



**Casa abierta al tiempo**

**Efecto de la relación saciedad/ayuno en el enriquecimiento de  
biomasa acumuladora de Polihidroxibutirato**

Tesis que presenta

**Diana Gabriela Carreon Becerril**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Energía y Medio Ambiente**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA**

**POSGRADO DE ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

---

---

**“Efecto de la relación saciedad/ayuno en el enriquecimiento de biomasa  
acumuladora de Polihidroxitirato”**

---

---

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)**

**PRESENTA:**

**Diana Gabriela Carreon Becerril**

Matrícula: **2213801106**

Correo: **diana.18becerril@gmail.com**

Directora:

**Dra. María del Carmen Fajardo Ortiz**

Asesor:

**Dr. Ulises Durán Hinojosa**

Jurado

**Presidente: Dr. Ulises Duran Hinojosa**

**Vocal: Dr. Ulises Rojas Zamora**

**Secretaria: Dra. Denisse Serrano Palacios**

Iztapalapa, Ciudad de México, 13 de diciembre del 2024

## **Agradecimientos**

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora la Dra. Carmen Fajardo y mi asesor el Dr. Ulises Duran por sus asesoría, consejos, confianza, orientación y paciencia me guiaron a lo largo de este proceso y fueron fundamentales para la realización de la tesis.

Agradezco también a CONAHCYT por la beca otorgada durante los estudios de maestría y el apoyo financiado con el número CVU: 1166875.

A mis padres y hermanos que me han brindado siempre su apoyo y confianza. Gracias por su comprensión y palabras de aliento para que siempre me mantuviera enfocado y perseverante.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos y compañeros de laboratorio quienes me acompañaron en este viaje académico. Muchas gracias a la Dra. Tania Mendoza, Mtra. Haití Islas y Biol. Jacqueline Salinas, que me enseñaron y apoyaron incondicionalmente a seguir adelante. Gracias por estar en los momentos de estrés, escucharme y por siempre tener una palabra de aliento, tener gestos amables recordándome que no estaba sola en este camino.

Quiero hacer una mención a mi compañerito de cuatro patitas “antifaz” que durante este proceso fue mi motivación. En los momentos de mayor estrés y frustración, siempre estuvo a mi lado para bríndame tranquilidad con sus ojitos de ternura y lealtad.

Finalmente, agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) por facilitarme los recursos, instalaciones y herramientas necesarias para poder llevar a cabo esta investigación y a todas aquellas personas que, de alguna manera, contribuyeron a esta investigación.



## RESUMEN

Los polihidroxicarboxilatos (PHA) son los candidatos ideales para sustituir a los petroplásticos, por que comparten propiedades similares, la diferencia es que son biodegradables. Generalmente los PHA son producidos por bacterias y arqueas, como productos intracelulares que ocupan como reservas de carbono y energía. Las principales restricciones se deben al uso de sustratos sintéticos y que el proceso se debe llevar en condiciones estériles y con cultivos axénicos, lo que hace que los costos de producción se eleven significativamente. Una alternativa es utilizar compuestos renovables, como desechos orgánicos y utilizar cultivos mixtos en lugar de cepas puras. De esta manera se aprovecha y se valoriza, por un lado la biomasa aerobia procedente de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, y por el otro, el contenido de carbono orgánico de los desechos agroindustriales.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la relación saciedad/ayuno (S/A) en el enriquecimiento de biomasa suspendida productora de polihidroxibutirato en un reactor de lote secuencial (SBR) a escala laboratorio, usando un cultivo mixto como inóculo y lixiviados de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) de la planta de composteo de Bordo Poniente como sustrato.

Los lixiviados utilizados en este estudio fueron previamente caracterizados, principalmente para determinar el contenido de demanda química de oxígeno soluble (DQOs), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y ácidos grasos volátiles (AGV). Se operaron dos SBR: el primero (R1) se utilizó para identificar las condiciones operacionales que favorecieran el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHB, el sustrato fue suministrado bajo la estrategia de Alimentación Dinámica Aerobia (ADA), y consistió en una mezcla de agua residual y lixiviados FORSU, en ciclos de 12 horas. El segundo SBR (R2) operó bajo las mismas condiciones que R1, modificando el tiempo de los ciclos a 8 y 6 horas.

El volumen de R1 fue de 1 L, se inoculó con 8.0 g SSV/L de lodos activados aerobios y operó durante 165 días. La operación se dividió en tres etapas. En la etapa 1, se operó a una carga de 4.32 kg DQOs/ $\text{m}^3 \cdot \text{día}$  y como medio de alimentación agua residual municipal suplementada con una mezcla de AGV, ácidos acético, butírico, propiónico y valérico. En esta etapa se logró una acumulación de 7.6 g PHB/g peso-seco a una S/A experimental de 0.03. En la etapa 2, fue alimentado con lixiviados de la FORSU y diluido con agua residual a la misma carga de la etapa



1. En estas condiciones, la relación S/A aumentó a 0.13 y se obtuvo una acumulación máxima de 19.5 g PHB/g de peso-seco. Para la etapa 3, se incrementó la carga a 6.38 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. Se alcanzó una acumulación máxima de 55.7 g PHB/g de peso-seco, sin embargo, este rendimiento no se mantuvo al final de la operación y disminuyó hasta 2.0 g PHB/g peso-seco. Este comportamiento se atribuye a la pérdida de la capacidad respiratoria, la cual en la etapa 1 fue de 2.4 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min y disminuyó hasta 0.02 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min para la etapa 3, como consecuencia a los largos periodos de ayuno a los que estuvo expuesta la biomasa, o bien a los compuestos recalcitrantes presentes en los lixiviados de la FORSU.

