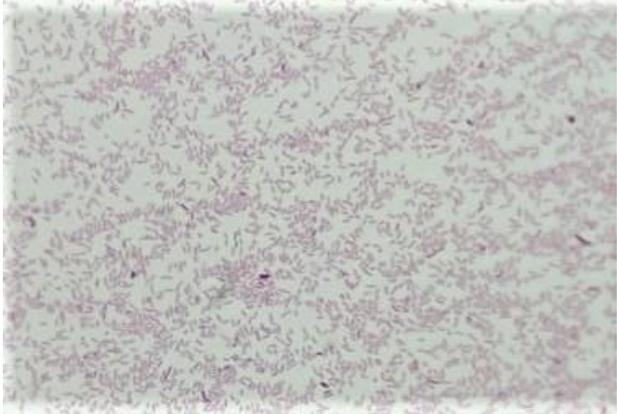
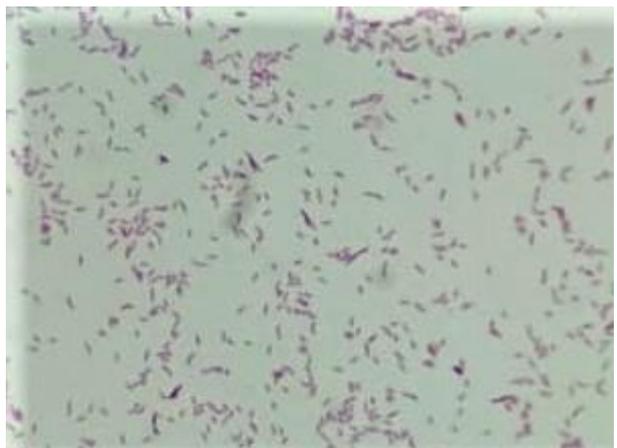
Foto 7. Resultados de las cepas aisladas, en tinción Negro Sudán.



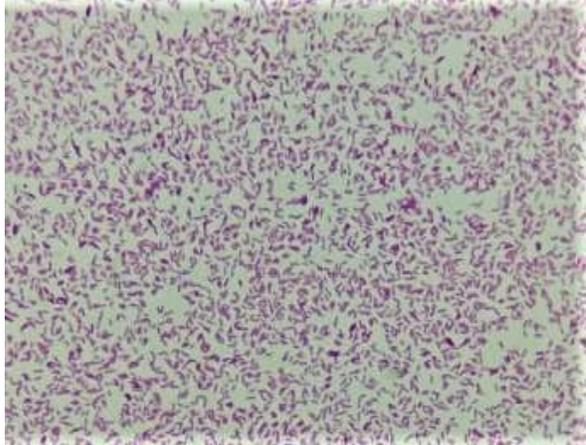
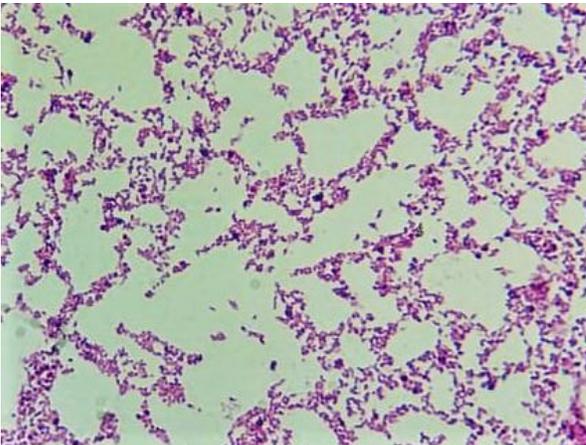
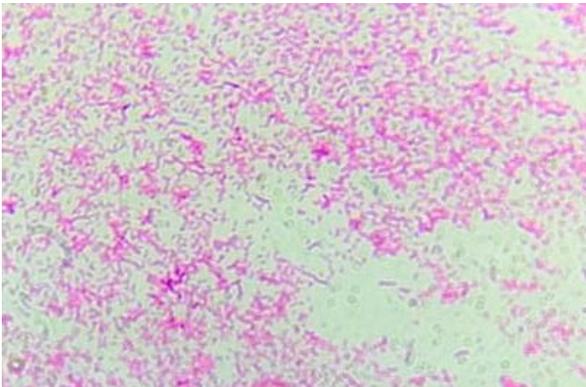
Fuente: elaboración propia.

En consecuencia, la tinción negro Sudán al ser una técnica destructiva de las células, fue necesario replicar las colonias positivas a la prueba de rojo Nilo en Agar nutritivo, con el fin de estudiar las características macro y micro (tinción de Gram) de las mismas, lo cual permitió dar una idea global de las posibles bacterias a obtener al finalizar el proceso de selección en los biorreactores. Clasificándolas como se puede apreciar en el Cuadro 9.

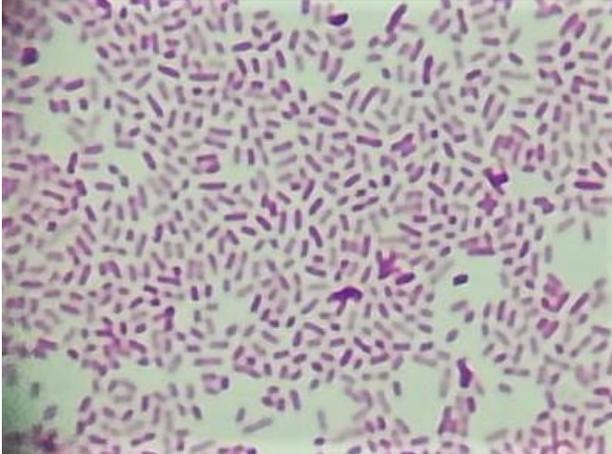
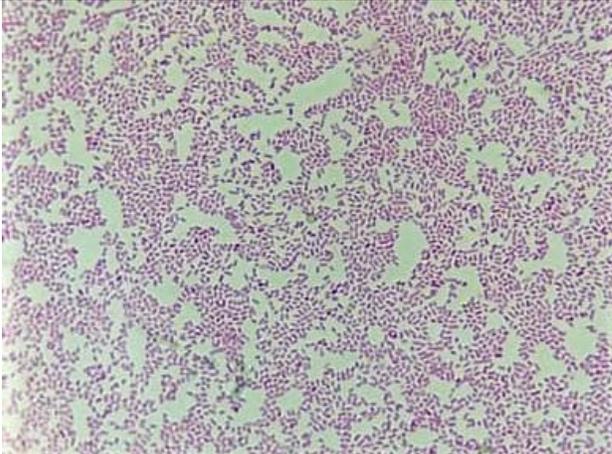
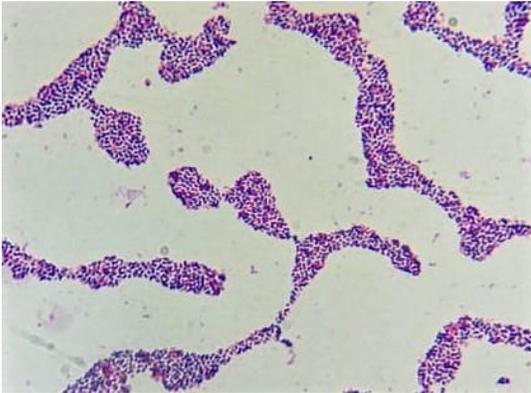
Cuadro 9. Caracterización macro y micro de las cepas aisladas del lodo activado.

Cepa	Tinción de Gram	Características	Imagen
1	Bacilos Gram -	Presenta una morfología plana respecto a su superficie, en cuanto su forma es circular de borde redondeado, no posee color	
2	Bacilos Gram -	La superficie de esta cepa es planoconvexa. De forma irregular con bordes ondulados, no posee color	
3	Bacilos Gram +	La morfología de su superficie es papilada, de forma circular y bordes redondos	

Cuadro 9. (continuación)

Cepa	Tinción de Gram	Características	Imagen
4	Bacilos y Cocos en pares Gram +	Posee una superficie planoconvexa, de forma irregular y bordes ondulados, su color es blanco	
7	Cocos Gram +	Presenta una superficie planoconvexa, puntiforme y bordes ondulados, de color naranja.	
A	Bacilos Gram -	La morfología de su superficie es plana, de forma circular, con bordes redondeados, color amarillento	

Cuadro 9. (Continuación)

Cepa	Tinción de Gram	Características	Imagen
B	Bacilos Gram +	Superficie umbilicada, de forma irregular, con bordes ondulados, sin color	
B'	Cocos Gram +	Superficie plana, de forma irregular y bordes ondulados, de color amarillento	
E	Cocos Gram +	La morfología de la superficie es planoconvexa, puntiforme, sus bordes son ondulados, de color naranja	

Fuente: elaboración propia.

En el cuadro 9, se evidencia en mayor proporción cocos y bacilos Gram (+), en cuanto a la morfología microscópica, de las bacterias aisladas productoras de PHAs en el lodo activado, esto como un primer acercamiento a la biomasa que se espera seleccionar en el reactor air-lift.

Entre estas, tres cepas (1, 2 y A) pertenecientes al género *Bacillus*, Gram negativas, las cuales son de gran importancia, debido a que poseen una gran ventaja al ser capaces de sintetizar co-polímeros de manera natural, sin la necesidad de un sustrato precursor, además los polihidroxicanoatos sintetizados en bacterias Gram (-), pueden ser utilizados en aplicaciones médicas puesto que poseen lipopolisacáridos que causan reacciones inmunogénicas, los cuales no se producen en las bacterias Gram positivas^{69,70}

A partir de la tinción Gram y de las características macroscópicas, fue posible inferir que las cepas 7 y E presentan aspectos similares, como color, cremosidad y tiempo de incubación, con lo cual, se concluyó que era la misma cepa; caso contrario, a las cepas B y B' que, en su inicio, presentaron características macroscópicas similares, pero en su morfología microscópica, se concluyó que eran cepas diferentes.

En general, el resultado de esta caracterización fue satisfactoria, al encontrar abundancia de cepas acumuladoras de PHAs, de diferentes clases en su mayoría Gram positivas, destacando el hallazgo de tres cepas Gram negativas, las cuales poseen mayor aplicación industrial en la actualidad. A pesar, de desconocer el nombre de la especie de cada una de las cepas aisladas, para fines del proyecto, se requería conocer la existencia de bacterias acumuladoras de PHAs, en el lodo activado a trabajar, resaltando la cantidad de bacterias confirmadas como productoras del biopolímero en el lodo trabajado, a comparación de otros tipos de lodos que se han estudiado, en los cuales se halla una población más baja de estas, siendo una probable consecuencia de este resultado, la forma de operación del tratamiento de agua que se esté realizando en la empresa IBERPLAST S.A, a partir del sistema de lodos activados.

4.3 ACONDICIONAMIENTO DEL LODO

Como se mencionó en la sección 3.4, el primer paso para el montaje del sistema de lodos activados, consistió en la dilución de una pequeña muestra de lodo en el alimento, debido a que la muestra proporcionada por IBERPLAST S.A, fue tomada del lodo sedimentado, mas no del licor mixto (SSVLM) contenido en la corriente de purga al sistema de tratamiento de agua.

⁶⁹ VALAPPIL, Sabeel, et al. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. En: ANTONIE VAN LEEUWENHOEK. Jan.vol. 91, no. 1, p. 1-17

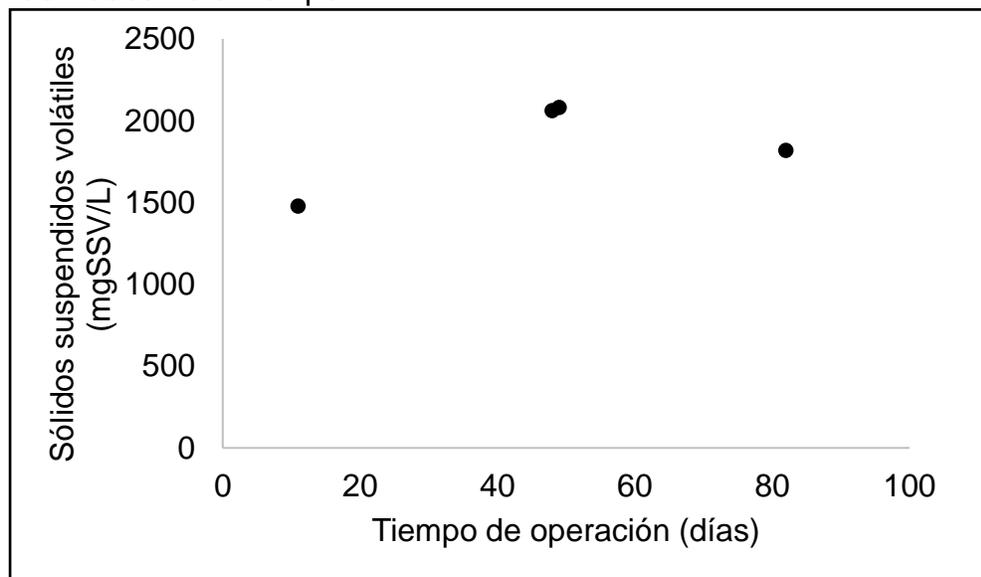
⁷⁰ GONZÁLEZ, María. Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias de género *Bacillus* de origen marino. Tesis de maestría La Paz.: Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. 2008. 17 p.

Así, el sistema de lodos activados operó durante 11 días, sin control de la relación A/M, para la cual se requería la medición de sólidos suspendidos volátiles, que indicaría la cantidad óptima de alimento con respecto a los microorganismos presentes en el sistema, es decir, la cantidad máxima de sustrato utilizado por los mismos.

Al observarse el crecimiento del lodo, fue posible monitorearlo por medio de las medidas de sólidos suspendidos totales y volátiles, con lo cual se estableció un valor de A/M alrededor de 0.4, para la operación de ambos sistemas construidos, según lo ha determinado de manera empírica el autor Bruce E. Rittmann.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se realizó un seguimiento a los sólidos suspendidos volátiles del primer sistema de lodos activados inoculado, el cual se evidencia en la Gráfica 1.

Gráfica 1. Trazabilidad de SSV, para el primer sistema de lodos activados Vs el tiempo.



Fuente: elaboración propia.

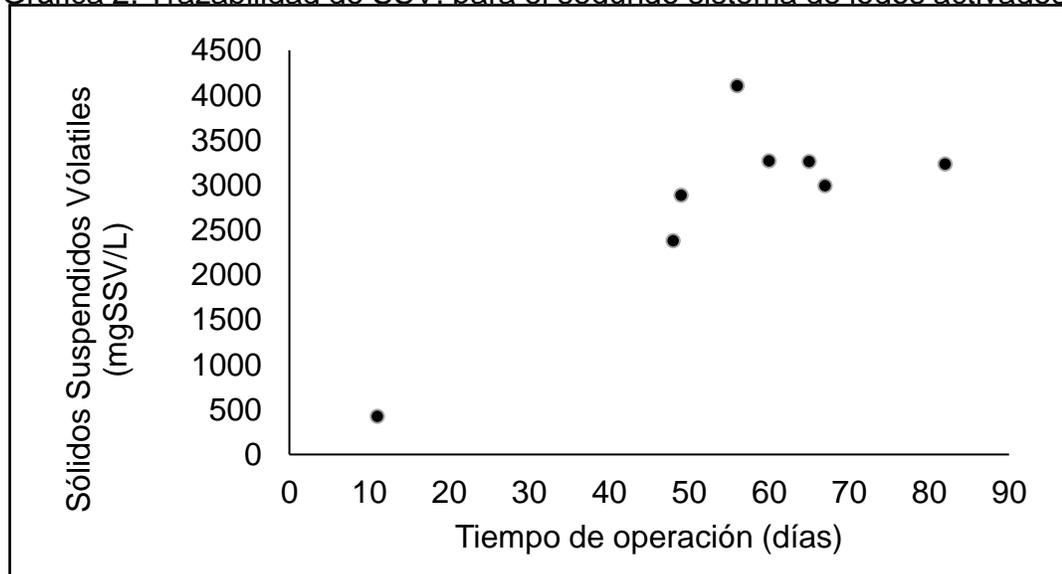
La trazabilidad de esta medición, muestra un aumento de la biomasa con el paso del tiempo, a pesar de su decrecimiento en el día 82 de operación, como consecuencia a la forma manual de extracción del sobrenadante, en el momento de alimentación y a la falta de sedimentabilidad, parámetro que se describe más adelante con la medición del IVL de este sistema.

En la Gráfica 2, se evidencia el crecimiento de la biomasa del segundo sistema de lodos activados, iniciando desde el día cero hasta el día de purga. Utilizando esta medida como indicador del instante en el cual el lodo se encuentra sobre la pendiente de la curva de crecimiento (1100 a 4500 mgSSV/L), momento apropiado

para realizar una purga en el sistema, permitiendo la regeneración de la microbiota, sin alterar la relación A/M.

Fue necesario mantener la cantidad entre los rangos de crecimiento mínimo y máximo de 1100 a 4500mgSSV/L, debido a que al manejar una concentración baja en el lodo (rango inferior) se desperdiciaría sustrato al no ser consumido, y si se maneja a la más alta concentración de 4500 se puede ocasionar que la transferencia de oxígeno se afecte negativamente, al haber crecido abundantemente el lodo.

Gráfica 2. Trazabilidad de SSV. para el segundo sistema de lodos activados.