El volumen de R2 fue el mismo, se inoculó con 8.5 g SSV/L de lodos activados aerobios y operó durante 76 días. La principal modificación operacional de R2 fue la reducción del ciclo de operación a 8 y 6 h. La etapa 1, consistió en la aclimatación del lodo, usando agua residual municipal suplementada con la mezcla de AGV, en ciclos de 8 h, dando como resultado una carga orgánica de 6.20 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. En estas condiciones, la relación S/A experimental fue de 0.10 y se acumularon 11.0 g PHB/g peso-seco. En la etapa 2, R2 fue alimentado con lixiviados de la FORSU y diluido con agua residual a la misma carga de la etapa 1. Bajo estas condiciones la relación S/A fue de 0.13 y se obtuvo una acumulación de 13.2 g PHB/g peso-seco. En la etapa 3, se redujo el ciclo a 6 h, incrementándose la carga a 8.38 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. Se alcanzó una relación S/A de 0.28 y una acumulación de 18.6 g PHB/g peso-seco, para el día 66.

Por lo tanto, la reducción de los ciclos y el aumento de la carga orgánica permitieron alcanzar relaciones S/A entre 0.25-0.28 que son las que permitieron una mayor acumulación de PHB y una alta eficiencia de eliminación de materia orgánica y amonio. Sin embargo, el tiempo de exposición de la biomasa al lixiviado de la FORSU no debe ser mayor a 80 días.

El uso de lixiviados de la FORSU favoreció la producción de microorganismos acumuladores de PHB mediante la estrategia S/A. Al optimizar el proceso y reducir el ciclo a 6 h en el reactor R2, ya que se logró una mayor acumulación. Estos resultados sugieren que la reducción de los ciclos en sistemas SBR podrían mejorar la eficiencia de acumulación de este biopolímero, abriendo nuevas investigaciones sobre la optimización de este tipo procesos.



## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanes (PHA) are the ideal candidates to replace petroplastics because they share similar properties, the difference being that they are biodegradable. PHA are generally produced by bacteria and archaea, as intracellular products that they use as carbon and energy reserves. The main restrictions are due to the use of synthetic substrates and the fact that the process must be carried out under sterile conditions and with axenic cultures, which makes production costs rise significantly. An alternative is using renewable compounds, such as organic waste, and mixed cultures instead of pure strains. In this way, the aerobic biomass from municipal wastewater treatment plants on the one hand, and the organic carbon content of agro-industrial waste on the other, can be used and valorized.

The objective of this study was to evaluate the effect of the feast/famine (F/F) ratio on the enrichment of suspended polyhydroxybutyrate-producing biomass in a laboratory-scale SBR, using a mixed culture as inoculum and the organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) from the Bordo Poniente composting plant as substrate.

The leachates used in this study were previously characterized, mainly to determine the content of soluble chemical oxygen demand (COD), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and volatile fatty acids (VFA). Two SBRs were operated: the first (R1) was used to identify the operational conditions that favored the enrichment of PHB-accumulating biomass, the substrate was supplied under the Aerobic Dynamic Feeding (ADA) strategy, and consisted of a mixture of wastewater and FORSU leachate, in 12-hour cycles. The second SBR (R2) operated under the same conditions as R1, modifying the cycle time to 8 and 6 hours.

The volume of R1 was 1 L, inoculated with 8.0 g SSV/L of aerobic activated sludge and operated for 165 days. The operation was divided into three stages. In stage 1, it was operated at a load of 4.32 kg COD/m<sup>3</sup>·day and as feed medium municipal wastewater supplemented with a mixture of VFA, acetic, butyric, propionic and valeric acids. In this stage, an accumulation of 7.6 g PHB/g dry-weight was achieved at an experimental S/A of 0.03. In stage 2, it was fed with leachate from the FORSU and diluted with wastewater at the same loading as in stage 1. Under these conditions, the S/A ratio increased to 0.13 and a maximum accumulation of 19.5 g PHB/g dry-weight was obtained. For stage 3, the loading was increased to 6.38 kg COD/m<sup>3</sup>·day. A maximum accumulation of 55.7 g PHB/g dry-weight was reached, however, this performance was



not maintained at the end of the operation and decreased to 2.0 g PHB/g dry-weight. This behavior is attributed to the loss of respiratory capacity, which in stage 1 was 2.4 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min and decreased to 0.02 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min for stage 3, as a consequence to the long fasting periods to which the biomass was exposed, or to the recalcitrant compounds present in the FORSU leachates.

The volume of R2 was the same, inoculated with 8.5 g SSV/L of aerobic activated sludge and operated for 76 days. The main operational modification of R2 was the reduction of the operation cycle to 8 and 6 h. Stage 1, consisted of sludge acclimatization, using municipal wastewater supplemented with the VFA mixture, an 8 h cycle resulting in an organic load of 6.20 kg COD/m<sup>3</sup>·day. Under these conditions, the experimental S/A ratio was 0.10, and 11.0 g PHB/g dry-weight was accumulated. In stage 2, R2 was fed with leachate from the OFMSW and diluted with wastewater at the same loading as in stage 1. Under these conditions, the F/F ratio was 0.13, and an accumulation of 13.2 g PHB/g dry-weight was obtained. In stage 3, the cycle was reduced to 6 h, increasing the loading to 8.38 kg COD/m<sup>3</sup>·day. An S/A ratio of 0.28 and an accumulation of 18.6 g PHB/g dry-weight was achieved by day 66.

Therefore, the reduction of the cycles and the increase of the organic load allowed reaching F/F ratios between 0.25-0.28, which are the ones that allowed a higher PHB accumulation and a high efficiency of organic matter and ammonium removal. However, the exposure time of the biomass to the OFMSW leachate should not exceed 80 days.

Using OFMSW leachates favored the production of PHB-accumulating microorganisms through the F/F strategy. Higher accumulation was achieved by optimizing the process and reducing the cycle to 6 h in the R2 reactor. These results suggest that the reduction of the cycles in SBR systems could improve the accumulation efficiency of this biopolymer, opening new investigations on the optimization of this type of process.

# Índice General

Introducción	16
<b>I</b>	<b>Marco Teórico</b>
1.1 Plásticos	19
1.1.1 Producción de plásticos	19
1.1.2 Clasificación de los plásticos	20
1.2 Bioplásticos generalidades	21
1.3 Generalidades de Polihidroxicanoatos (PHA)	24
1.3.1 Polihidroxicanoatos	24
1.3.2 Síntesis de PHA	26
1.3.3 Microorganismos acumuladores de PHA	29
1.4 Tipos de cultivos	30
Cultivos puros	31
Cultivos mixtos (CM)	31
1.5 Tipos de sustratos	32
1.6 Aplicaciones de los PHA	33
1.7 Polihidroxibutirato (PHB)	33
1.7.1 Generalidades de los PHB	33
1.7.2 Sistemas de producción de PHB	35
1.7.3 Tipos de reactores para la producción de PHB	36





Reactores continuos de tanque agitado (CSTR)	36
Reactor discontinuo secuencial (SBR)	37
1.7.4 Condiciones de operación para producción de PHB en reactores SBR	38
Carga orgánica	39
Relación C/N	40
Tiempo de residencia de sólidos (TRS)	41
pH	41
Concentración de oxígeno disuelto (OD):	41
Estrategia Saciedad/Ayuno (S/A):	42
Temperatura	43
1.8 Enriquecimiento de biomasa productora de PHB	43
1.9 Residuos agroindustriales como sustrato para la producción de PHB	44
<b>II</b>	<b>Planteamiento del Problema</b>
2.1. Justificación	48
2.2. Objetivos	50
2.2.1 General	50
2.2.2 Específicos	50
2.2.3 Hipótesis	50
<b>III</b>	<b>Metodología y Desarrollo experimental</b>
3.1 Materiales y métodos	52
3.1.1 Reactor de lote secuencial (SBR) para el enriquecimiento de biomasa productora de PHB	53
3.1.2 Inóculo	54
3.1.3 Muestreo de agua residual y lixiviados	54
3.1.4 Alimentación	54
3.2 Configuración de los ciclos de operación de los reactores SBR	57
Reactor 1 (R1)	57
Reactor 2 (R2)	57
3.3 Técnicas analíticas	57
Conductividad, Temperatura, Salinidad, Sólidos Disueltos Totales (SDT) y Oxígeno Disuelto (OD)	58
pH	58



DQOt y DQOs	58
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )	59
Sólidos Totales, Fijos y Volátiles	59
Ácidos Grasos Volátiles (AGV)	59
Identificación de PHB por microscopia	59
Cuantificación de PHB por gravimetría	60
Variables de respuesta	60
Perfiles cinéticos	60
Cálculo de la relación saciedad/ayuno	61
<b>IV</b>	<b>Resultados y Discusión</b>
4.1 Caracterización del Inóculo	63
4.2 Muestreo de lixiviados y agua residual	64
4.2.1 Caracterización de agua residual	64
4.2.2 Caracterización de lixiviados de la FORSU	66
4.3 Operación del Reactor 1 (R1)	68
4.3.1 Perfil de consumo de DQO	69
4.3.2 Perfil de consumo de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )	70
4.3.3 Perfil de consumo de AGV	71
4.3.3.1 Remoción de AGV individuales	72
4.3.4 Identificación de PHA por fluorescencia	75
4.3.5 Cuantificación de PHB por gravimetría	76
4.3.6 Evolución de sólidos volátiles	78
4.3.7 Parámetros cinéticos de operación	79
4.4 Operación del Reactor 2 (R2)	83
4.4.1 Perfil de consumo de DQO	83
4.4.2 Perfil de consumo de $\text{NH}_4^+$	84
4.4.3 Perfil de consumo de AGV	85
4.4.3.1 Remoción de AGV individuales	86
4.4.4 Identificación de PHA por fluorescencia	87
4.4.5 Cuantificación de PHB por gravimetría	88
4.5 Efecto de la relación saciedad/ayuno en la producción de PHB	89



<b>V</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	
5.1 Conclusiones		97
5.2 Recomendaciones		98
Bibliografía		99
Anexos		121



## Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de plásticos (Morton-Jones, 2012).....	21
Tabla 2. Clasificación de los tipos de bioplásticos, por su biodegradabilidad (European Bioplastics, s. f.).....	23
Tabla 3. Microorganismos utilizados para la producción de PHA .....	30
Tabla 4. Producción de PHA a partir de distintos residuos.....	32
Tabla 5. Propiedades físicas del PHB y PP(Delgado & Cordoba, 2015).....	34
Tabla 6. Características principales de la FMS y FML (Ramadas et al., 2013; Koller, 2018) .....	35
Tabla 7. Composición de la mezcla de AGV .....	55
<b>Tabla 8. Condiciones de operación del SBR.....</b>	<b>56</b>
Tabla 9. Técnicas analíticas .....	58
Tabla 10. Caracterización del inóculo.....	64
Tabla 11. Caracterización de agua residual.....	66
Tabla 12. Caracterización de lixiviados Bordo Poniente .....	68
Tabla 13. Resumen de consumo de AGV individuales en R1 .....	74
Tabla 14. Parámetros cinéticos para R1 .....	81
Tabla 15. Resumen de consumo de AGV individuales R2.....	87
Tabla 16. Producción de PHA con diferentes ciclos de operación. ....	94