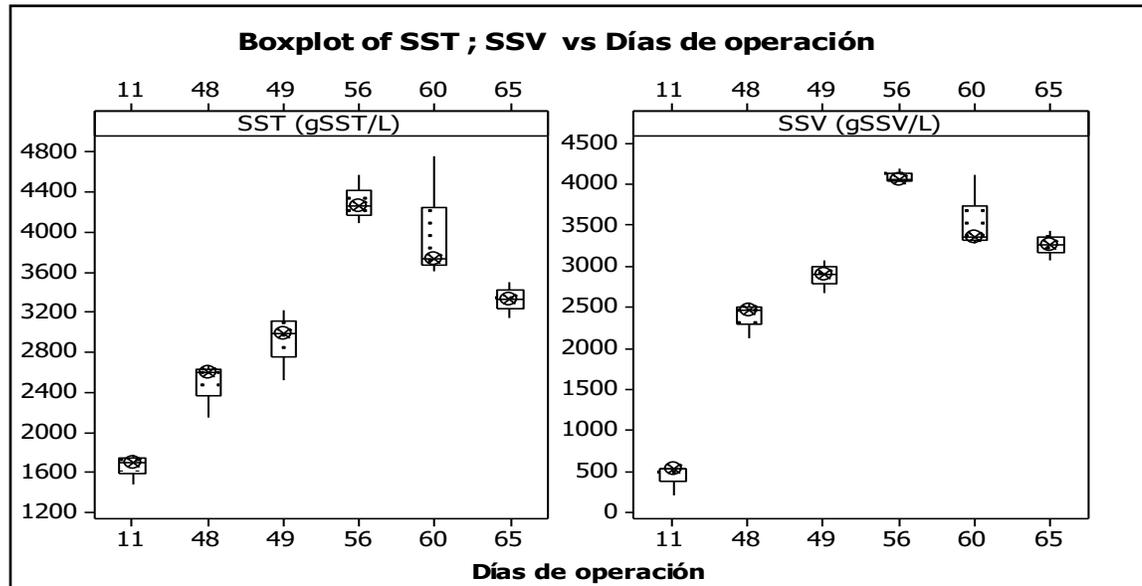


Fuente: elaboración propia.

El comportamiento, de los SSV con respecto a los días de operación, es de forma ascendente, más sin embargo en el día de operación 56, al presentarse el mayor valor de la medida, esta disminuyó a los 4 días, como consecuencia a la forma de alimentación del sistema, pues al retirar el sobrenadante, como falla humana se extrajo parte de la biomasa, la cual poseía una sedimentación baja, así al tomar de nuevo la medida de SSV los siguientes 4 días del suceso esta disminuyó casi el 20,41%.

Con el propósito de evaluar la dispersión, tendencia y variabilidad de los resultados anteriores, se realiza una gráfica de cajas y bigotes en el software Minitab. Gráfica 3, la cual compara los valores de sólidos suspendidos volátiles y los sólidos suspendidos totales con respecto a los días de operación, en los que se tomó una muestra característica del segundo sistema de lodo activado y se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección 3.4.3.

Gráfica 3. Diagrama de cajas y bigotes con los resultados obtenidos para sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).



Fuente: elaboración propia.

Los resultados de SST, en general están comprendidos entre 1500 a 4800 gSST/L, con lo cual al igual que en la gráfica 2 se evidencia un crecimiento del lodo y al compararse con el crecimiento de los SSV de 200 a 4200 gSSV/L, se puede inferir que se debe a un crecimiento de los microorganismos en el licor mixto, disminuyendo la cantidad de materia inorgánica en el sistema.

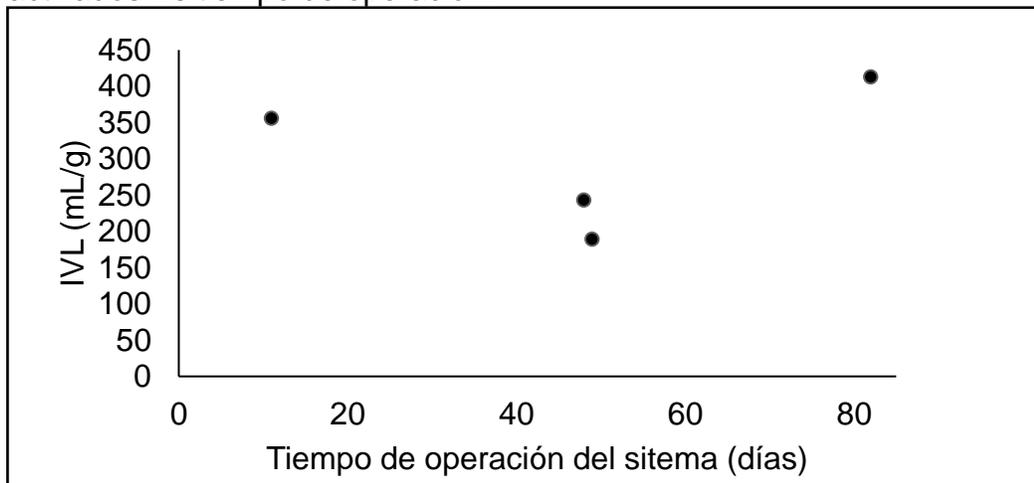
A pesar de obtener una buena precisión, al obtener cajas sin largos bigotes, en los que se presenten valores por fuera del rango de cada medición, el resultado del día 60 posee un rango muy amplio y la mediana que junto con el primer cuartil se encuentran muy cerca al límite inferior, demuestran que la cápsula que arrojó el mayor valor tanto en SSV como en SST tuvo un error de medición desde el peso inicial. De esta manera, se muestra la confiabilidad en los resultados obtenidos por medio de esta prueba.

Al mismo tiempo, se realizó la prueba de sólidos suspendidos sedimentables del licor mixto, con el fin de encontrar el índice volumétrico de los lodos activados, el cual evalúa la capacidad de compactación o sedimentación de los flocs que conforman el lodo, cuantificando la altura expresada en mL de la interface de sólidos después de sedimentar el licor mixto⁷¹.

⁷¹ RÖSSLE, W. H., et al. RESEARCH ON ACTIVATED SLUDGE SETTLING BEHAVIOUR BASED ON SHORT-TERM TEMPERATURE VARIATIONS. En: UNIVERSITY OF PRETORIA. SUDÁFRICA.

Por ello, se monitoreó este parámetro obteniendo las gráficas 4 y 5, la primera muestra el comportamiento del IVL del primer sistema inoculado, el cual mostró una conducta con baja sedimentabilidad, mostrando mejoras con el avance de los días de operación, sin embargo, se dejó de monitorear pues con la implementación de macro y micronutrientes en la alimentación no mejoró la calidad de la sedimentación.

Gráfica 4. Trazabilidad del índice volumétrico del primer sistema de lodos activados Vs tiempo de operación.



Fuente: elaboración propia.

Cuadro 10. Características de sedimentación de lodos activados con relación al IVL.

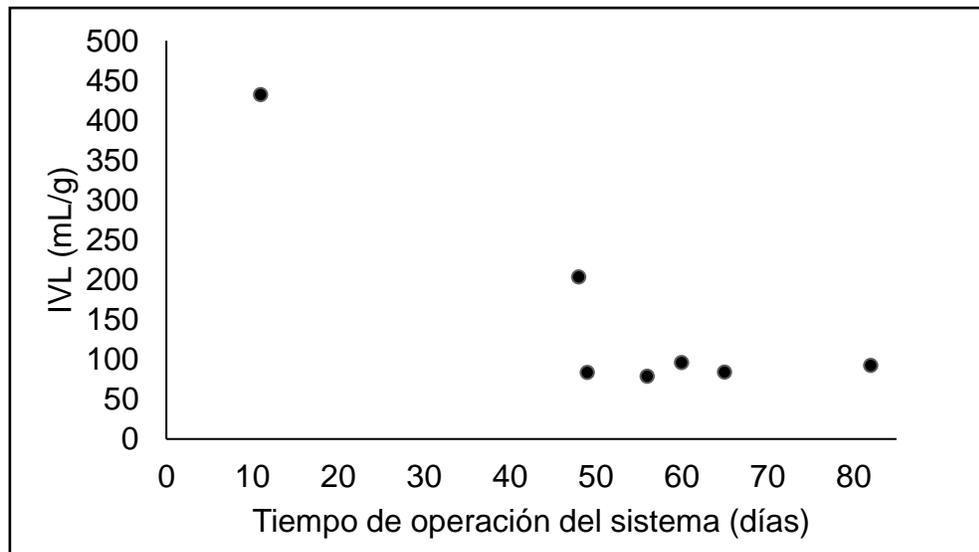
Rango de IVL ml/g	Características de comparación y de sedimentación de los lodos activos
<80	Excelente
80-150	Moderado
>150	Pobre

Fuente: FERRARA, Griselda y RAMÍREZ, Armando. Análisis de la sedimentabilidad de los lodos biológicos producidos en un RCS durante la desnitrificación de un efluente de un biorreactor de crecimiento adherido. *En*: Revista de la facultad de Ingeniería Universidad Central de Venezuela. Mar 1, vol. 28, no. 1, p. 37-44.

El Cuadro 10 corrobora la baja sedimentabilidad mostrando claramente un problema en la formación de flocs biológicos, llamado bulking, el cual se puede diagnosticar de tres maneras: la primera examinando una muestra del lodo al microscopio, identificando dentro de la microbiota un exceso de bacterias filamentosas, la segunda, obtener un valor de IVL alrededor de 200 mL/g e incluso un valor de 500mL/g el cual indica un grave problema de bulking y por último la combinación entre una baja concentración de sólidos suspendidos en el fondo del cono Imhoff y la formación de una capa de lodo en la parte superior.

Por otro lado, la Gráfica 5 muestra el comportamiento del índice volumétrico de lodos para el segundo sistema de lodos activados, de igual manera se identificó mediante este parámetro, un grave problema de sedimentación como consecuencia al bulking; se brindó una severa atención a esta situación, pues una de las etapas en la forma de operación SBR de los reactores selectores airlift consiste en la sedimentación de la biomasa, por lo tanto el lodo debía contar con un resultado positivo al IVL, de lo contrario, al inocular los biorreactores selectores siendo escasa la formación de flocs, la biomasa escaparía en la etapa de vaciado, al permanecer suspendida en el sobrenadante, dificultando la acumulación de la biomasa, como lo expone Zhiqiang Chen los cultivos mixtos con IVL superiores a 100 no se pueden utilizar en los siguientes ensayos de acumulación⁷².

Gráfica 5. Trazabilidad del índice volumétrico de lodos vs el tiempo de operación del segundo sistema de lodos activados inoculado.



Fuente: elaboración propia.

Habiendo identificado el bulking como causa del problema por falta de sedimentación, se dispuso a combatirlo como se describe en el anexo B, evidenciando una mejoría en corto tiempo, como se contempla en la Foto 8, en dónde en la imagen izquierda, se contempla formación de biomasa alrededor de los aireadores de forma seccionada.

⁷² Zhiqiang Chen Long Huang Qinxue Wen Huichao Zhang Zirui Guo. Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process : From activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. En: Journal of Environmental Sciences . vol. 52, no. 2, p. 76-8.

Foto 8. Aspecto del segundo sistema de lodos activados, antes (izquierda) y después (derecha) de controlarse el bulking.



Fuente: elaboración propia.

4.4 DETERMINACIÓN DE TIEMPOS DE ABUNDANCIA Y HAMBRUNA

Con el objetivo de generar las condiciones de selección dentro del reactor, es decir favorecer la supervivencia de bacterias productoras de PHAs, se procedió a determinar los tiempos de abundancia con ayuda de la medición del oxígeno disuelto y los tiempos de hambruna con la visualización de crecimiento en extensión en placa de la biomasa, distinguiendo entre biomasa total y bacterias productoras de PHAs.

4.4.1 Inoculación de los cuatro reactores selectores. La relación F/M fue establecida a partir de búsqueda bibliográfica, en la cual se estudió el efecto de diversos valores de F/M, concluyendo un mayor consumo del sustrato, en altas cargas del mismo (mayor concentración del sustrato 8,5- 20gDQO/L), por lo tanto una razón de alimento- microorganismos más alta, que repercute en el almacenamiento de carbono y energía, lo cual permite a las bacterias productoras de PHAs sobrevivir al periodo de hambruna, durante la selección⁷³.

Por otra parte, cabe resaltar la gran cantidad de bacterias productoras de PHAs, en la muestra inicial del inóculo de los reactores selectores, puesto que al sembrar está en medio rojo Nilo, con el fin de cuantificar las células viables tanto de biomasa común como productora de PHA, se halló $2,1 \times 10^8$ UFC/mL de bacterias acumuladoras del biopolímero, en promedio, en dicha muestra inicial; valor atribuible a las condiciones de operación del sistema de lodos activados, en el cual

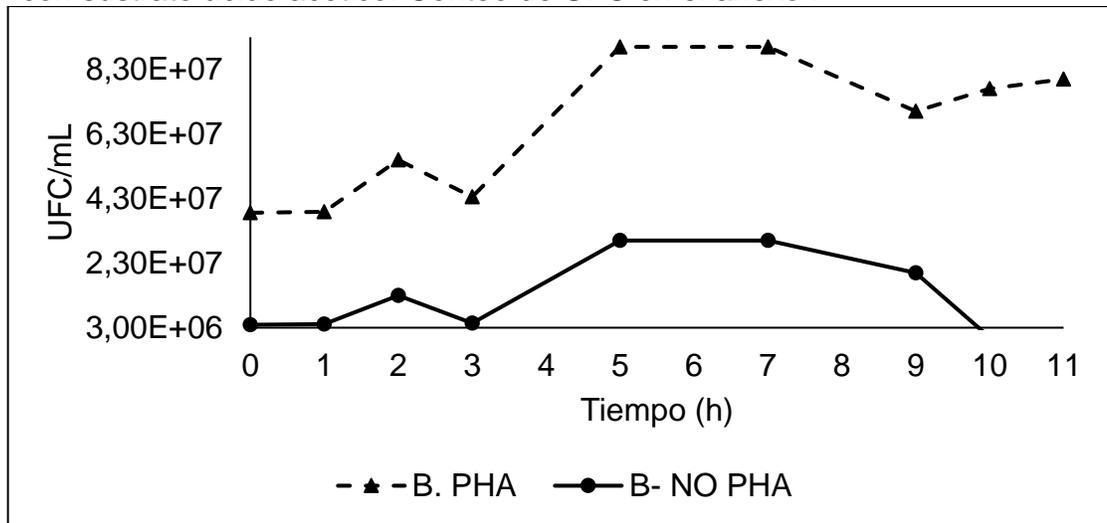
⁷³ KOLLER, Martin, et al. Op. cit., p. 245.

posiblemente se llevó a cabo una selección, puesto que el sistema operó bajo un sistema SBR, alimentando cada 24h, con el fin únicamente de mantener una muestra fresca y uniforme de microorganismos para la inoculación de los biorreactores airlift, más no, una operación propia de un sistema de tratamiento de aguas.

4.4.2 Seguimiento al crecimiento de la microbiota total y productora de PHA.

Gracias a los recuentos en placa realizados, fue posible obtener precisión en el monitoreo del avance en la cantidad de biomasa productora y no productora de PHA, de esta manera, determinar el momento justo en el cual se debía detener la etapa de hambruna, permitiendo acumular la mayor cantidad posible de bacterias acumuladoras del polihidroxiclcanoato, para la supervivencia en el siguiente ciclo. Así en la Gráfica 6, se muestra el crecimiento tanto para biomasa no productora de PHA, como las que son únicamente acumuladoras del biopolímero, en este caso para el sustrato ácido acético.

Gráfica 6. Crecimiento de biomasa en el tiempo, para el ciclo dos, operando con sustrato ácido acético. Conteo de UFC en el anexo F

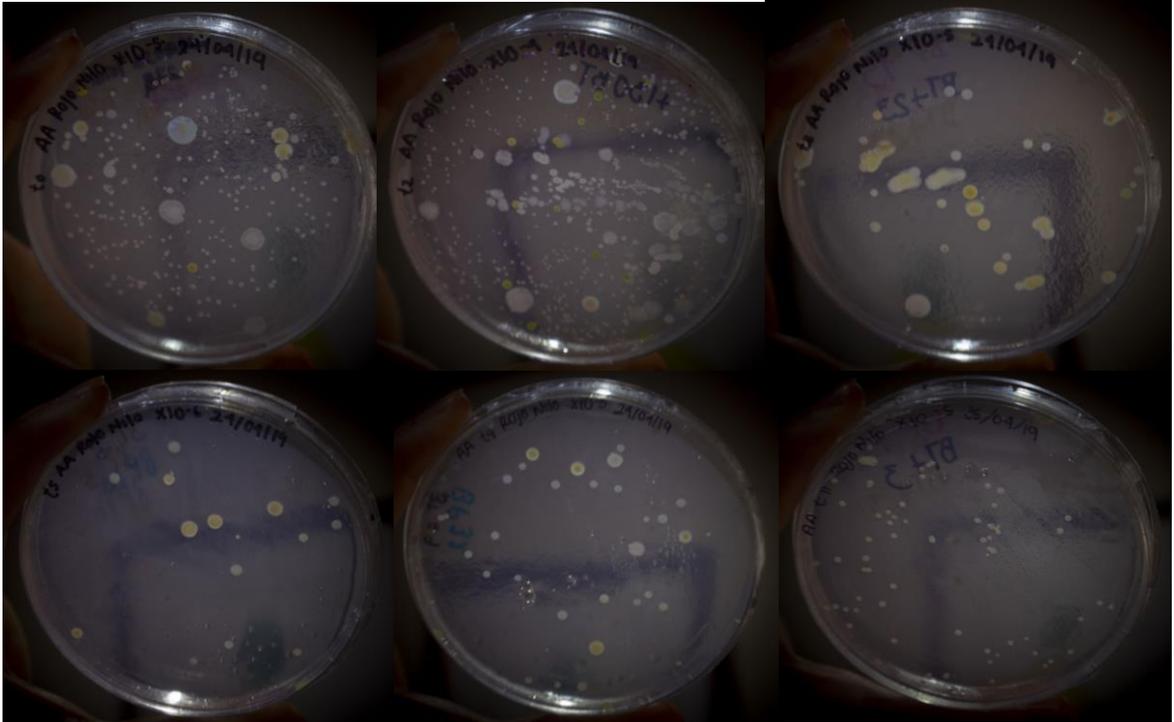


Fuente: elaboración propia

Como se mencionó anteriormente, la Gráfica 6 fue obtenida a partir del monitoreo del segundo ciclo de operación, en el cual se puede observar un crecimiento de la biomasa general hasta la quinta hora y a partir de la séptima hora se observa un decrecimiento de la biomasa no productora de PHAs, mientras que la productora se mantiene, demostrando una selección a través del tiempo (Foto 9), lo cual permite establecer un tiempo de hambruna para este sistema hasta la novena hora, momento en el cual se asume que la biomasa productora de PHAs ha utilizado la reserva energética que le proporciona el polihidroxiclcanoato para su mantenimiento, ocasionando el decrecimiento celular de este tipo de bacterias. Para este proyecto de grado, el tiempo de hambruna coincidió con el estudiado por Serafim 2004, quien también utilizó un cultivo mixto proveniente de un lodo activado,

alimentado con acetato determinando para dicho experimento un tiempo óptimo de hambruna de 10 horas¹⁶.