## Índice de Figuras

Figura 1. Inclusiones de PHA (Hermida & Díaz, 2003) .....	24
Figura 2. Estructura polimérica de los PHA (Adeleye et al., 2020).....	25
Figura 3. Estructura de tipos de PHA a: Poli(3hidroxibutirato) (PHB); b: Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV)(Koller et al., 2017).....	25
Figura 4. Principales vías de síntesis de PHA (X. Zhang et al., 2020b) .....	28
Figura 5. Ruta metabólica de síntesis y degradación de PHB de <i>Ralstonia eutropha</i> (Sudesh et al., 2000).....	34
Figura 6. Esquemas descritos para la biosíntesis de PHB operados por procesos discontinuos, a) lote, b) lote repetido (alimentado), c) lote alimentado y d) lote alimentado con recirculación de células para incrementar la retención de biomasa (Koller, 2018b).....	37
Figura 7. Reactor tipo SBR .....	38
Figura 8: Alimentación Dinámica Aerobia imagen adaptada de Serafim, 2006.....	42





Figura 9. Diseño Experimental del primer SBR .....	52
Figura 10. Diseño Experimental del segundo SBR.....	52
Figura 11. Ciclos de operación de los reactores SBR .....	53
Figura 12. Perfil de DQOs del SBR con aumento de cargas Influyente, (◆), Efluente (■) y Eficiencia (●) en R1 .....	70
Figura 13. Perfil de consumo de $\text{NH}_4^+$ (▲) Influyente, (◆) Efluente y Eficiencias (●) en R1 .....	71
Figura 14. Perfil de $\text{AGV}_T$ (⊗) Influyente, (●) Efluente y (●) Eficiencia en R1 .....	72
Figura 15. Identificación por microcopia de fluorescencia a 460 nm con aumento 100X: a) 22, b) 44, c) 129 y d) 150 días de operación de R1 .....	76
Figura 16. Perfil de producción de PHB durante el enriquecimiento en R1 (■) PHB .....	78
Figura 17. Perfil de sólidos volátiles en R1. ....	79
Figura 18. Perfil cinético de 6 horas de operación del reactor R1 en la etapa de producción. (—) OD, (◆) DQOs y (▲) $\text{NH}_4^+$ .....	80
Figura 19. Perfil de SOUR en R1 .....	82
Figura 20. Perfil de DQOs de R2 con aumento de cargas Influyente, (◆), Efluente (■) y Eficiencia (●) en R2 .....	84
Figura 21. Perfil de consumo de $\text{NH}_4^+$ Influyente (▲), Efluente (◆) y Eficiencia (●) en R2.....	85
Figura 22. $\text{AGV}_T$ (⊗) Influyente, (●) Efluente y (●) Eficiencia en R2 .....	86
Figura 23. Microscopia de fluorescencia a) inóculo, b) etapa 1 (10 días), c) etapa 2 (38 días) y d) etapa 3 (66 días), en R2 .....	88
Figura 24. Perfil de acumulación en R2 durante las 3 etapas (■) %PHB.....	89
Figura 25. Cinéticas de consumo de OD en el R1 de la etapa 1 (día 27 —), etapa 2 (día 63 —) y etapa 3 (día 122 —) .....	91
Figura 26. R1 Comportamiento de la S/A (—) contra la acumulación de PHB(—) .....	92
Figura 27. Cinéticas de consumo de OD en el R2 de la etapa 1 (día 10 —), etapa 2 (día 38 —) y etapa 3 (día 66 —) .....	93
Figura 28. R2 Comportamiento de la S/A (—) contra la acumulación de PHB(—) y gráfica de la SOUR en cada etapa.....	94
Figura 29. Parámetros cinéticos de $q_{r\text{DO}_5}$ y $q_{r\text{NH}_4^+}$ .....	123
Figura 30. Cinética de consumo de OD .....	124

**Nomenclatura**

<b>%</b>	Porcentaje
<b>°C</b>	Grados Celcius
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μS/cm</b>	Microsiems/centímetro
<b>mS/cm</b>	Milisiems/centimetro
<b>ADA</b>	Alimentación Dinámica Aerobia
<b>AGV</b>	Ácidos Grasos Volátiles
<b>AR</b>	Agua Residual
<b>ARM</b>	Agua Residual Municipal
<b>ARM+AGV</b>	Agua Residual Municipal más Ácidos Grasos Volátiles
<b>ARM+LIX</b>	Agua Residual Municipal más Lixiviados
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato.
<b>C/N</b>	Carbono/Nitrógeno
<b>CM</b>	Cultivo Mixto
<b>CSTR</b>	Reactores Continuos de Tanque Agitado
<b>DQO</b>	Demando Química de Oxígeno
<b>DQOs</b>	Demanda Química de Oxígeno Soluble
<b>DQO<sub>T</sub></b>	Demando Química de Oxígeno Total
<b>FID</b>	Detector de Ionización de Flama
<b>FML</b>	Fermentación Liquida
<b>FMS</b>	Fermentación Sólida
<b>FORSU</b>	Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos
<b>GAO</b>	Microrganismos Acumuladores de Glucógenos
<b>h</b>	hora
<b>HA</b>	Ácido Acético
<b>HB</b>	Ácido Propiónico
<b>HP</b>	Ácido Butírico
<b>HV</b>	Ácido Valérico
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto



<b>OUR</b>	Tasa de consumo de Oxígeno
<b>PAO</b>	Microrganismos Acumuladores de Polifosfatos
<b>PLA</b>	Ácido Poliláctico
<b>PHA</b>	Polihidroxicanoatos
<b>PHB</b>	Polihidroxitirato
<b>PP</b>	Polipropileno
<b>TRH</b>	Tiempo de Retención Hidráulica
<b>TRS</b>	Tiempo de Retención de Sólidos
<b>S/A</b>	Saciedad/Ayuno
<b>SDT</b>	Sólidos Disueltos Totales
<b>SBR</b>	Reactor de Lote Secuencial
<b>SF</b>	Sólidos Fijos
<b>SOUR</b>	Tasa específica de Consumo de Oxígeno
<b>ST</b>	Sólidos Totales
<b>SV</b>	Sólidos Volátiles
<b>R1</b>	Reactor uno
<b>R2</b>	Reactor dos



## Introducción

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son de los bioplásticos más investigados en los últimos años, debido a que son biodegradables, renovables, biocompatibles y sostenibles en su producción. Entre los PHA más estudiados está el Polihidroxibutirato (PHB) (Sudesh et al., 2000). Las características que posee son similares a los polímeros petroquímicos sintéticos como el propileno (Taguchi & Lama, 2016). El problema ambiental del agotamiento de combustibles fósiles y el tiempo que tardan en degradarse, sitúan a los PHA como candidatos perfectos para sustituir los plásticos convencionales derivados del petróleo, especialmente en aplicaciones industriales de poca duración.

En México se producen 300 millones de toneladas de plásticos al año, de las cuales solo se recicla el 3% y el resto es depositado en rellenos sanitarios donde pasan a formar un gran problema de contaminación debido a su baja tasa de degradabilidad. Por ejemplo, las bolsas de polietileno tardan alrededor de 150 años en descomponerse totalmente, por otro lado, las botellas de plástico que tardan entre 500 y 1000 años en degradarse (Santillan, 2018).

Los costos de producción de los bioplásticos siguen siendo un inconveniente, si se compara con la industria de los petroplásticos, dependiendo de la composición del polímero, se encuentran entre \$47.68 y \$108.37 kg, que son mucho mayores que los polímeros a base de petróleo, usualmente menores a 21.67 kg (Sabapathy et al., 2020). El alto costo de producción es debido al uso de cepas puras o genéticamente modificadas, y sustratos comerciales. Por ello se estima que el 50% del costo de producción se debe a la fuente de carbono (Saratele et al. 2022). Por lo tanto, se han realizado investigaciones centradas en reducir el costo de producción, mediante la utilización de materiales de desecho como fuente de carbono (Guleria et al., 2022). Recientemente se ha demostrado que la síntesis del PHB se puede llevar a cabo a partir de residuos derivados de la industria, como las aguas residuales y residuos alimentarios (Pereira et al., 2012; Sánchez et al. 2021).

El uso de subproductos agroindustriales como sustratos, puede reducir los costos de producción y los impactos ambientales asociados al proceso. En este sentido se ha demostrado que un sustrato ideal para la producción de bioplásticos por su alto contenido de AGV son los lixiviados de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU), los cuales son considerados



altamente contaminantes, debido principalmente a su alto contenido de materia orgánica (DQO) y nutrientes (Castilla-Hernández et al., 2016; Koller, 2018a).

Sin embargo, los lixiviados de la FORSU contienen también compuestos recalcitrantes en concentraciones variables, que puede afectar el rendimiento y la eficiencia de acumulación. Para minimizar los efectos dañinos de los lixiviados y obtener mayores rendimientos de acumulación de biopolímeros se han utilizado reactores de lote secuencial (SBR), los cuales facilitan la adaptación de microorganismos al operarse en ciclos. Estos permiten la aplicación de la estrategia saciedad/ayuno (S/A) mediante el control de los ciclos operación del reactor.

En lo que respecta a los cultivos puros, una alternativa es utilizar consorcios microbianos, lo cual resulta ventajoso al evitar desarrollar el proceso en condiciones estériles, reduciendo así los costos de producción. Generalmente estos consorcios se encuentran en los lodos activados residuales. La estrategia más utilizada para el enriquecimiento de estos consorcios es someterlos a ciclos de S/A para poder potenciar la población de microorganismos productores de PHA.

Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la relación S/A, utilizando un cultivo mixto de lodos activados aerobios como inóculo y lixiviados de composteo de la FORSU como sustrato, para la producción de Polihidroxibutirato (PHB).

# **Capitulo I. Marco Teórico**

## 1.1 Plásticos

### 1.1.1 Producción de plásticos

La palabra “plástico”, proviene del griego *plastikós* y significa “dar forma por calor”, también se les conoce como “polímeros”, por ser productos orgánicos, a base de carbono, con moléculas de cadenas largas. Existen tres categorías generales (Pérez, 2014):

1. Plásticos naturales: aquellos productos que son derivados de la naturaleza y son moldeados por calor, se tiene de ejemplo a las resinas de los árboles.
2. Plásticos semi sintéticos: aquellos que derivan de productos naturales y se modifican mediante la mezcla de otros materiales.
3. Plásticos sintéticos: son materiales derivados de la alteración de la estructura molecular de cierto compuesto, generalmente obtenido a partir de una fuente fósil (petróleo, crudo, carbón o gas).

Las principales propiedades de estos compuestos son: impermeabilidad, tienen baja conductividad eléctrica, resistencia a la corrosión, resistencia a factores químicos y biológicos, y bajos costos de producción. Estas propiedades son favorables desde el punto de vista tecnológico y de aplicación, sin embargo, su desecho produce graves problemas ambientales debido a sus bajas tasas de degradación en ambientes naturales.

La degradación de los plásticos sintéticos es muy lenta; por ejemplo, la descomposición de productos orgánicos tarda de 3-4 semanas, la tela de algodón 5 meses y el plástico se estima que puede llegar a tardar hasta 500 años (Segura et al., 2007). Otro factor importante por considerar es que, durante la degradación de los plásticos se generan partículas de plástico más pequeñas, “microplásticos”.