Foto 9. Crecimiento de biomasa durante ciclo 2, con sustrato ácido acético.

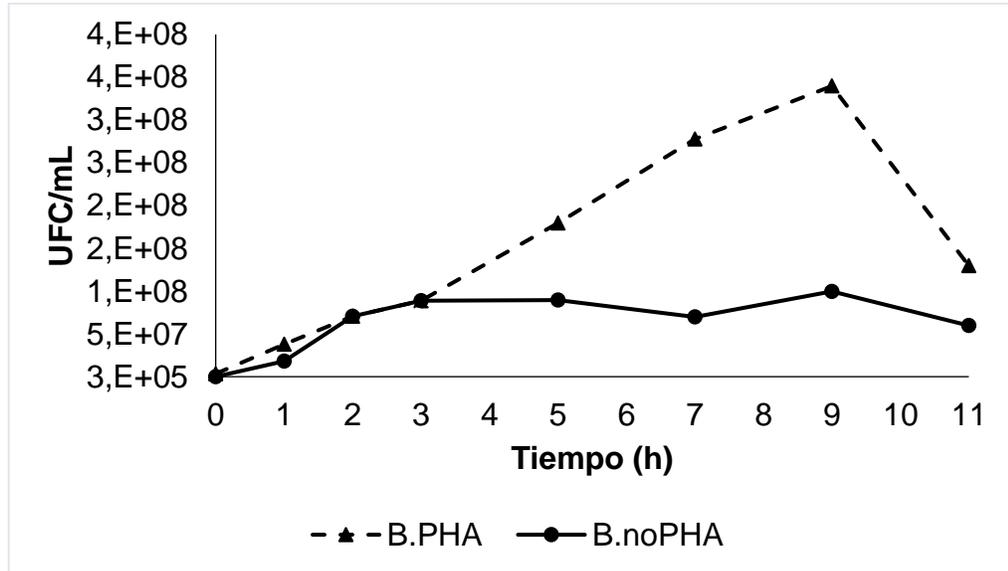


Fuente: elaboración propia.

En la Gráfica 7 se monitorea de igual forma el crecimiento de las bacterias productoras y biomasa no productora de PHAs, utilizando como sustrato la combinación de ácido acético- melaza, encontrando que a la novena hora se dio la mayor selección, puesto que la biomasa productora de PHAs se encuentra en su valor máximo, mientras que la no productora se mantuvo aproximadamente estable, por otro lado, a partir de esta hora la biomasa acumuladora del biopolímero empieza a decaer. De esta forma se estableció un tiempo óptimo de hambruna para este

sustrato de nueve horas, al encontrarse el máximo crecimiento de bacterias productoras de PHAs.

Gráfica 7. Crecimiento de biomasa en el tiempo, para C2, operando con sustrato ácido acético-melaza. Conteo de UFC en el anexo F



Fuente: elaboración propia.

El comportamiento que presentó la biomasa no productora de PHA, como se muestra en la Gráfica 7, se mantiene estable desde la tercera hora rondando el 26,93% de las bacterias no productoras del biopolímero en la microbiota total del sistema, creciendo en las placas gran cantidad de posibles levaduras de contorno definido y color amarillo, presencia de hongos, bacterias de color blanco y puntiformes productoras de PHAs, como se visualizan en la Foto 10.

Foto 10 Crecimiento de la biomasa durante Ciclo 2, con sustrato M+H.Ac.

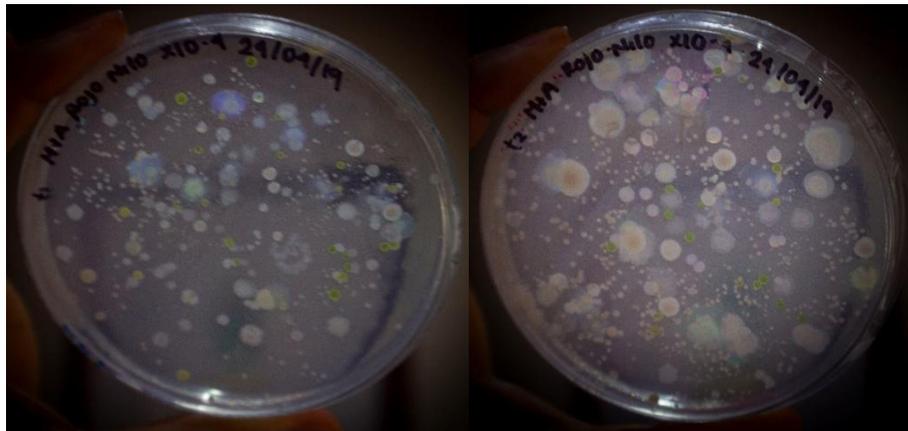
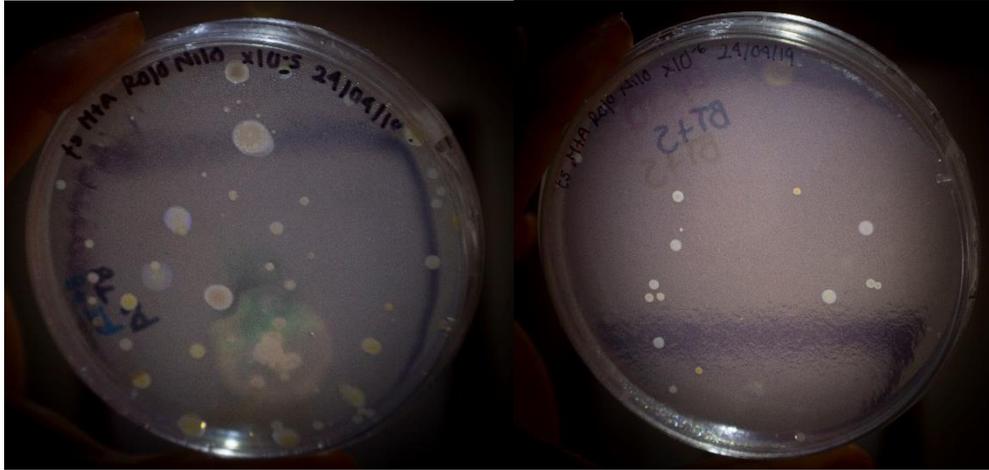


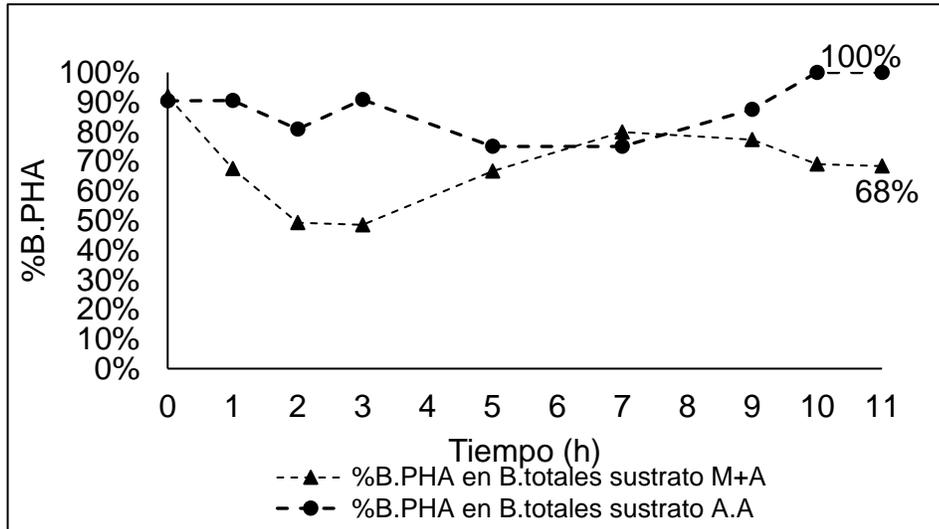
Foto10. continuación



Fuente: elaboración propia.

Mientras que la biomasa no productora de PHAs, con el sustrato ácido acético decrecieron a la séptima hora llegando a extinguirse en su totalidad, suponiendo así una demostración a una mejor adaptación al sustrato combinado respecto a esta microbiota, lo cual puede ser consecuencia de la alimentación que llevaban los microorganismos en general desde el sistema de lodos activados, la cual se realizaba empleando como sustrato melaza.

Gráfica 8. Porcentaje de B.PHAs con respecto a Bm.no PHAs, en C2. Valores en el anexo F



Fuente: elaboración propia.

A partir del conteo de las bacterias productoras de PHAs, se calculó el porcentaje de estas en la biomasa total (Gráfica 8), demostrándose un mayor porcentaje con

el sustrato ácido acético, sin embargo el crecimiento de la misma sólo aumenta en un 10%; por el contrario con el sustrato de mezcla, se desfavorece el crecimiento en un 32%, probablemente por el crecimiento de los hongos contenidos en el lodo activado inoculado, por lo que en las primeras horas de abundancia se favorecen las condiciones para su crecimiento, puesto que parte del sustrato ya era afín con el metabolismo desde el acondicionamiento en el sistema de lodos.

4.4.3 Medición de oxígeno disuelto. Esta medición se llevó a cabo monitoreando el sistema con la sonda HANNA, la cual se dejó inmersa en el licor mixto a lo largo de la operación del ciclo 7 estudiado, al mismo tiempo la sonda también midió las variables de pH y temperatura, discutidas al final de este apartado.

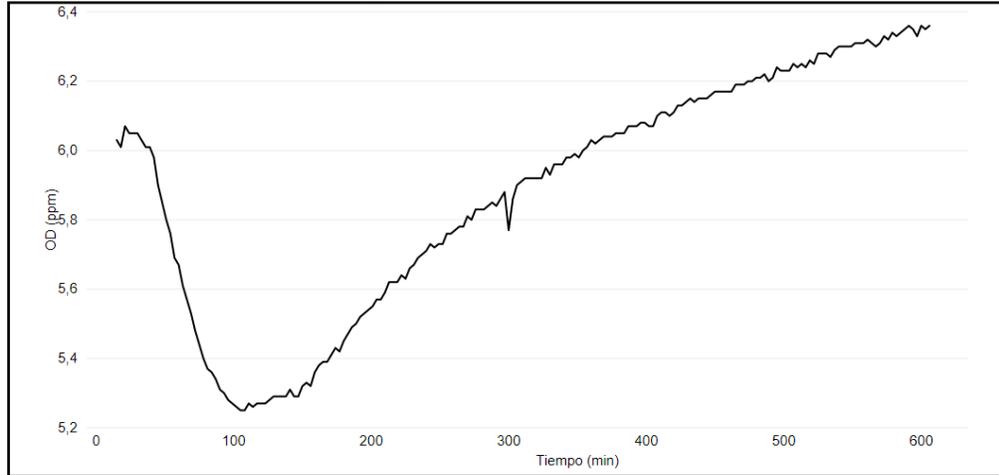
El oxígeno disuelto se utilizó como medida indirecta del consumo del sustrato, puesto que este representa el oxígeno requerido por la microbiota al oxidar la materia orgánica disponible en el reactor, como se describe en Polyhydroxyalkanoates production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source⁷⁴ en el cual emplearon esta medición como punto de referencia para una nueva alimentación del reactor, al aumentar abruptamente la concentración establecida indicando el consumo total de la fuente de carbono.

También Serafim y conjunto, hicieron uso de esta variable, que permitió establecer el tiempo de abundancia, es decir, la medición del oxígeno disuelto en la que se mantuvo la concentración más baja, durante el tiempo.

Teniendo en cuenta estas referencias, la Gráfica 9 permitió establecer el tiempo de abundancia para el sistema operado con ácido acético, en la cual se observa un pico decreciente en la concentración del oxígeno disuelto hasta el minuto 105 de la medición, lo cual indica gran cantidad de sustrato disponible para actividad microbiológica, por esta razón al sobrepasar este tiempo la concentración de este parámetro incrementa, señalando el máximo aprovechamiento del sustrato por parte de los microorganismos.

⁷⁴ MUNIR, Sajida and JAMIL, Nazia. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. En: JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY. Mar.vol. 58, no. 3, p. 247-254

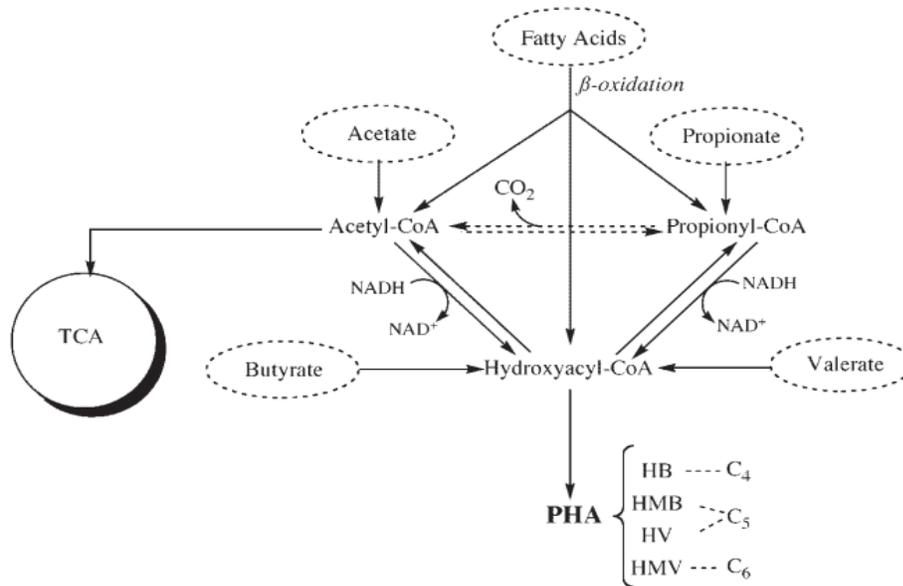
Gráfica 9. OD durante C7, con sustrato ácido acético.



Fuente: elaboración propia.

El consumo del sustrato utilizado en el metabolismo, durante la etapa de abundancia de las bacterias productoras de PHAs en cultivos mixtos, no se encuentra disponible aún, por ende, este se asocia al realizado por los cultivos puros, como se expone en la siguiente imagen

Figura 11. Representación esquemática de la producción de PHAs a partir de diferentes ácidos grasos.



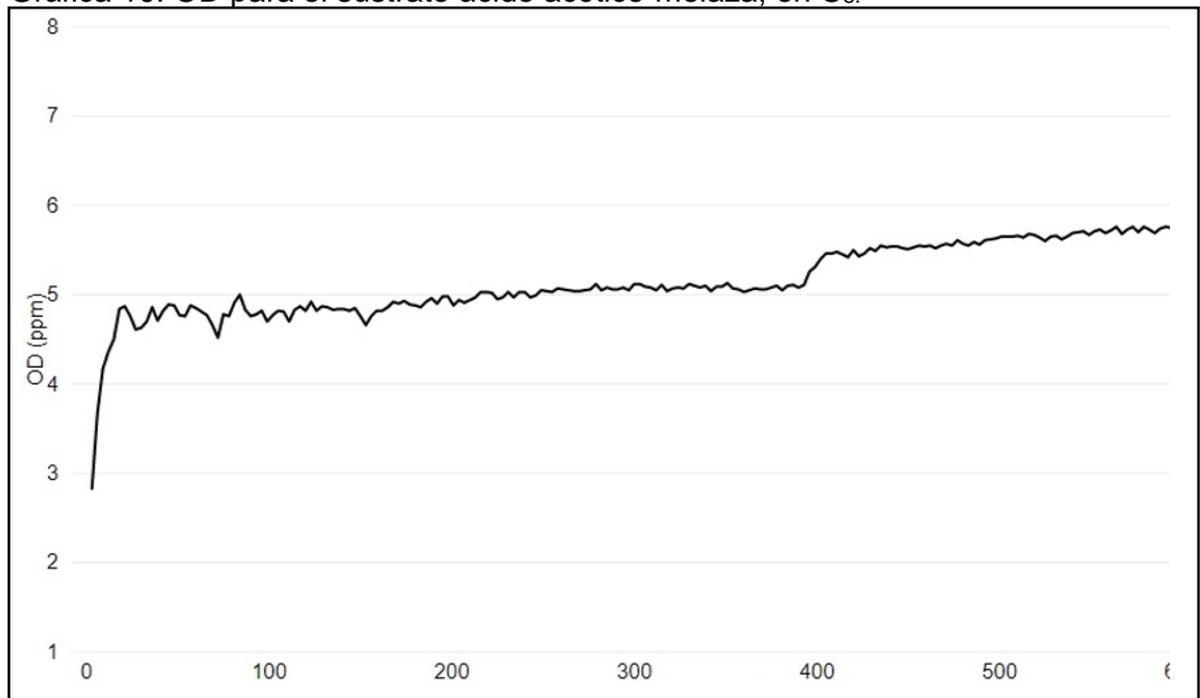
Fuente: Dias, J., et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. Macromolecular Bioscience. 2006. vol.6, no. 11. p. 885–906.

Con el cual se enuncia que, al utilizar acetato como fuente de carbono, el lodo activado sometido a alimentación dinámica aeróbica (ADF), el acetato se convierte

en acetil-CoA (dos carbonos), el cual es parcialmente conducido al ciclo del ácido tricarbónico (TCA) para el crecimiento, a la producción de NAD(P)H y parcialmente para la producción de PHAs.