En las playas y estuarios se han encontrado micro fragmentos de acrílico, polipropilenos, polietileno, poliamida (nylon), poliéster, polimetacrilato, entre otros. Estos microplásticos se acumulan en los ecosistemas provocando impactos negativos en la biota (Y. Zhang et al., 2020). Estudios recientes reportan a los microplásticos como un nuevo contaminante atmosférico debido a que se pueden transportar en el aire, la lluvia y la nieve (Navarro, 2020). En la actualidad no se habla mucho sobre el transporte de los microplásticos en el ciclo del agua. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de la caída atmosférica de microplásticos en una región virgen de los Pirineos, a 100 km de la fuente de origen debido al transporte por lluvia o nieve, identificando



fibras de hasta  $750\mu\text{m}$  de largo y fragmentados de  $\leq 300\mu\text{m}$  (Allen et al., 2019). Otro estudio realizado en el Océano Pacífico Occidental refiere que los microplásticos encontrados en el océano pueden venir no solo de ríos o de aguas residuales, sino de partículas suspendidas en el aire y precipitaciones (K. Liu et al., 2019).

El problema ambiental derivado por el transporte y acumulación de los plásticos en los ecosistemas se ha intensificado en las últimas décadas. En el año de 1950, la producción de plástico comenzó a crecer constantemente, adoptando una tendencia exponencial. En 2019 se produjeron 360 millones de toneladas de plástico y se hicieron cálculos de que alcanzaría 8300 millones de toneladas entre los años 1950 a 2015 (Ali et al., 2022). De esta cantidad solo el 78% se fueron a vertederos, el 12% se incineraron y solo el 9% se reciclaron. Estas estrategias no han servido para resolver el problema y no son las adecuadas para reducir las continuas descargas de plástico al ambiente, particularmente en países en desarrollo (Browning et al., 2021). Ante esta situación, se requieren enfoques, estrategias de gestión de residuos y nuevas tecnologías enfocadas a reducir el efecto nocivo en la salud humana y los ecosistemas.

### 1.1.2 Clasificación de los plásticos

Existen muchas clasificaciones de los plásticos, entre los que destacan por su monómero base, según la reacción de síntesis, estructura molecular y su comportamiento frente al calor (Frías et al., 2003). La clasificación general que más se utiliza, los agrupa en tres tipos (Tabla 1) (Morton-Jones, 2012):

- **Termoplásticos:** son los polímeros que se ablandan al calentarse y cuando se enfrían recuperan su dureza, se puede moldear varias veces, sin perder sus propiedades químicas, estas propiedades hacen que sean reciclables. La mayor parte de estos plásticos son polímeros de un peso molecular alto, poseen cadenas asociadas por medio de las fuerzas de Van der Waals, algunos incluso forman anillos aromáticos apilados. La temperatura máxima a que se someten estos es de  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , excepto el teflón.
- **Termoestables:** durante su fabricación sucede una transformación química llamada fraguado y son moldeados por presión o calor, a diferencia de los termoplásticos estos no se pueden reciclar.

- **Elastómeros:** son flexibles, se pueden estirar hasta 8 veces su tamaño original, recuperando su forma y tamaño cuando ya no se le aplica fuerza que deforme el material. Estos polímeros no soportan el calor y se degradan fácilmente a temperatura media.

*Tabla 1. Tipos de plásticos (Morton-Jones, 2012)*

<b>Termoplásticos</b>	<b>Termoestables</b>	<b>Elastómeros</b>
<b>Celulósicos</b>	Fenoplastos (PF)	Caucho (CA)
Acetato de celulosa (CA) Etilcelulosa (EC)	Aminoplastos (MF)	Neopreno (PCP)
<b>Derivados del petróleo</b>	Resina de poliéter (UP)	Poliuretano (PUR)
Polietileno (PE) Alta densidad (PEAD o HDPE) Baja densidad (PeBD o LDPE) Polietileno tereftalato (PET) Politetrafluoroetileno (PTFE) Cloruro de Polivinilo (PVC) Metacrilato (PMMA) Poliestireno (PS) Polipropileno (PP) Poliamida (PA) Policarbonato (PC)	Resina de epoxi (EP)	Silicona (SI)

## 1.2 Bioplásticos generalidades

Los bioplásticos son una alternativa a los plásticos derivados de la industria petroquímica, ya que son biodegradables y tiene un origen renovable. Se producen a partir de residuos industriales y urbanos mediante procesos biotecnológicos. Las fuentes renovables utilizadas para la síntesis de bioplásticos son biomasa, grasas y aceites vegetales, almidón de maíz, paja, astillas de madera, aserrín, residuos de alimentos reciclados y/o producidos por actividades metabólicas microbianas (Ali et al., 2022). Se manejan tres estrategias para generar estos tipos de bioplásticos: I) utilización de materiales naturales como la celulosa y el almidón, se les añaden plastificantes y otros aditivos para que tengan propiedades térmicas similares a la de los petroplásticos; II) Los que se producen mediante estrategias biotecnológicas, como el ácido poliláctico (PLA), se genera mediante la polimerización del ácido láctico que es producido por la fermentación bacteriana, o el bio-



polietileno y el bio-polietilentereftalato (Bio-PET). Otros son los plásticos que son producidos por una base biológica no biodegradables a partir de bioetanol; III) la tercera estrategia es la de los biopolíesteres bacteriano o polihidroxialcanoatos (PHAs), son los únicos bioplásticos producidos por un organismo vivo (microorganismos) (Prieto, 2020).

La visión detrás de un bioplástico es que pueda cumplir la misma función de un plástico convencional, pero sin el inconveniente de resistencia a la degradación. La mayoría de los bioplásticos que se producen a partir de materias primas 100% biodegradables y tienen dos ventajas en comparación a los plásticos convencionales:

- a) Se descomponen más rápido, en promedio de 4-5 años, según la composición química y, por lo tanto, son más fáciles de reciclar.
- b) Al ser derivados de residuos de biomasa, no tienen problema de agotamiento de materia prima desde la perspectiva de economía circular (Celletti et al., 2023).

Aunado a esto, la creciente demanda de producir bioplásticos a partir de cultivos alimentarios como la caña de azúcar y aceites vegetales compiten con el suministro de alimentación (G. Jiang et al., 2016a). Por ejemplo, un kilogramo de maíz produce 0.67 kg de glucosa, lo que permite generar bioplástico con un rendimiento de 0.47 kg de bioplástico/kg de maíz, esto supone una desventaja ya que impacta tanto al consumo humano como animal (B. S. Kim et al., 1994). Los desperdicios alimenticios para una producción anual de 10,624 toneladas, es de \$72410.46 por tonelada. Otra materia prima que suele utilizarse para producir bioplásticos es la yuca su capacidad de producción es de 100,000 toneladas anuales, los costos de producción \$49046.99 por tonelada.

Sin embargo, la principal limitación de estos bioplásticos es su costo de producción, el cual puede ser de 3 a 10 veces mayor al compararlo con el de los plásticos convencionales, y actualmente solo representan el 0.5% de las más de 348 millones de toneladas al año que se producen de plástico convencional (Abe et al., 2021). El costo de producción de los bioplásticos varía dependiendo de la composición, entre \$47.68 y \$108.37 kg, el cual es mucho más alto que el valor asociado a la producción a base de petróleo, que es menor a 21.67 kg (Sabapathy et al., 2020). La mayor inversión corresponde a la fuente de carbono, que representa el 50% total de la producción (Saratele et al. 2022). Adicionalmente ocupar cepas puras de organismos productores

de bioplásticos, implica operar en condiciones de esterilidad, lo que incrementa los costos de producción (Bedade et al., 2021).

Los nuevos desarrollos tecnológicos buscan disminuir los costos de producción, utilizando sustratos más baratos como son: aguas residuales o residuos agroindustriales; dando un valor agregado al carbono orgánico que contienen estos residuos, así como cultivos mixtos.

Es importante resaltar que la biodegradabilidad no depende del tipo de materia prima utilizada para su fabricación, sino que está vinculada a la estructura química del compuesto, el tener la palabra bioplástico, no implica ser biodegradable, así como no todos los plásticos derivados de fuentes no renovables son duraderos (Pathak et al., 2014) (Tabla 2).

Dentro de los bioplásticos más estudiados están los polihidroxicanoatos (PHA. En los últimos años, han captado el interés de los investigadores ya que algunos de ellos son biodegradables o incluso bajo condiciones adecuadas compostables (Kale et al., 2007). Así mismo, se están considerando como una solución para enfrentar el problema que los plásticos están ocasionando al medio ambiente.

*Tabla 2. Clasificación de los tipos de bioplásticos, por su biodegradabilidad (European Bioplastics, s. f.)*

<b>Polímeros bioplásticos</b>		
<b>Biodegradable</b>		<b>No Biodegradable</b>
Poliácido láctico (PLA)	Teraftalo adipato depolibutileno (PBAT)	Polietileno (PE) de base biológica
Polihidroxicanoatos (PHA)	Policaprolactona (PCL)	Polipropileno (PP) de base biológica
Succinato de polibutileno (PBS)	Alcohol polivinílico (PVOH)	Cloruro de polivinilo (PVC) de base biológica

### 1.3 Generalidades de Polihidroxicanoatos (PHA)

#### 1.3.1 Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA), son bioplásticos sintetizados intracelularmente, vía metabolismo secundario, por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y arqueas extremófilas (Koller, 2018a).

El PHA se almacena en el citoplasma de la célula, en forma de gránulos y son refractantes a la luz (Figura 1), los gránulos de PHA tienen un núcleo hidrofóbico con cadenas de PHA enrolladas y agua que actúa como plastificante. El núcleo hidrofóbico está cubierto por enzimas más hidrofílicas y proteínas estructurales formando una membrana proteica, a este sistema de proteína central se le denomina carbonosomas (Koller et al., 2017).



*Figura 1. Inclusiones de PHA (Hermida & Díaz, 2003)*

Las bacterias productoras de PHA ocupan el carbono contenido en este como fuente de energía para sobrevivir a periodos de estrés. En la naturaleza, las células procariotas pueden estar en condiciones ambientales estresantes, por ejemplo, aumentos bruscos en nutrientes esenciales, y como respuesta a este estrés los almacenan para sobrevivir durante periodos prolongados de ayuno.

Los PHA son poliésteres alifáticos, formados por unidades repetitivas de diversos hidroxiacidos o mezclas de ellos (Koller, 2018b). Son macromoléculas de estructura helicoidal, estabilizada por enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo de los monómeros individuales (Zhila & Shishatskaya, 2018). Los monómeros de PHA están formados por un grupo carboxilo de un monómero que forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Figura 2). Cuando el radical, está unido a un grupo metilo ( $-CH_3$ ), da como resultado el polihidroxiбутирато (PHB) (Figura 3a), este es el PHA más representativo. Si en el radical se une a

un grupo etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) el polímero lleva el nombre de Poli(3-hidroxi butirato-co-3hidroxivalerato) (PHBHV) (figura 3b), estos dos PHA son los más estudiados.