Por otro lado, en la Gráfica 10, se muestra el comportamiento de oxígeno disuelto para el sustrato ácido acético-melaza, en la cual se evidencia un aumento leve en la concentración de esta medición hasta los 400 minutos, a partir del cual aumenta abruptamente indicando de igual forma el máximo consumo del sustrato.

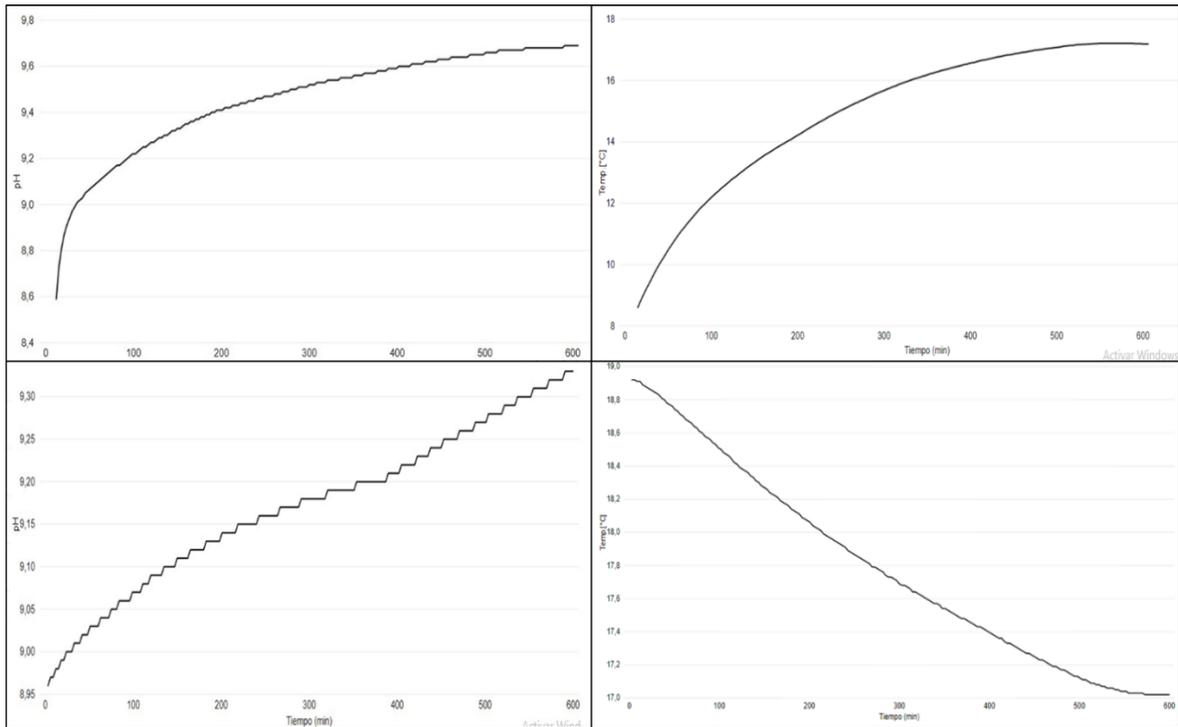
Gráfica 10. OD para el sustrato ácido acético-melaza, en C₈.



Fuente: elaboración propia.

Al mismo tiempo, se llevó a cabo la medición de pH y de la temperatura para ambos sistemas, esto con el propósito de conocer el comportamiento de la biomasa con los parámetros identificados en el primer objetivo, confirmando su correcto funcionamiento en los reactores airlift.

Gráfica 11. pH (izq), T (der), sustrato H.Ac C7 (sup), M+ H.Ac C8 (inf).



Fuente: elaboración propia.

En la Gráfica 11 se muestra los resultados obtenidos para el comportamiento de la operación ácido acético como sustrato en la parte superior (izquierda pH, derecha Temperatura °C) y en la parte inferior la operación con ácido acético – melaza.

A partir de los cuales se visualiza un incremento del pH a través del tiempo para ambos sustratos, mientras que respecto a la temperatura para el sustrato ácido acético aumenta la temperatura al ser una medición realizada desde las 6 de la mañana hasta las 4 de la tarde, tiempo en el cual la temperatura a lo largo del día incrementa, dicho comportamiento también se presentó por la actividad biológica, fenómeno que es usual en reacciones biológicas como el compostaje, mostrando así que la temperatura al interior del reactor aumenta en un 50%,

Por otro lado, el comportamiento es opuesto en la temperatura para el sistema ácido acético-melaza, esto como consecuencia a que la medición se llevó a cabo desde las 4 de la tarde hasta las 6 de la mañana, tiempo en el cual se presentan las temperaturas más bajas del día, sin embargo esta no fluctúa en gran cantidad (10,04%) con respecto al anterior sistema ya mencionado, lo cual se explica por la tendencia en el cambio de temperatura durante las noches en Bogotá y al igual que en el sistema ácido acético, por la actividad biológica en el reactor.

De esta manera, el comportamiento de la temperatura no presenta una gran influencia sobre el pH, puesto que según la teoría al aumentar la temperatura el estado entrópico aumenta, así el estado ionizado es más probable, por lo cual el pH fluctúa, más sin embargo tiene la tendencia a disminuir⁷⁵. Por el contrario, el comportamiento de la gráfica superior, de la operación con ácido acético, se observa un aumento en la temperatura al igual que en el pH, empezando por una subida desde 7.5 (valor al cual es ajustado el alimento con bicarbonato), al valor de 8.6 y finalmente hasta 9.68, indicando que este incremento se da por dos razones, primero por la disminución de ácido acético en el medio debido al consumo de este por la microbiota y segundo por el escape de CO₂.

Cuadro 10. Resumen de parámetros capítulo 2

TIEMPOS DE ABUNDANCIA Y HAMBRUNA					
ABUNDANCIA por medición de OD		H.Ac		H.Ac + Melaza	
	Ciclo	7		8	
	Tiempo (min)	105		400	
	Variación de pH	(8.6 – 9,2)		(8.96 – 9,20)	
	Variación T (C°)	(8,4 – 12)		(18,9 – 18,5)	
HAMBRUNA por conteo de UFC en el ciclo 2		Min	Max	Min	Max
	B.PHA	3,89x10 ⁷	9 x10 ⁷	3,7 x10 ⁶	3,4 x10 ⁸
	Hora	1	7	0	9
	Bm.noPHA	0	4,10 x10 ⁶	3,30 x10 ⁵	1 x10 ⁸
	Hora	11	1	0	9

Fuente: elaboración propia

En síntesis (Cuadro 10), desde el inicio de la inoculación, la biomasa poseía una previa selección, como consecuencia a la operación del sistema de lodos activados implementado, adicionalmente los tiempos de abundancia y hambruna para el ácido acético poseen una razón de 1/3, siendo esta óptima para este tipo de sistema, debido a que el tiempo encontrado de abundancia para este fue de 105 min y la hambruna de 498 min, puesto que al ser este el sustrato más estudiado, se ha concluido que es necesario una relación F/F (abundancia/hambruna) bajos, con el fin de obtener un cultivo eficiente en la producción de PHAs y mantener constante su capacidad de sintetizarlo, por lo tanto se recomienda una relación abundancia/hambruna inferior a 0,33; por otro lado para el sistema operado con la

⁷⁵ DOTRO, Pablo Nardi; RODRÍGUEZ, Mariano y RODRÍGUEZ, Debora. Estudio de la Evolución del pH en Función de la Temperatura. Club de Ciencias “Leonardo Da Vinci”, p. 18.

combinación ácido acético melaza se obtuvo un tiempo de abundancia de 400 min y de hambruna 204 min.

4.5 OPERACIÓN EN MODO SBR

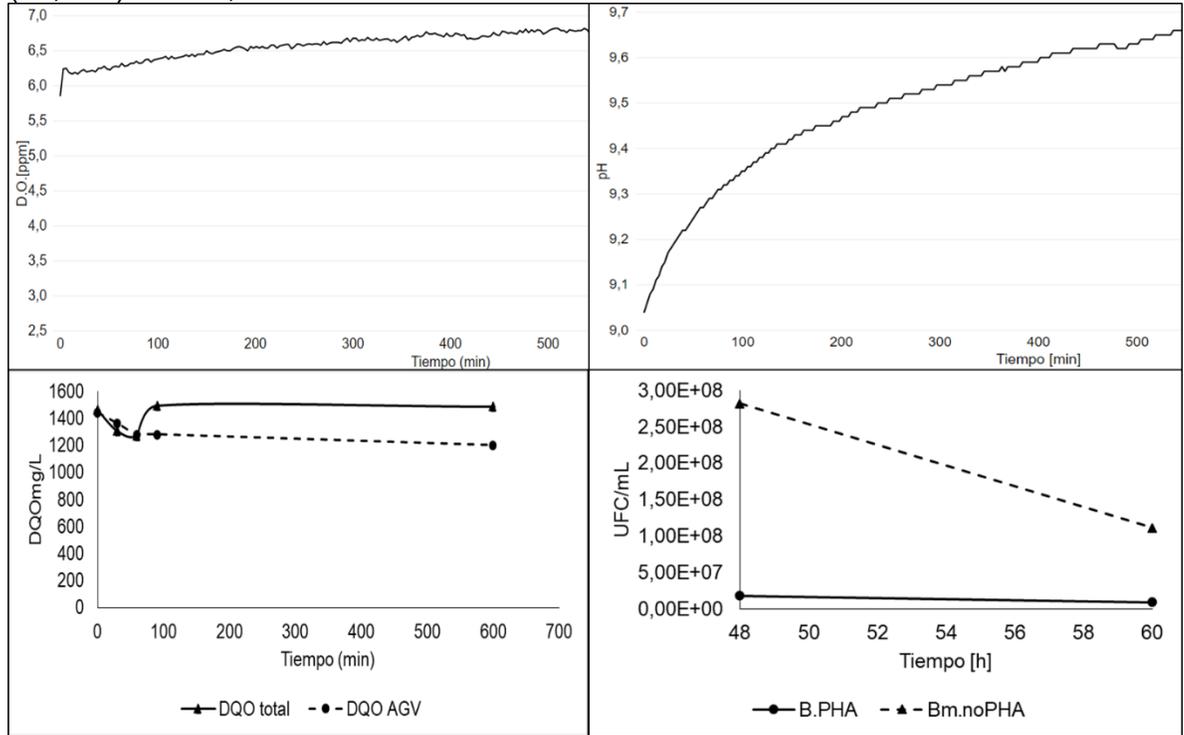
Como se menciona en apartado 3.6 se operaron 10 ciclos monitoreando los ciclos impares (aquellos que se daban en el día), a continuación, se presentan los resultados obtenidos con su correspondiente discusión.

4.5.1 Comportamiento con ácido acético. De acuerdo al objetivo tres, se monitoreó el oxígeno disuelto, el consumo de AGV, el recuento de bacterias productoras de PHAs y biomasa no productora, por último, el pH, bajo la concentración de $1600\text{mgDQO}_{\text{HAc}}/\text{L}$, en los ciclos 5 y 7. Encontrando los siguientes resultados.

Para el ciclo cinco, en el reactor número dos, se observa la disminución rápida del sustrato durante la primera hora, empleando la técnica de titulación, seguido de un consumo mínimo hasta el final de la aireación, comportamiento similar al de la DQO medida a través de la oxidación de materia orgánica soluble (gráfica inferior izquierda), con excepción al incremento en los 90 min, la cual se observa en la gráfica superior izquierda, que la biomasa no productora del biopolímero para este ciclo disminuye considerablemente, dando la posibilidad a la lisis celular de estos microorganismos y por ende el aumento en la concentración de la DQO. Por otra parte, la gráfica de oxígeno disuelto indica un consumo moderado creciente de los ácidos grasos, el cual se mantiene estable desde los 400 min, señalando la disminución de la actividad de los microorganismos, mientras que durante las dos

primeras horas de la aireación esta medición aumenta en mayor proporción, como resultado al consumo del sustrato.

Gráfica 12. OD (sup, izq), pH (sup, der), DQO (inf, izq) y comportamiento de biomasa (inf, der). En C₅, sustrato H.Ac.



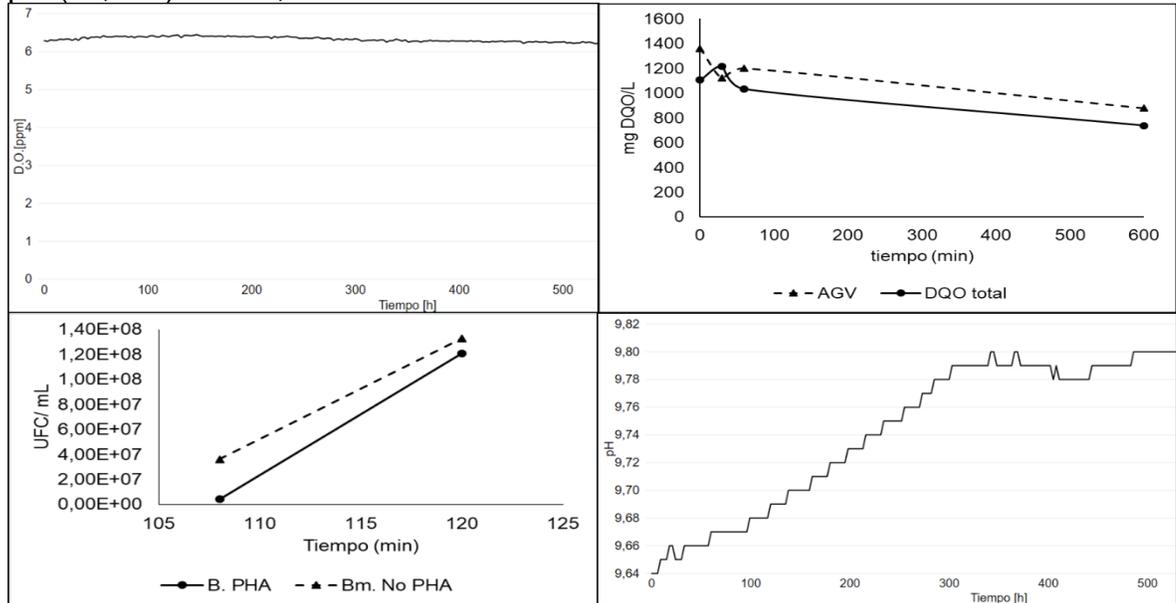
Fuente: elaboración propia.

En el caso del ciclo siete, se observa el consumo de la DQO AGV (gráfica superior, costado derecho) esta vez 35,29% fue degradada por los microorganismos al interior del biorreactor según el resultado obtenido a partir de la titulación mientras que el obtenido por estándar methods muestra un consumo del 33,26% de la DQO, con lo cual se puede establecer que la biomasa poseía un nivel más alto de adaptación al sustrato, aunque esta no se consumió en su totalidad, adicionalmente la diferencia entre las dos medidas puede considerarse como un error en la medición de ácidos grasos, como consecuencia a la falta de precisión en la titulación, sin embargo se visualiza que para este ciclo la biomasa tanto productora como no productora de PHAs aumentó, comportamiento que se atribuye al mayor consumo de la DQO de las mediciones que se realizaron para este reactor.

El comportamiento del pH, fue característico con respecto a la disminución tanto del OD como de la DQO_{AGV}, puesto que hasta el minuto 300 el pH aumentó de 9,64 a

9,79 como consecuencia a la remoción de AGV, y después de este tiempo siguió aumentando de forma menos pronunciada debido al escape de CO₂ del reactor.

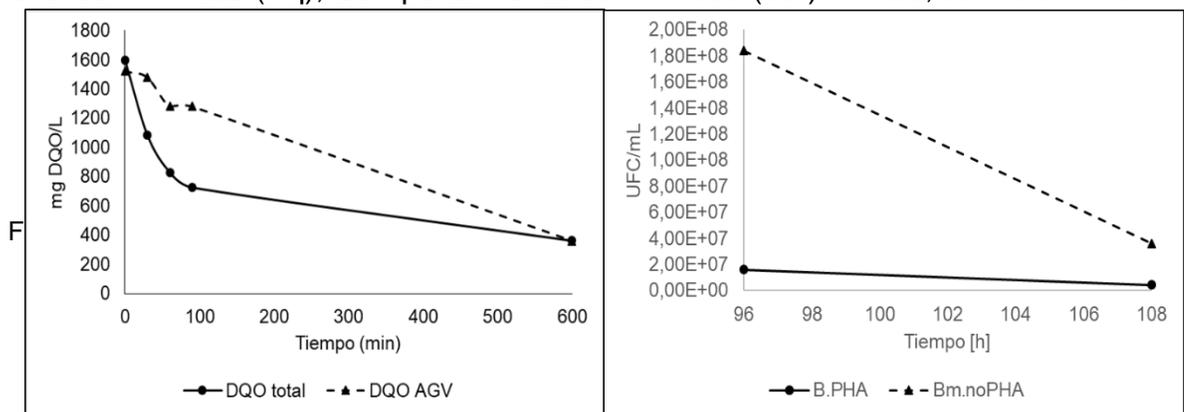
Gráfica 13. OD (sup, izq), DQO (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y pH (inf, der). En C₇, sustrato H.Ac.



Fuente: elaboración propia.

Para el ciclo 9, se tienen las medidas de consumo de sustrato por medio de la DQO medida en titulación y por standard methods (gráfica lado izquierdo), así como el resultado del crecimiento de la biomasa (gráfica lado derecho), para la gráfica mencionada en primer lugar, hay un consumo considerable de la DQO AGV con un valor aproximado de 77%, tanto la medida por titulación como la medida a través de la DQO por standard methods; comportamiento atribuido a la asimilación de los AGV por las bacterias productora de PHAs, al disminuir significativamente la biomasa no productora.

Gráfica 14. DQO (izq), Comportamiento de biomasa (der). En C₉, sustrato H.Ac.



En conclusión, la biomasa tanto productora como no productora de PHAs se acondiciona al sustrato con el transcurso de los ciclos, comportamiento que se observa gracias al monitoreo del oxígeno disuelto y la DQO; también fue posible determinar que dada una presión selectiva al interior de los biorreactores air-lift, el rompimiento de las células que conforman la biomasa no productora de PHAs durante los primeros 30 min del ciclo, alteran la medición de la DQO total (medida por la oxidación de la materia orgánica), provocando un aumento en esta, por lo tanto dichos residuos de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, etc. quedan disponibles en el sustrato y son consumidas por los microorganismos, de esta manera se determinó que a lo largo de la operación se cumplió con el objetivo de seleccionar la biomasa acumuladora de PHAs, puesto que como se esperaba, la misma tuvo un comportamiento aproximadamente constante (2×10^7 a 1×10^8 UFC/mL), creciendo al final de la operación, mientras que la biomasa no productora del polihidroxicanoatos fluctuó en su mayoría presentando un comportamiento en descenso indicando la muerte de esta biomasa, resaltando que a nivel cualitativo se observó una desaparición a partir del ciclo 5 de la población de hongos y levaduras.

4.5.2 Comportamiento con la mezcla ácido acético- melaza. Para brindar cumplimiento al objetivo cuatro, la operación de los sistemas alimentados por el sustrato combinado se realizó al mismo tiempo, que para el sistema ya expuesto, por esta razón se analizaron mediante oxígeno disuelto y pH los ciclos 1,3 y 9, por la técnica de colorimetría de DQO y titulación de AGVs los ciclos 3 y 9.

En el primer ciclo, se observó la formación de espuma en la parte superior del biorreactor, comportamiento frecuente en lodos jóvenes, el cual desapareció con el crecimiento de la biomasa y adaptación de la misma al sustrato complejo.

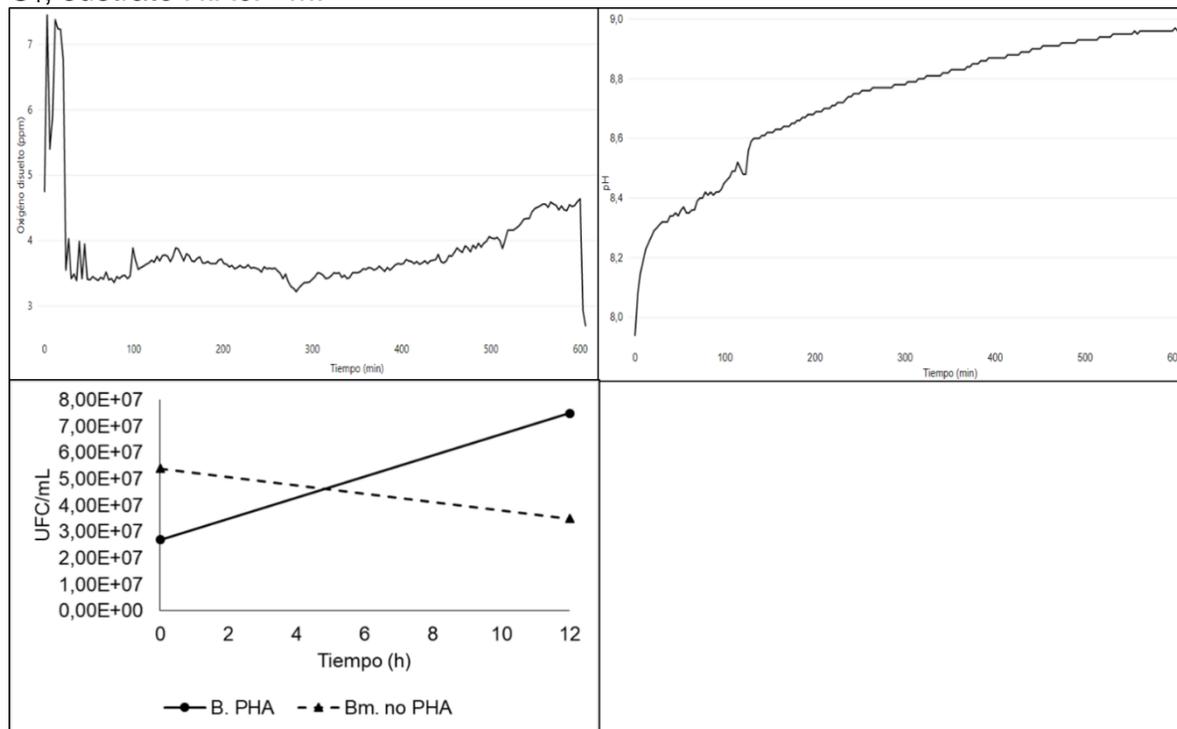
Analizando el comportamiento de la Gráfica 15 de oxígeno disuelto (costado superior izquierdo) durante los primeros 24 minutos la microbiota empezó a asimilar el sustrato, al ser el tiempo durante el cual se presenta el pico más alto. Estabilizándose después de este tiempo entre los valores de 3,55 a 3,65 ppm hasta el minuto 400 (establecido como tiempo de abundancia), a partir del cual el oxígeno disuelto aumentó indicando un consumo menor del sustrato, hasta llegar a 4,52 ppm finalizando el ciclo.

Por esta razón el aumento del pH (gráfica esquina superior derecha) de casi una unidad, presentando una pendiente mucho más inclinada al principio de la medición, señalando un mayor consumo del sustrato en estas horas, así al retirar la mayor cantidad de sustrato hasta alrededor de los 290 min, quedan libres mayor cantidad de iones del bicarbonato de sodio, que se empleó como sustancia buffer en el sustrato, motivo al cual se le atribuye el aumento progresivo del pH.

Adicionalmente, gracias al seguimiento de la biomasa (gráfica esquina inferior izquierda) se observa como el sistema ejerció una mayor presión selectiva durante

este ciclo, provocando un mayor estrés en las bacterias acumuladoras de PHAs, visualizado en el crecimiento y supervivencia de esta microbiota, mientras que la biomasa no productora del biopolímero no logró adaptarse con facilidad al nuevo sustrato, produciendo un decrecimiento en su población.

Gráfica 15. OD (sup, izq), pH (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y En C₁, sustrato H.Ac.+ M.



Fuente: elaboración propia.

Para el ciclo tres (Gráfica 16), al analizar el consumo de ácido acético en la mezcla ácido acético-melaza (gráfica esquina superior derecha), se puede concluir que toda la melaza fue consumida siendo así, el último valor de la DQO total igual a la DQO de ácidos grasos, demostrando que no hubo un gran consumo de ácido acético para este ciclo.

Fenómeno que puede ser explicado al comparar la energía libre de Gibbs, entre la sacarosa y glucosa, componentes de mayor composición según Fajardo⁷⁶, y el ácido acético, utilizando la siguiente ecuación, empleando los valores de ΔG_f° sintetizados por Ritman, descritos en el anexo C.

$$\Delta G_{Rx}^\circ = \sum n_{(productos)} * \Delta G_{f(productos)}^\circ - \sum n_{(reactivos)} * \Delta G_{f(reactivos)}^\circ$$

⁷⁶ FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. 2007.

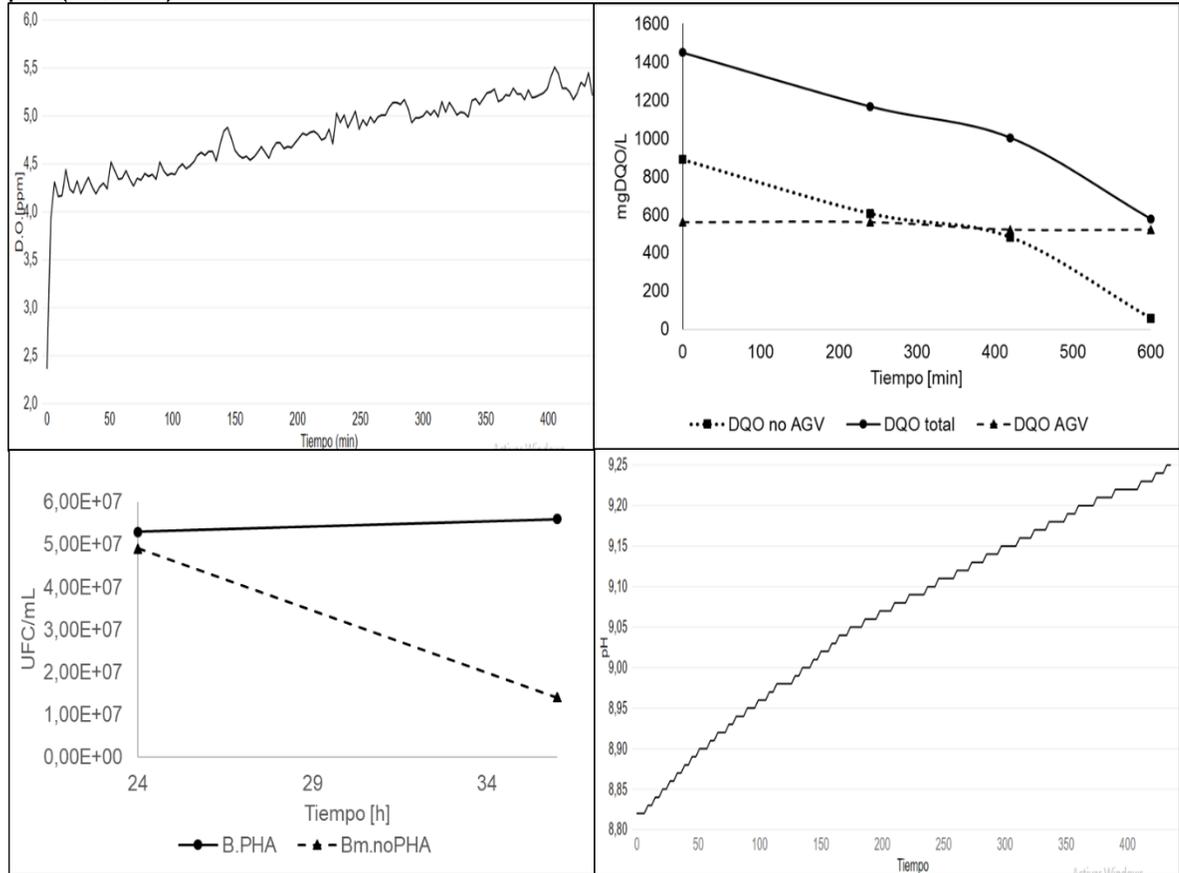
Al calcular cambio de la energía libre de Gibbs de la reacción, para cada componente anteriormente mencionados, se obtuvo que tanto la sacarosa y la glucosa, con valores de -5789,41 y -2872,002 KJ/mol respectivamente, eran compuestos más rápidos de utilizar al ser más espontáneos que el ácido acético, este último al poseer un valor de -1655,074 KJ/mol.

Comportamiento que se confirma con la medición de OD (esquina superior izquierda) en este ciclo, puesto que comienza en una concentración de 4ppm, aumentando hasta el punto de saturación de 5,5ppm al final del ciclo.

Desde la perspectiva del crecimiento de la biomasa (gráfica inferior costado izquierdo), productora del biopolímero se mantuvo mientras que la no productora continuó descendiendo, favoreciendo la selección de la biomasa productora de PHAs, la cual se asume que utiliza en mayor cantidad el sustrato melaza para la acumulación, pese a que de los dos sustratos alimentados este es el que se encontraba en menor concentración, esto puede ser debido a la alimentación con melaza, sustrato que llevaba desde el sistema de lodos activados, por tanto el decrecimiento en la biomasa no productora de PHAs se le confiere a la presión selectiva ejercida por la operación de abundancia y hambruna.

Por último, debido a el consumo de melaza, el ion bicarbonato queda libre aumentando la medición del pH.

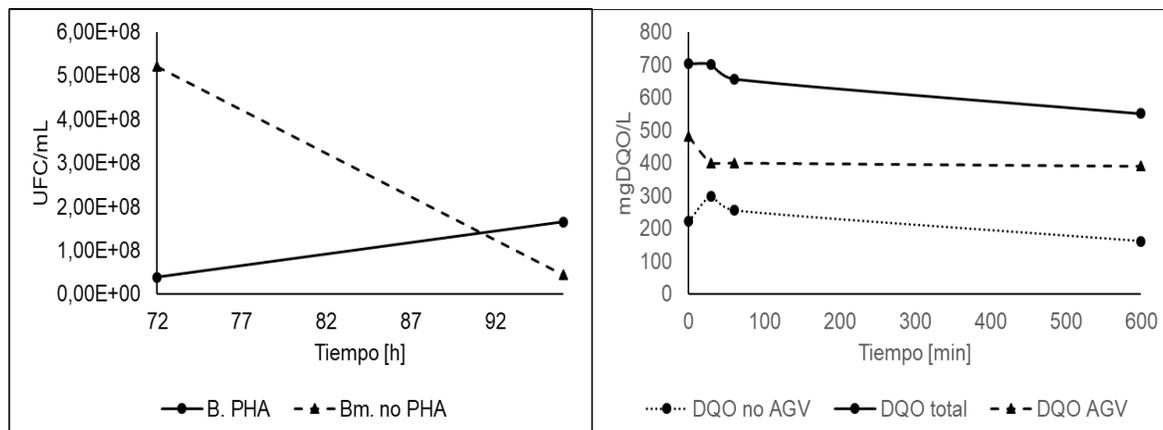
Gráfica 16. OD (sup, izq), DQO (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y pH (inf, der). En C3, sustrato M + H.Ac.



Fuente: elaboración propia.

Para el ciclo siete (Gráfica 17) se observa el consumo de ácido acético en mayor cantidad durante la primera hora, pues en el resto de la duración del ciclo, el consumo de ácido acético fue mínimo. Por otro lado, la melaza también fue consumida, en mayor proporción que el acético y el pico ascendente para este sustrato puede ser explicado por la forma de cálculo puesto que, se realiza por medio de una medición indirecta, partiendo que el valor de la DQO total supone ser la suma entre la DQO no AGV y la de DQO AGV que también se mide de forma directa (titulación), así al disminuir parte de la DQO AGV y mantenerse constante la total, se incurre en un error derivado de las magnitudes medidas directamente.

Gráfica 17. DQO (izq), Comportamiento de biomasa (der). En C7, sustrato M + H.Ac.



Fuente: elaboración propia.

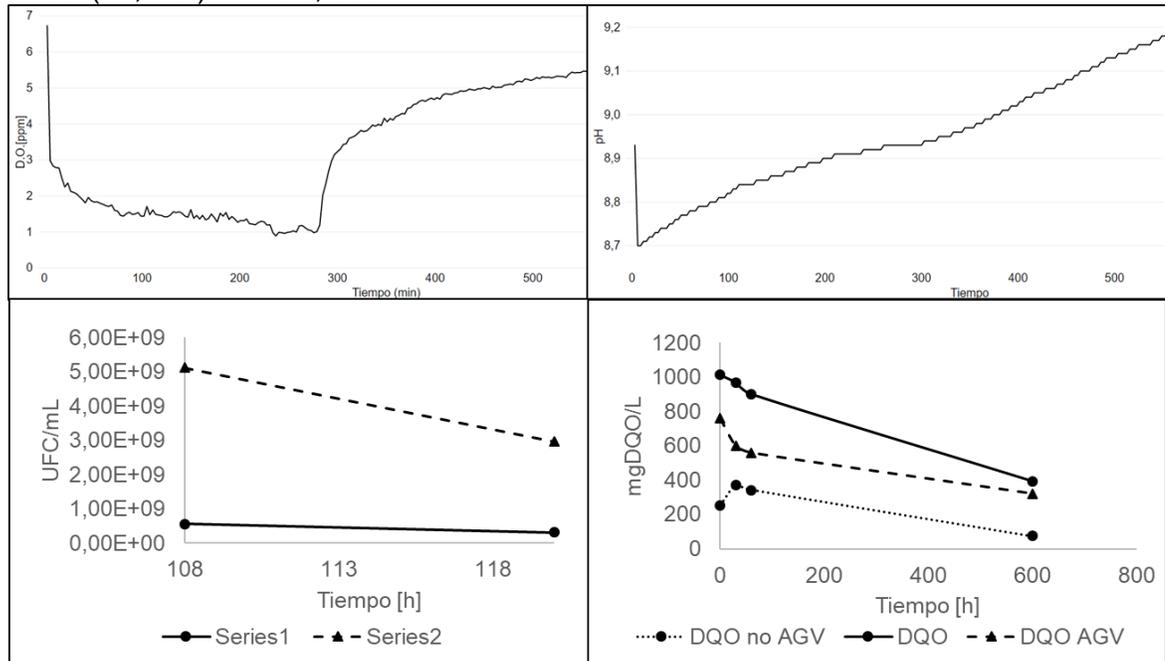
Finalmente, para el ciclo nueve el consumo de los componentes del sustrato aumenta, percibiéndose un mayor consumo para la melaza, sin embargo, en este ciclo comparado con los dos anteriores ya mencionados, es en el cual se presenta un mayor consumo del ácido acético; comprobando que los microorganismos se adaptan a este último a través del tiempo.

Al igual que en la gráfica anterior para el consumo de sustrato, se puede explicar el pico ascendente en la DQO no AGV, como consecuencia a un error por la medición indirecta de esta variable.

Por otro lado, este comportamiento se corrobora con el obtenido en la gráfica superior costado izquierdo de oxígeno disuelto, en la cual durante el consumo de ambos componentes se alcanzó la concentración más baja obtenida entre todas las gráficas de esta medición, como consecuencia al consumo de ambos componentes del sustrato hasta los 300min, tiempo en el cual se asume la remoción máxima, al aumentar la concentración nuevamente hasta 5,5ppm, es decir cesa la actividad en los microorganismos.

Mientras tanto en la gráfica de biomasa (esquina inferior izquierda) se observa como la microbiota, tanto productora como no productora aumenta su población, resultado el cual puede ser consecuencia del completo acondicionamiento de la microbiota no productora al sustrato, sobre todo de la población de hongos y levaduras, la cual continuó apareciendo en las cajas de Petri sembradas para el conteo por extensión en placa de las colonias, adicionalmente su crecimiento se beneficia en sustratos ricos en carbohidratos como la melaza, efecto por el cual se consume casi toda la DQO no AGV (melaza).

Gráfica 18. OD (sup, izq), pH (sup, der), Comportamiento de biomasa (inf, izq) y DQO (inf, der). En C9, sustrato M + H.Ac.



Fuente: elaboración propia.

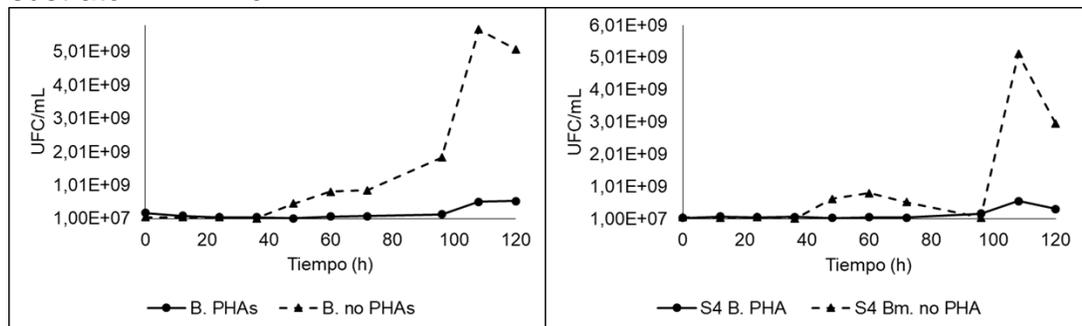
4.5.3 Comparación de la selección entre sustratos. En suma, durante la operación con ambos sustratos, la biomasa pasó por un proceso de adaptación a este, siendo más rápido este proceso en el sistema alimentado por el sustrato complejo, puesto que en el ciclo 3 se consumió cerca del 64,08% de la DQO total del sistema, esto debido a dos factores, el primero a que los microorganismos ya se encontraban adaptados al sustrato melaza, pues era con el cual se estaba alimentando el sistema de lodos activados del cual provenían y el segundo, debido a que la reacción de oxidación de la sacarosa y glucosa (componentes de mayor composición de la melaza) son más espontáneas con lo que la microbiota tiende a llevar por la ruta de glucólisis a la obtención de energía, mientras que para el ciclo 5 en el sustrato ácido acético sólo se había consumido el 16,66% de los ácidos grasos disponibles.

A pesar que el consumo de AGV, a lo largo de los ciclos fue aumentando en ambos sustratos, la concentración de estos en ningún caso llegó a cero, resultado igualmente encontrado por la investigación llevada a cabo por Jineth Arango, Ingeniera ambiental de la Antonio Nariño, al concluir en la ponencia, titulada Valorización de residuos orgánicos en un prototipo de Biorrefinería para la producción de biopolímeros (polihidroxialcanoatos-PHA), que a independiente de la concentración de AGV de entrada y de la duración del ciclo siempre queda un remanente de AGV, posiblemente afectado por la DQO no AGV del alimento proveniente de los reactores acidogénicos y por la influencia del pH del alimento. Hipótesis descartada con los resultados del presente proyecto de grado, pues bajo

el sustrato sin influencia de la DQQ no AGV, la concentración de ácido acético tampoco llegó a cero.

Frente a la biomasa para el sistema ácido acético, se realizó la medición al inicio y fin de cada uno de los ciclos impares como se mencionó en el apartado 3.6.3 (los conteos de UFC se encuentran en el anexo final correspondientes a los resultados obtenidos para cada biorreactor), en la Gráfica 19 se observa el crecimiento descrito por el sistema alimentado por ácido acético-melaza, la gráfica del lado izquierdo correspondiente al reactor S3 y la del lado derecho a su réplica S4, observando como la biomasa productora de PHA se mantuvo casi constante a lo largo de los ciclos mientras que la biomasa no productora empezó a aumentar su población desde las 40h (ciclo 4) de operación del biorreactor, lo cual se explica por la adaptación de esta biomasa, en específico los hongos y levaduras quienes poseen un metabolismo que se beneficia en sustratos ricos en glucosa y una vez acondicionados al medio pueden crecer de manera acelerada.

Gráfica 19. Comportamiento de la biomasa de S3 (der) y S4 (izq.), con sustrato M + H.Ac.

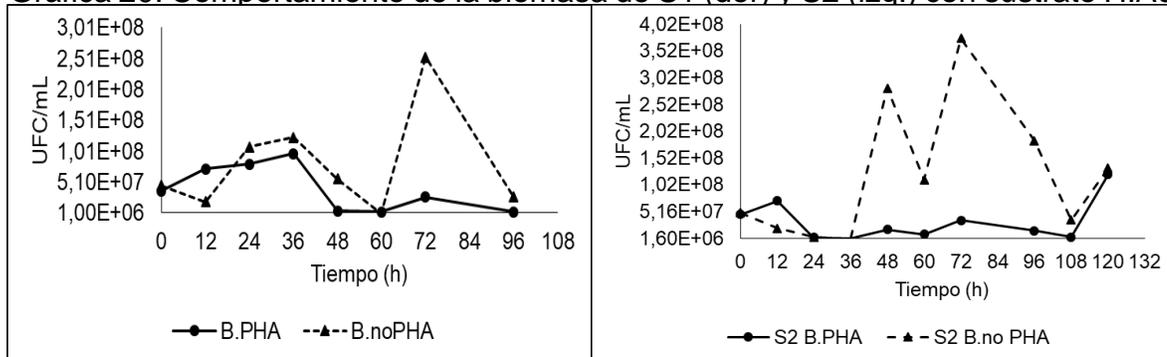


Fuente: elaboración propia.

Por el lado del sustrato ácido acético (Gráfica 20) ocurre una situación similar a la del sustrato complejo, a diferencia que en este caso los órdenes de magnitud del crecimiento son menores comparados con los obtenidos en el sustrato anteriormente analizado, a pesar de que también hay un crecimiento superior de la biomasa no productora de PHA esta lo hace en un orden menor al de ácido acético –melaza, por otro lado la biomasa no productora tiende a crecer y mantenerse a lo largo de los ciclos, sin embargo en este sistema se nota claramente como la selección podría realizarse hasta el ciclo 8 u/o 9 momento en el cual la biomasa no productora desciende su población rápidamente a un valor cercano al de la productora, esto como resultado a que en este caso el metabolismo de los hongos no se ve tan beneficiado en este tipo de sustratos, lo cual también se pudo observar en el monitoreo en sólido para el conteo de colonias, adicionalmente esta población también puede reducirse como consecuencia a la ausencia de melaza, ya que este

sustrato en si al ser un residuo posee una alta carga microbiana, sobretodo de hongos y levaduras.

Gráfica 20. Comportamiento de la biomasa de S1 (der) y S2 (izq.) con sustrato H.Ac.



Fuente: elaboración propia.

Así se concluye que la selección resulta mejor en este caso en el sistema alimentado por ácido acético, donde las bacterias acumuladoras del biopolímero, lo asimilan y crecen mejor, de igual manera la biomasa no productora pierde su facultad de crecimiento y disminuye a valores muy cercanos a los de la biomasa acumuladora del biopolímero, además al obstaculizar el metabolismo de hongos y levaduras, la población de estos microorganismos es mucho menor que para el sustrato ácido acético melaza, adicionalmente el tiempo de retención de lodos podría acortarse a 8 u/o 9 ciclos, sin embargo es de resaltar que en magnitud las bacterias crecen en mayor proporción en el sustrato complejo.

Dicho problema es común puesto que según Dias y compañía⁷⁷ el problema del sistema de lodos activados es que el crecimiento de las bacterias productoras del biopolímero no se da de manera abrupta sino por el contrario tiende a mantenerse estable a lo largo de la operación teniendo hasta el momento rendimientos bajos para la selección.

En síntesis (Cuadro 10), desde el inicio de la inoculación, la biomasa poseía una previa selección, como consecuencia a la operación del sistema de lodos activados implementado, adicionalmente los tiempos de abundancia y hambruna para el ácido acético poseen una razón de 1/3, siendo esta óptima para este tipo de sistema, debido a que el tiempo encontrado de abundancia para este fue de 105 min y la hambruna de 498 min, puesto que al ser este el sustrato más estudiado, se ha concluido que es necesario una relación F/F (abundancia/hambruna) bajos, con el fin de obtener un cultivo eficiente en la producción de PHAs y mantener constante su capacidad de sintetizarlo, por lo tanto se recomienda una relación

⁷⁷ DIAS, João M. L., et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. En: MACROMOLECULAR BIOSCIENCE. Nov 9, vol. 6, no. 11, p. 885-906.

abundancia/hambruna inferior a 0,33; por otro lado para el sistema operado con la combinación ácido acético melaza se obtuvo un tiempo de abundancia de 400 min y de hambruna 204 min.

Cuadro 11. Resumen de parámetros obtenidos en el capítulo 4

H.Ac						
Ciclos medidos	OD mínimo /Tiempo _(min)	Variación de pH	UFC		DQO removida (mgDQO/L)	
			B.PHA	Bm.noPHA		
5	6,17 / 12	9,04-9,69	1,8x10 ⁷	1 x10 ⁴	200	
7	6,22 / 600	9,64-9,82	3,5 x10 ⁷	3,75 x10 ⁸	400	
9	---	---	4 x10 ⁶	3,6 x10 ⁷	1200	
H.Ac + Melaza						
Ciclos medidos	OD mínimo /Tiempo _(min)	Variación de pH	UFC		DQO removida (mgDQO/L)	
			B.PHA	Bm.noPHA	AGV	No AGV
1	4,16 / 9	8,82-9,25	6 x10 ⁷	1,30 x10 ⁷	0	900
3	3,28 / 300	7,94-8,97	7,50 x10 ⁴	3,50 x10 ⁷	---	---
7	----	---	1,65 x10 ⁸	4,4 x10 ⁷	100	100
9	0,98 / 300	8,70-9,20	3,13 x10 ⁸	2,96 x10 ⁹	400	100

Fuente: elaboración propia

5. CONCLUSIONES

- Los parámetros de operación en el reactor air-lift presentaron un balance positivo para el crecimiento de la biomasa, debido a que el volumen elegido de 1450 mL facilitó el control de la operación, las 12h de duración de cada ciclo permitieron comprender dentro de este rango los tiempos de abundancia y hambruna hallados, en cuanto al tiempo de retención hidráulico es necesario aumentarlo para el sistema operado con el sustrato complejo (ácido acético-melaza) debido a que se requiere remover en mayor cantidad la DQO soluble y finalmente el crecimiento de la biomasa en este tipo de reactor se vio favorecido en todos los ciclos al mostrar una agitación eficiente en la fase de aireación.
- Al verificar el funcionamiento de los tiempos de abundancia y hambruna, ejerciendo la correspondiente presión selectiva sobre los microorganismos, se encontró para el sistema operado con ácido acético 105min de abundancia y 498min de hambruna, mientras que para el sistema operado con el sustrato combinado (ácido acético- melaza) 400min de abundancia y 204min de hambruna, sin embargo operando durante varios ciclos (modo SBR), es posible deducir que el tiempo de hambruna para ambos sistemas operados por los dos diferentes sustratos requieren de su prolongación, puesto que el comportamiento del crecimiento de la biomasa en un solo ciclo permitió visualizar la posibilidad de hacer llegar la biomasa no productora de PHAs a cero para el sistema ácido acético, comportamiento que podría replicarse en el sustrato combinado.
- Fue posible inferir a través del seguimiento inicial de la cantidad de biomasa productora y no productora para la inoculación de cada uno de los reactores selectores, que debido a las características de operación del sistema de lodos activados instalado (operado durante dos meses) y del proceso de tratamiento de aguas llevado a cabo en IBERPLAST, en ambos se llevaba un proceso de selección, puesto que se obtuvo un 58% de bacterias productoras de PHAs en promedio de la biomasa total, al inocular los reactores airlift.
- A partir del comportamiento de la biomasa estudiada a través del tiempo en modo SBR, se destaca la necesidad de aumentar el tiempo de retención de lodos para el sistema operado por ácido acético, mientras que para el sistema alimentado con el sustrato combinado es necesario disminuir el tiempo de retención de lodos a 4 ciclos, con el fin de no permitir el avance en el crecimiento de la biomasa no productora de PHAs y obtener mejores resultados en la selección.
- Operando bajo los parámetros establecidos y los tiempos de abundancia y hambruna identificados en este proyecto de grado, los resultados más favorables para el proceso de selección de biomasa rica en bacterias

productoras de PHA se obtuvieron para la operación con el sustrato ácido acético, donde al final de los 10 ciclos se consiguió que el 44% de la biomasa total fuese productora del biopolímero contra un 10% obtenido en la operación ácido acético-melaza. Atribuido a la espontaneidad de la sacarosa y glucosa contenida en la melaza, que aumenta el crecimiento de Bm.noPHA.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un sistema continuo para el montaje del sistema de lodos activados, con el fin de obtener un crecimiento de la biomasa en menor tiempo y evitar errores humanos con un sistema en batch operado de forma manual, como los que se expusieron en el presente trabajo.
- Se recomienda seguir la misma metodología de este proceso, empleando como sustrato la corriente residual de la etapa acidogénica, comparando dichos resultados con los obtenidos en el presente trabajo.
- Se recomienda realizar el seguimiento al consumo a los AGVs y los azúcares por la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- Se recomienda mejorar el sistema de vaciado de los actuales reactores air-lift, con el objetivo de evitar variaciones en las mediciones de biomasa tanto por el escape de la misma en la etapa de vaciado, así como para mejorar la calidad de la automatización del sistema.
- Se recomienda inocular el lodo directamente en los reactores selectores sin pasar por una fase de acondicionamiento en otro sistema de lodos activados, con el fin de adaptar directamente el lodo en los selectores al sustrato a alimentar en estos sistemas; siempre y cuando el lodo no contenga micro plástico o trazas de algún otro material que pueda alterar la medición de sólidos suspendidos volátiles.
- Se recomienda realizar un estudio donde se observe la influencia de otras variables como la razón carbono nitrógeno, el estrés por ausencia o exceso de fósforo u oxígeno disuelto y empleando como sustrato, ácidos grasos de cadena larga.
- Se recomienda replicar este estudio con otro tipo de lodo, proveniente de la etapa de lodo activado del tratamiento de agua residual de otro sector de la industria, teniendo en cuenta que debe contener una alta carga de DQO soluble.

BIBLIOGRAFÍA

ALBUQUERQUE, M. G. E.; TORRES, C. A. V. and REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. En: WATER RESEARCH. vol. 44, no. 11, p. 3419-3433

ALBUQUERQUE, MGE, et al. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. En: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. vol. 130, no. 4, p. 411-421

ALBUQUERQUE, MGE; TORRES, CAV and REIS, MAM. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. En: WATER RESEARCH. vol. 44, no. 11, p. 3419-3433.

CHEN, Zhiqiang, et al. A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure. En: International journal of biological macromolecules. Jan.vol. 72, p. 1329-1334.

CHERUBINI, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. Energy Conversion and Management, 7, 1412–1421

CHERUBINI, F., STROMMAN, A.H.y ULGIATI, S. Influence of allocation methods on the environmental performance of biorefinery products-A case study. 2011. Resources, Conservation and Recycling, 55, 1070–1077.

CHUA, Adeline S. M., et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. En: WATER RESEARCH. vol. 37, no. 15, p. 3602-3611

COATS, Erik R.; WATSON, Benjamin S. and BRINKMAN, Cynthia K. Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. En: WATER RESEARCH. Dec 1,.vol. 106, p. 26-40.

CUI, Y, ZHANG, Y, LU, P.y PENG, Z. Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. 2017. Scientific reports, 6, 30766.

DIAS, João M. L., et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. En: MACROMOLECULAR BIOSCIENCE. Nov 9, vol. 6, no. 11, p. 885-906

DIAS, João M. L., et al. Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. En: MACROMOLECULAR BIOSCIENCE. Nov 9, vol. 6, no. 11, p. 885-906.

DIONISI, D., CARUCCI, G., PAPINI, M. P., RICCARDI, C., MAJONE, M., y CARRASCO. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. Water research, 2005, vol. 39, no 10, p. 2076-2084.

DIONISI, Davide, et al. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. En: WATER RESEARCH. vol. 39, no. 10, p. 2076-2084

DOTRO, Pablo Nardi; RODRÍGUEZ, Mariano y RODRÍGUEZ, Debora. Estudio de la Evolución del pH en Función de la Temperatura. Club de Ciencias "Leonardo Da Vinci", p. 18.

FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. 2007.

GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda, et al. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Feb 1, vol. 29, no. 1, p. 77-115.

GONZÁLEZ, M, A. y CASTAÑEDA Z, Y. (2008). Biocombustibles, biotecnología y alimentos: Impactos sociales para México. Argumentos (México, DF), 21(57), 55-83.

GONZÁLEZ, María. Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias de género *Bacillus* de origen marino. Tesis de maestría La Paz.: Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. 2008. 17 p.

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

IEA (2008) Bioenergy task 42 on biorefineries, minutes of the third task meeting, international energy agency. Copenhagen, Denmark, 25 and 26 March 2008. www.biorefinery.net/IEABioenergy-Task42

IIZUMI, Taro; MIZUMOTO, Masahiro and NAKAMURA, Kanji. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. En: Applied and environmental microbiology. Oct 1, vol. 64, no. 10, p. 3656-3662.

JENDROSSEK, Dieter; HANDRICK, René. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annual Review of Microbiology, 2002, vol. 56, no 1, p. 403-432.

JOHNSTON, Brian, et al. The Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates from Waste Polystyrene Fragments Attained Using Oxidative Degradation. En: POLYMERS. Aug 29, vol. 10, no. 9, p. 957

JUNG, Y.M.y LEE, Y.H. Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*. J. Biosci. Bioeng. 2000, 90, 266–270.

KHANNA, S. y SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochem. 2005, 40, 607–619.

KOLLER, Martin, et al. producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. En: NEW BIOTECHNOLOGY. Jul 25, vol. 37, no. Pt. A, p. 24-38.

KRISHNA, Chundakkadu and VAN LOOSDRECHT, Mark C. M. Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. En: WATER RESEARCH. vol. 33, no. 10, p. 2374-2382

LEBRETON, L., et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. En: Scientific reports. -03-22. vol. 8, no. 1, p. 4666

LIU, Hsin-Ying, et al. Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater. En: WATER ENVIRONMENT RESEARCH. Apr. vol. 80, no. 4, p. 367-372

LU, J.; TAPPEI, R.C.y NOMURA, C.T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). Polym. Rev. 2009, 49, 226–248.

MUNIR, Sajida and JAMIL, Nazia. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. En: JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY. Mar. vol. 58, no. 3, p. 247-254

MYSHKINA, V., et al. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. En: APPLIED BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY. Sep. vol. 44, no. 5, p. 482-486.

OEDING, V. y SCHLEGEL, H.G., 1973. Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* HI6 and its significance in the regulation of polybeta-hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134, 239–248.

OHNSON, Katja, et al. Enrichment of a Mixed Bacterial Culture with a High Polyhydroxyalkanoate Storage Capacity. En: *BIOMACROMOLECULES*. Apr 13,.vol. 10, no. 4, p. 670-676

OLIVEIRA, Catarina S. S., et al. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. En: *NEW BIOTECHNOLOGY*. Jul 25,.vol. 37, no. Pt A, p. 69-79

PAUL, Etienne and LIU, Yu. *Biological sludge minimization and biomaterials/bioenergy recovery technologies*. John Wiley & Sons, 2012.

PINILLA y TORRES, L. Análisis de tendencias en biocombustibles para la definición de líneas estratégicas de investigación y desarrollo en Colombia (Master's thesis, Facultad de Estudios Ambientales y Rurales).

RATLEDGE, C. y KRISTIANSEN, B. *Basic Biotechnology*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001.

REDDY, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 87(2), 137-146.

REIS M, SERAFIM L, LEMOS P, RAMOS A, AGUIAR F y VAN LOOSDRECHT M: Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. En: *Bioprocess Biosyst Eng* 2003, 25:377-385.

REIS, M., et al. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. En: *Bioprocess and biosystems engineering*. Jul.vol. 25, no. 6, p. 377-385

RITTMAN, B. Mc Carty. 2001. En: *Biotecnología del medio ambiente: principios y aplicaciones*. Sexta Edición. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill. p. 626-647.

RÖSSLE,W. H., et al. Research on activated sludge settling behaviour based on short-term temperature variations. En: *University of pretoria. sudáfrica*.

SAHAI, A., et al. Original paper. En: *International Journal of Clinical Practice*. Dec 1,.vol. 61, no. 12, p. 2026.

SALEHIZADEH, H. and VAN LOOSDRECHT, MCM. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. En: *Biotechnology advances*. vol. 22, no. 3, p. 261-279

SÁNCHEZ MORENO, Silvia, et al. Identificación de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. En: Revista Colombiana de Biotecnología. Dec 1,.,vol. 14, no. 2, p. 89-100.

SERAFIM, Luísa S., et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. En: Biotechnology and bioengineering. Jul 20,.,vol. 87, no. 2, p. 145-160.

SERAFIM, Luisa, et al. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. En: Applied microbiology and biotechnology. Dec.vol. 81, no. 4, p. 615-628

SETIADI, Tjandra, et al. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Ralstonia eutropha* JMP 134 with volatile fatty acids from palm oil mill effluent as precursors. En: Water science and technology: a journal of the international association on water pollution research. vol. 72, no. 11, p. 1889-1895

SUHAG, M., & SHARMA, H. R. Biorefinery Concept: An Overview of Producing Energy, Fuels and Materials from Biomass Feedstocks

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. *Polymers*. 2014. 6(3), 706-754.

THOMSEN, M. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. 2005. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 598–606.

TYREE, Chris and MORRISON, Dan. Invisibles, El plástico dentro de nosotros. [1]. [Consultado el oct 12,2018]. Disponible en: http://orbmedia.org/stories/El_pl%C3%A1stico/multimedia

VALAPPIL, Sabeel, et al. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. En: *Antonie van Leeuwenhoek*. Jan. vol. 91, no. 1, p. 1-17

WANG, J.G. y BAKKEN, L.R., Screening of soil bacteria for polybeta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb. Ecol.*1998. 35, 94–101.

ZHIQIANG, Chen; HUANG, Qinxue; WEN, Huichao; ZHANG, Guo. Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process : from activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. En: *Revista de ciencias ambientales: Inglés*. vol. 52, no. 2, p. 76-84

ANEXOS

ANEXO A Análisis bibliométrico.

Formulación de la ecuación de búsqueda. Con la finalidad de encontrar los parámetros más adecuados, para la operación de los biorreactores empleados en el desarrollo de este trabajo por medio de una búsqueda bibliográfica, fue necesario empezar por formular una ecuación de búsqueda que proporcionó una base de datos con los artículos más relevantes, los cuales permitieron la extracción de la información necesaria.

Por esta razón, se inició haciendo una búsqueda “flash”, empleando como recurso electrónico web of science, se revisaron y descargaron algunos artículos que proveían los parámetros buscados; dichos textos fueron cargados a Mendeley Desktop, ya que este software los organiza y almacena, al mismo tiempo que recopila todas las palabras clave que se encuentran en estos. Así, aquellas más importantes detectadas por el programa se unieron en una ecuación de búsqueda, teniendo en cuenta los operadores booleanos (*, or, and, \$, etc.) para relacionar las palabras entre si y dar mayor énfasis a aquellas de mayor valor.

Obtención de la base de datos y análisis en BibExcel. Se eligió Web of Science como recurso electrónico, que permitió obtener la base de datos por medio de la ecuación de búsqueda previamente diseñada, que adicionalmente se descargó en formato de texto plano, ya que dicho formato es el requerido para que el software BibExcel pueda leer los datos y la información compilada de la búsqueda bibliográfica.

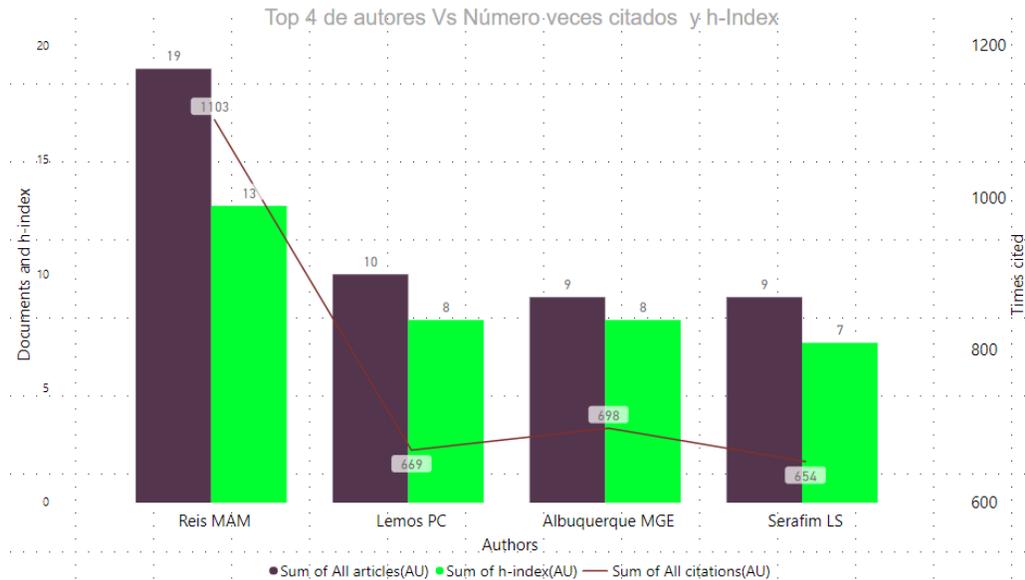
Al cargar la base de datos en BibExcel, este mostró la información organizada en diferentes campos propios de Web of Science, por ello gracias a este programa se logró extraer los datos más importantes como los autores, los países de estos, las organizaciones donde se elaboraron los documentos, el año de ellos, la cantidad de veces que han sido citados, etc; a partir de los cuales se pudo intuir la importancia de los artículos.

De esta manera, se redujo el nivel de la carga bibliográfica para cumplir con el objetivo y alcanzar una mejor selectividad en los documentos, que se debían examinar, siendo esto posible gracias a la presentación de los datos de forma ordenada en tablas mucho más fáciles de comprender y analizar.

Adicionalmente, se comparó la información que se realizó por medio de los análisis tanto gráficos como en tablas, que proporcionó Web of Science con las realizadas por medio de BibExcel, asegurando que los datos estuvieran completos y el programa realizara las clasificaciones de estos de forma adecuada.

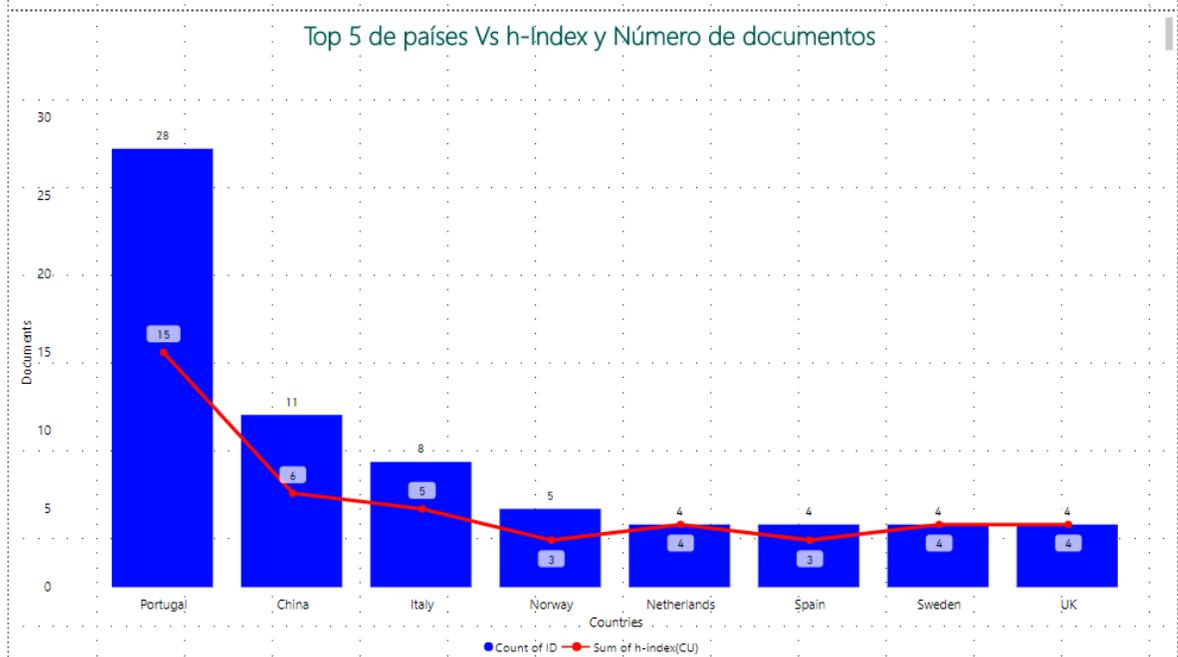
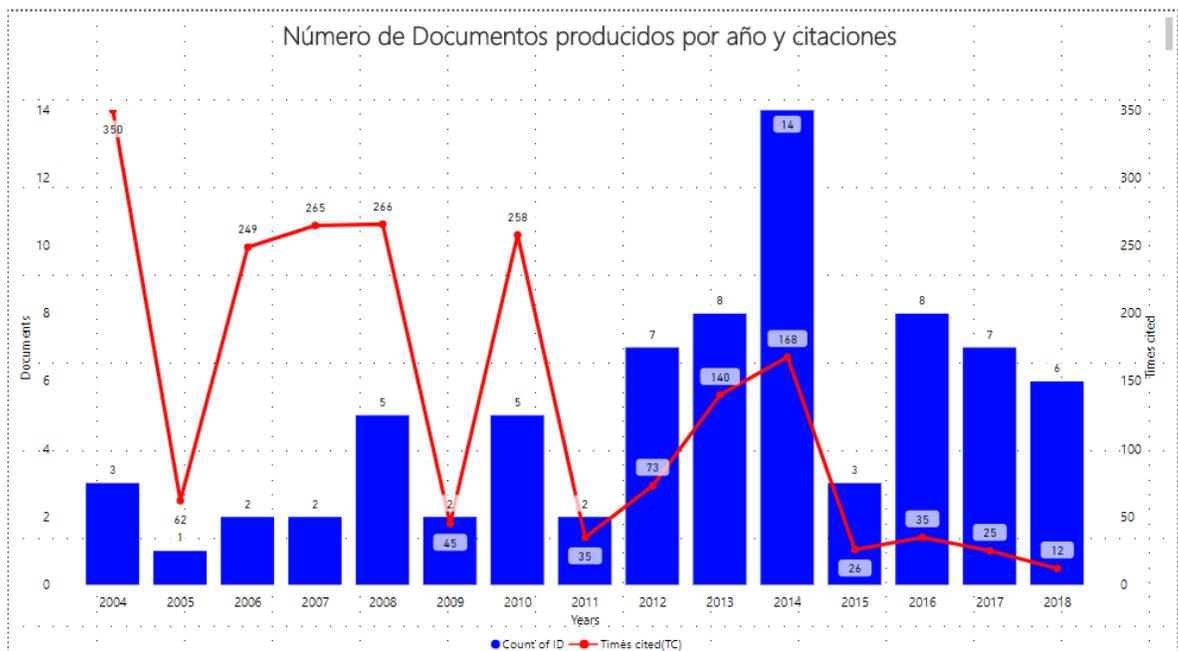
Al verificar la concordancia entre tablas, se copiaron y pegaron las de BibExcel en un libro de Microsoft Excel, con la finalidad de completar los campos que no se extrajeron en el programa y de este modo cargar la información definitiva a PowerBI.

Análisis gráfico en PowerBI. Con el fin de visualizar la información contenida en las tablas de manera gráfica y condensada, se empleó el software PowerBI, el cual es una herramienta versátil capaz de analizar una gran cantidad de datos de Excel de forma rápida. Por tal motivo se cargaron las tablas, buscando comparar los campos entre si y de esta manera seleccionar la bibliografía con mayor relevancia en el tema.



Distribución de documentos en Portugal por Número de citasiones

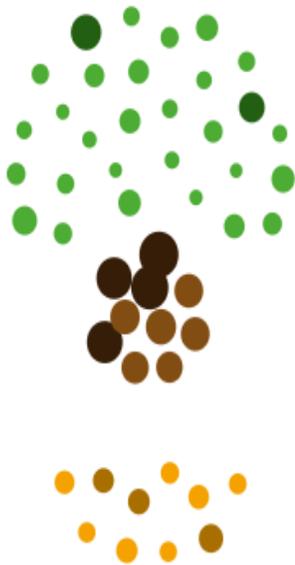




En consecuencia, dichas representaciones gráficas de la información contenida en la base de datos, se compararon más adelante con los resultados conseguidos a partir de otros programas (VOSviewer y Tree of Science), que de igual manera relacionan los campos contenidos en la base de datos, según como se elijó contrastar y visualizar, ahorrando tiempo en el análisis de la información bibliográfica.

Categorización de bibliografía en Tree of Science. Para categorizar los artículos encontrados en la sección 1.2 entre clásico, estructural o reciente, fue necesario

cargar dicha base de datos y crear un “nuevo árbol”, automáticamente la plataforma de Tree of Science creó un árbol de puntos donde los de mayor tamaño indican una mayor cantidad de citas, con lo cual se señala una mayor relevancia del artículo y por ende mayor prioridad para su análisis.



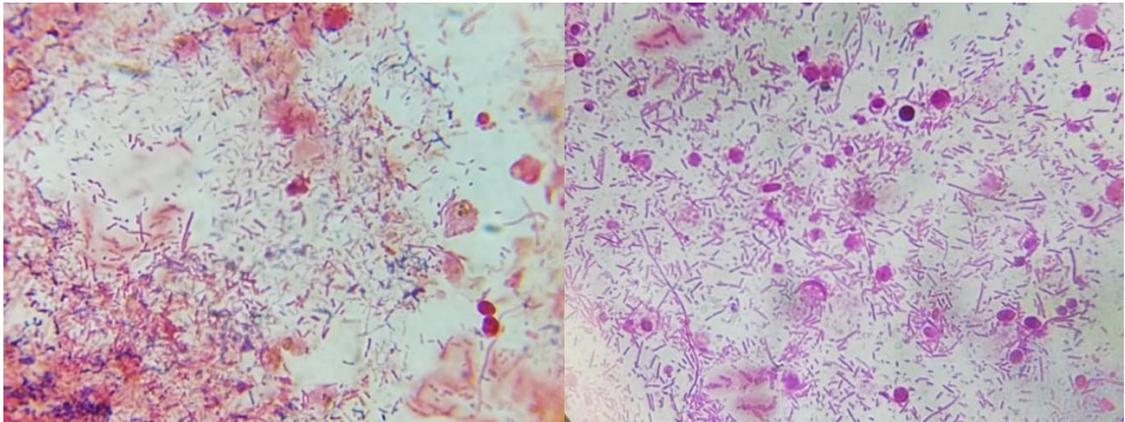
	Coats ER, 2016, WATER RES, V106, P26,	↪ ✕
	Zeng SW, 2018, AMB EXPRESS, V8, p97,	↪ ✕
	Lemos PC, 2006, J BIOTECHNOL, V122, P226,	↪ ✕
	Reis MAM, 2003, BIOPROC BIOSYST ENG, V25, P377,	↪ ✕
	Bengtsson S, 2008, BIORESOURCE TECHNOL, V99, P509,	↪ ✕
	Serafim LS, 2004, BIOTECHNOL BIOENG, V87, P145,	↪ ✕
	Dias JML, 2006, MACROMOL BIOSCI, V6, P885,	↪ ✕
	Serafim LS, 2008, APPL MICROBIOL BIOT, V81, P615,	↪ ✕
	Albuquerque MGE, 2010, WATER RES, V44, P3419,	↪ ✕

Representación de redes bibliométricas en VOSviewer. Las redes bibliométricas se construyen a partir de las contribuciones entre los autores, organizaciones, países, coautorías, cocitaciones y demás campos de la base de datos empleada. Estas relaciones, se representan por medio de líneas continuas de diferente volumen, según la cantidad de documentos compartidos entre dos objetos del mismo campo.

ANEXO B

Bulking en sistema de lodos activados. Para combatir el fenómeno del bulking, en primer lugar, se realizó una prueba microbiológica, tomando una muestra del licor mixto para ser observada bajo el microscopio mediante una tinción de Gram, que permitiera una mejor visualización de los microorganismos que conformaban el lodo de ambos sistemas, así dependiendo la ausencia o exceso de ciertas clases de estos en el mismo, debía procederse a evaluar la solución más adecuada.

Visualización del lodo bajo el microscopio por tinción de Gram, empleando lente 100x.



Fuente: Elaboración propia.

De esta forma, al realizar la prueba microbiológica, se observó gran cantidad de bacterias filamentosas, como se muestra en la Foto anterior; este tipo de microorganismos son una de las principales causas del bulking, las cuales crean puentes entre los flóculos, causando dos efectos negativos, el primero y más evidente, en el cual los puentes evitan que los flóculos se junten y se compacten y el segundo, la formación de estas estructuras atrapa el agua entre los flocs, así a medida que estos intentan compactarse, el agua atrapada que se mueve hacia arriba desplaza los flocs en dicha dirección, por estas razones el lodo presenta dificultades para decantarse. Esto a causa principalmente de factores de operación en los lodos.

ANEXO C.
Conteo de UFC en rojo Nilo del segundo ciclo

H.Ac				
ÀCIDO ACÈTICO				
TIEMPO	DILUCIÓN	B TOTAL	B. PHA	B. NO PHA
0	1,00E+03	4,53E+07	3,57E+07	9,60E+06
0	1,00E+03	5,30E+07	4,79E+07	5,09E+06
0	1,00E+04	6,67E+06	5320000	1,35E+06
0	1,00E+04	5,41E+06	4,30E+06	1,11E+06
1	1,00E+04	4,30E+07	3,89E+07	4,10E+06
1	1,00E+04	4,68E+07	4,00E+07	6,80E+06
1	1,00E+05	1,42E+08	5,60E+07	8,60E+07
1	1,00E+05	6,20E+07	3,00E+07	3,20E+07
2	1,00E+04	6,80E+07	5,50E+07	1,30E+07
2	1,00E+04	--	--	--
2	1,00E+05	1,69E+08	1,46E+08	2,30E+07
2	1,00E+05	--	2,40E+07	--
3	1,00E+04	4,79E+07	4,35E+07	4,40E+06
3	1,00E+04	2,16E+07	1,85E+07	3,10E+06
3	1,00E+05	3,20E+07	1,40E+07	1,80E+07
3	1,00E+05	3,80E+07	1,50E+07	2,30E+07
5	1,00E+05	7,40E+08	5,80E+08	1,60E+08
5	1,00E+05	--	--	--
5	1,00E+06	1,20E+08	9,00E+07	3,00E+07
5	1,00E+06	1,50E+08	1,00E+08	5,00E+07
7	1,00E+05	3,40E+07	2,80E+07	6,00E+06
7	1,00E+05	1,59E+08	1,43E+08	--
7	1,00E+06	1,20E+08	9,00E+07	3,00E+07
7	1,00E+06	3,00E+07	2,00E+07	1,00E+07
9	1,00E+05	3,90E+07	3,20E+07	7,00E+06
9	1,00E+05	3,30E+07	2,30E+07	1,00E+07
9	1,00E+06	1,30E+09	1,20E+09	1,00E+08
9	1,00E+06	9,00E+07	7,00E+07	2,00E+07
11	1,00E+05	7,40E+07	7,10E+07	3,00E+06
11	1,00E+05	2,40E+07	2,10E+07	3,00E+06
11	1,00E+06	9,10E+07	9,10E+07	0,00E+07
11	1,00E+06	8,00E+07	8,00E+07	0,00E+00

M+H.Ac				
ÁCIDO ACÉTICO/ MELAZA				
TIEMPO	DILUCIÓN	B TOTAL	B. PHA	B. NO PHA
0	1,E+02	3,89E+07	3,57E+07	3,20E+06
0	1,E+02	6,36E+07	2,96E+07	3,40E+07
0	1,E+03	-----	----	---
0	1,E+03	4,08E+06	3,75E+06	3,30E+05
1	1,E+03			
1	1,E+03			
1	1,E+04	5,64E+07	3,81E+07	1,83E+07
1	1,E+04	5,59E+07	4,95E+07	6,40E+06
2	1,E+04	6,72E+07	5,87E+07	8,50E+06
2	1,E+04	5,43E+07	4,87E+07	5,60E+06
2	1,E+05	5,37E+08	4,93E+08	4,40E+07
2	1,E+05	1,42E+08	7,10E+07	7,10E+07
3	1,E+04	----	----	----
3	1,E+04	-----	-----	-----
3	1,E+05	1,73E+08	8,40E+07	8,90E+07
3	1,E+05	1,78E+08	8,90E+07	8,90E+07
5	1,E+05	2,14E+08	1,49E+08	6,50E+07
5	1,E+05	2,70E+08	1,80E+08	9,00E+07
5	1,E+06	2,70E+08	1,80E+08	9,00E+07
5	1,E+06	2,10E+08	1,60E+08	5,00E+07
7	1,E+05	3,48E+08	2,78E+08	7,00E+07
7	1,E+05	1,83E+08	1,06E+08	7,70E+07
7	1,E+06	1,50E+08	6,00E+07	9,00E+07
7	1,E+06	3,48E+08	2,78E+08	7,00E+07
9	1,E+05	6,80E+07	3,60E+07	3,20E+07
9	1,E+05	4,40E+08	3,40E+08	1,00E+08
9	1,E+06	4,40E+08	3,40E+08	1,00E+08
9	1,E+06	8,00E+07	3,00E+07	5,00E+07
11	1,E+05	1,90E+08	1,30E+08	6,00E+07
11	1,E+05	1,09E+08	8,90E+07	2,00E+07
11	1,E+06	1,90E+08	1,30E+08	6,00E+07
11	1,E+06	2,10E+08	1,10E+08	1,00E+08

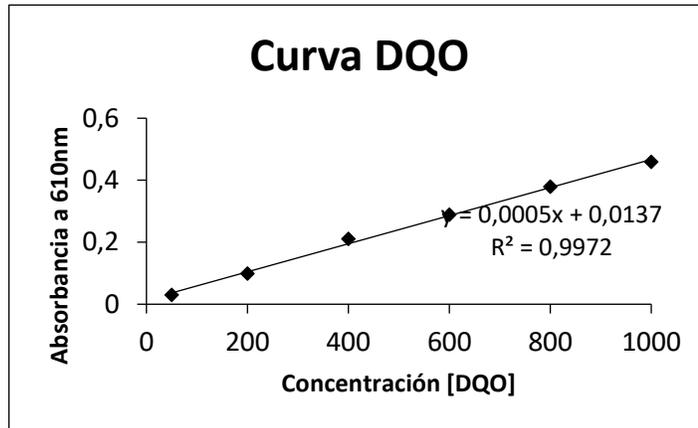
H.Ac			
TIEMPO	B. PHA	B- NO PHA	% B. PHA
0	4,79E+07	9,60E+06	0,903966597
1	3,89E+07	4,10E+06	0,904651163
2	5,50E+07	1,30E+07	0,808823529
3	4,35E+07	4,40E+06	0,908141962
5	9,00E+07	3,00E+07	0,75
7	9,00E+07	3,00E+07	0,75
9	7,00E+07	2,00E+07	0,875
11	8,00E+07	0,00E+00	1

M+H.Ac			
t	Cant B.PHA	Cant B.noPHA	%B.PHA
0	3,75E+06	3,30E+05	0,9191176
1	3,81E+07	1,83E+07	6,76E-01
2	7,10E+07	7,10E+07	5,00E-01
3	8,90E+07	8,90E+07	5,00E-01
5	1,80E+08	9,00E+07	6,67E-01
7	2,78E+08	7,00E+07	7,99E-01
9	3,40E+08	1,00E+08	7,73E-01
11	1,30E+08	6,00E+07	6,84E-01

ANEXO C

Curva de calibración de DQO entre 50 a 1000 mg/L.

Gráfica de calibración



ANEXO E

Cálculos de energía libre de Gibbs de reacción de oxidación Recopilación de energía de Gibbs de formación

Class	Substance	Form	kJ/mol	Reference
Hydrogen Ion	H ⁺	aq	0	Thauer et al. (1977)
Hydrogen Ion	H ⁺ (10 ⁻⁷)	aq	-39.87	Thauer et al. (1977)
Hydrogen	H ₂	g	0	Thauer et al. (1977)
Water	H ₂ O	l	-237.178	Thauer et al. (1977)
Hydrogen Peroxide	H ₂ O ₂	aq	-134.097	Thauer et al. (1977)
Hydroxide	OH ⁻	aq	-157.293	Thauer et al. (1977)
Oxygen	O ₂	g	0	Thauer et al. (1977)
Carbon Monoxide	CO	g	-137.15	Thauer et al. (1977)
Carbon Dioxide	CO ₂	g	-394.359	Thauer et al. (1977)
Carbon Dioxide	CO ₂	aq	-386.02	Thauer et al. (1977)
Carbon	C	c	0	Thauer et al. (1977)
Carbonic Acid	H ₂ CO ₃	aq	-623.16	Thauer et al. (1977)
Bicarbonate	HCO ₃ ⁻	aq	-586.85	Thauer et al. (1977)
Carbonate	CO ₃ ²⁻	aq	-527.9	Thauer et al. (1977)
Chlorate	ClO ₃ ⁻	aq	-3.35	Thauer et al. (1977)
Chloride	Cl ⁻	aq	-133.26	Weast and Astle (1980)
Chlorite	ClO ₂ ⁻	aq	17.2	Thauer et al. (1977)
Ammonia	NH ₃	aq	-26.57	Thauer et al. (1977)
Ammonium	NH ₄ ⁺	aq	-79.37	Thauer et al. (1977)
Ferrous Iron	Fe ²⁺	aq	-78.87	Thauer et al. (1977)
Ferric Iron	Fe ³⁺	aq	-4.6	Thauer et al. (1977)
Nitrite	NO ₂ ⁻	aq	-37.2	Thauer et al. (1977)
Nitrate	NO ₃ ⁻	aq	-111.34	Thauer et al. (1977)
Sulfur	S	c	0	Thauer et al. (1977)
Hydrogen Sulfide	H ₂ S	g	-33.56	Thauer et al. (1977)
Hydrogen Sulfide	H ₂ S	aq	-27.87	Thauer et al. (1977)
Bisulfide	HS ⁻	aq	12.05	Thauer et al. (1977)
Sulfite	SO ₃ ²⁻	aq	-486.6	Thauer et al. (1977)
Sulfate	SO ₄ ²⁻	aq	-744.63	Thauer et al. (1977)
Thiosulfite	S ₂ O ₃ ²⁻	aq	-513.4	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Fumarate(2 ⁻)	aq	-604.21	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Fumaric acid	aq	-647.14	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	α- Ketoglutarate	aq	-797.55	Thauer et al. (1977)

Class	Substance	Form	kJ/mol	Reference
Acid-dicarboxylic	L- Malate(2 ⁻)	aq	-845.08	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Oxalacetate(2 ⁻)	aq	-797.18	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Oxalate(1 ⁻)	aq	-698.44	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Oxalate(2 ⁻)	aq	-674.04	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Succinate (2 ⁻)	aq	-690.23	Thauer et al. (1977)
Acid-dicarboxylic	Succinic acid	aq	-746.38	Thauer et al. (1977)
Acid-monocarboxylate	Glycollate	aq	-530.95	Thauer et al. (1977)
Acid-monocarboxylate	Glyoxylate	aq	-468.6	Thauer et al. (1977)
Acid-monocarboxylate	D- Gluconate	aq	[-1128.3]	Thauer et al. (1977)
Acid-monocarboxylic	Acetate	aq	-369.41	Thauer et al. (1977)
Acid-monocarboxylic	Acetic acid	lq	-392	Weast and Astle (1980)

Class	Substance	Form	kJ/mol	Reference
Amino acid	L- Aspartic acid	aq	-721.3	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Cysteine	aq	-339.78	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Cystine	aq	-666.93	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Glutamate ⁻	aq	-699.6	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Glutamic acid	aq	-723.8	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Glutamine	aq	-529.7	Thauer et al. (1977)
Amino acid	Glycine	aq	-370.788	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Leucine	aq	-343.1	Thauer et al. (1977)
Amino acid	iso Leucine	aq	-343.9	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Methionine	aq	-502.92	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Phenylalanine	aq	-207.1	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Serine	aq	-510.87	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Threonine	aq	[-514.63]	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Tryptophane	aq	-112.6	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Tyrosine	aq	-370.7	Thauer et al. (1977)
Amino acid	L- Valine	aq	-356.9	Thauer et al. (1977)
Aromatic	Benzene	g	129.7	Perry et al.(1984)
Aromatic	Benzene	aq	[133.9]	*
Aromatic	Biphenyl	aq	275.2	Homes et al. (1993)
Aromatic	Ethylbenzene	g	130.6	Perry et al.(1984)
Aromatic	Ethylbenzene	aq	[136]	*
Aromatic	m-Xylene	g	118.8	Perry et al.(1984)
Aromatic	m-Xylene	aq	[122.9]	*
Aromatic	o-Xylene	g	122.1	Perry et al.(1984)
Aromatic	o-Xylene	aq	[124.6]	*
Aromatic	p-Xylene	g	121.1	Perry et al.(1984)
Aromatic	p-Xylene	aq	[125.2]	*
Aromatic	Toluene	g	122.3	Perry et al.(1984)
Aromatic	Toluene	aq	[127]	*
Carbohydrate	Dihydroxyacetone	aq	[-445.18]	Thauer et al. (1977)
Carbohydrate	D- Erythrose	aq	[-598.3]	Thauer et al. (1977)
Carbohydrate	D- Fructose	aq	-915.38	Thauer et al. (1977)
Carbohydrate	α -D- Galactose	aq	-923.53	Thauer et al. (1977)
Carbohydrate	α -D- Glucose	aq	-917.22	Thauer et al. (1977)
Carbohydrate	Sucrose	aq	-1551.85	Thauer et al. (1977)
Chlorite	ClO ₂ ⁻	aq	17.2	Thauer et al. (1977)
Chloroaliphatic	1,1,1,2-Tetrachloroethane	g	-80.26	Dolfine & Janssen (1994)

ANEXO F

Conteos por ciclos para cada biorreactor.

Reactor S1

S1			
tiempo (h)	B.PHA	B.no PHA	B.total
0	3,70E+07	4,50E+07	8,20E+07
12	7,20E+07	1,90E+07	9,10E+07
24	8,00E+07	1,08E+08	1,88E+08
36	9,70E+07	1,23E+08	2,20E+08
48	4,00E+06	5,60E+07	6,00E+07
60	3,00E+06	2,00E+04	8,00E+05
72	2,70E+07	2,53E+08	2,80E+08
96	3,00E+06	2,70E+07	3,00E+07
108	---	---	---
120	---	---	---

Reactor S2

S2			
tiempo (h)	B.PHA	B.no PHA	B.total
0	4,60E+07	4,90E+07	9,50E+07
12	7,20E+07	2,00E+07	9,20E+07
24	3,00E+06	4,00E+06	7,00E+06
36	1,00E+06	1,00E+04	1,00E+05
48	1,80E+07	2,82E+08	3,00E+08
60	9,00E+06	1,11E+08	1,20E+08
72	3,50E+07	3,75E+08	4,10E+08
96	1,60E+07	1,84E+08	2,00E+08
108	4,00E+06	3,60E+07	4,00E+07
120	1,21E+08	1,33E+08	2,54E+08

Reactor S3

S3			
tiempo (h)	B.PHA	B.no PHA	B.total
0	1,76E+08	5,60E+07	2,32E+08
12	9,90E+07	4,90E+07	1,48E+08
24	5,30E+07	4,90E+07	1,02E+08
36	5,60E+07	1,40E+07	7,00E+07
48	2,30E+07	4,57E+08	4,80E+08
60	6,70E+07	8,13E+08	8,80E+08
72	8,00E+07	8,60E+08	9,40E+08
96	1,42E+08	1,84E+09	1,98E+09
108	5,09E+08	5,67E+09	6,18E+09
120	5,36E+08	5,07E+09	5,61E+09

Reactor S4

S4			
tiempo (h)	B.PHA	B.no PHA	B.total
0	2,70E+07	5,40E+07	8,10E+07
12	7,50E+07	3,50E+07	1,10E+08
24	5,90E+07	5,00E+07	1,09E+08
36	6,00E+07	1,30E+07	7,30E+07
48	3,10E+07	6,19E+08	6,50E+08
60	5,20E+07	7,98E+08	8,50E+08
72	3,90E+07	5,21E+08	5,60E+08
96	1,65E+08	4,40E+07	2,09E+08
108	5,53E+08	5,12E+09	5,67E+09
120	3,13E+08	2,96E+09	3,27E+09