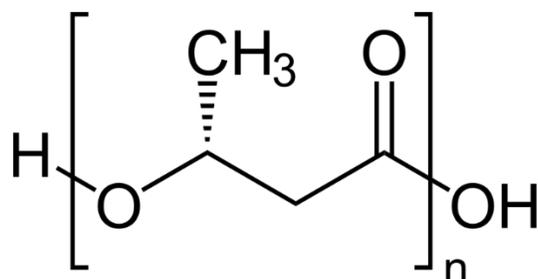


Figura 2. Estructura polimérica de los PHA (Adeleye et al., 2020)

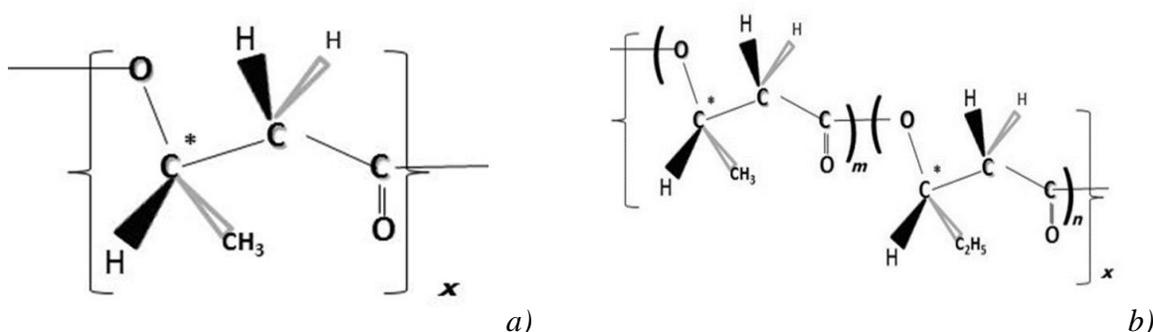


Figura 3. Estructura de tipos de PHA a: Poli(3hidroxi butirato) (PHB); b: Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV)(Koller et al., 2017)

El PHA que se sintetice y las propiedades que presente, dependerá de los microorganismos que los producen, las condiciones de crecimiento, el hidroxiácido que utilizará el microorganismo y el sustituyente del radical. Algunas características generales de los PHA son las siguientes (Bugnicourt et al., 2014):

- Relativa resistencia a la degradación hidrolítica
- Nula solubilidad en agua
- Buena resistencia a la luz ultravioleta
- Pobre resistencia a bases y ácidos
- Solubilidad en solventes no polares
- Biocompatibilidad
- Menor densidad en comparación del agua
- Nula toxicidad

La clasificación de los PHA dependerá del número de carbonos en sus monómeros (Cardona Echavarría et al., 2013):

1. Cadena corta: presentan propiedades termoplásticas, están conformadas por monómeros de 3-5 átomos de carbono, como el poli(3-hidroxivalerato) (PHV) y el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), este último está formado por unidades de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico.
2. Cadena mediana: tiene propiedades termoplásticas o elastómeros ( $T_m = 40-180^\circ\text{C}$ ), se componen por monómeros de 6-14 átomos de carbono, entre las que destacan el poli(3-hidroxihexanoato), poli(3-hidroxi octanoato) y el poli(3-hidroxidecanoato). Otros polímeros que se encuentran son los co-polimeros de cadena mixta, los cuales tienen dos tipos de homopolímero o están combinados por una cadena corta y otra media, como el poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato-co-3hidroxihexanoato) (P3HB-co-3HV-co-3HHx).
3. Cadena larga: Consisten en monómeros con más de 147 átomos de carbono, son los menos estudiados.

Dependiendo del número de carbonos los PHA presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad, factores importantes para su aplicación en los sectores productivos. Por ejemplo, en la industria los más utilizados son los de cadena corta, como el PHB, por presentar características similares o los polímeros derivados del petróleo. En el apartado 1.3.2, se profundizará más sobre este PHA.

### 1.3.2 Síntesis de PHA

La acumulación del PHA por las bacterias depende en gran medida de las fuentes de carbono utilizadas para el crecimiento bacteriano; en las vías de síntesis de PHA que suministran los monómeros, la PHA sintasa es la responsable de la estructura final de PHA (X. Zhang et al., 2020a) .

Se reportan tres mecanismos principales para la síntesis de PHA (figura 4) que se puede expandir a 12 vías, las cuales se acoplan con otras vías metabólicas, permitiendo la formación de diversos tipos de PHA. Los mecanismos de síntesis, utilizan tres vías principales (Figura 4)(X. Zhang et al., 2020b):

- I. A partir de azúcares (vía acetoacetyl-CoA)



II. Ácidos grasos *de novo*

III. Ciclos de  $\beta$ -oxidación

En la vía I, se encuentra la síntesis de PHA de cadena corta (scl), las dos moléculas de acetil-CoA que son generadas a partir de azúcares, ácidos grasos o aminoácidos, se convierten mediante una 3-cetotiolasa y acetoacetil-CoA reductasa en hidroxibutiril-CoA, que luego será polimerizado a PHB por la acción de la PHA sintasa. El microorganismo que representa a esta vía es *Cupriavidus necator* que contiene una sintasa scl (PhaC) (S. Y. Lee et al., 1995).

La vía II utiliza productos intermediarios de la vía  $\beta$ -oxidación para sintetizar PHA de cadena mediana (mcl) a partir de ácidos grasos. Primero se convierten en enoil-CoA durante la  $\beta$ -oxidación, después, la enoil-CoA es transformada por la R-3-hidroxiacil-CoA hidratasa para formar R-3-hidroxiacil-CoA como precursor para la polimerización de PHA de cadena mediana. Esta ruta la llevan a cabo microorganismos del género *Pseudomonas* como son: *P. putida*, *P. oleovorans*, *P. aeruginosa* y *P. entomophila* (Tsuge et al., 2003).

La vía III se lleva a cabo a través de la síntesis de ácidos grasos *in situ* que proporciona R-3-hidroxiacil-ACP para la síntesis de PHA. La enzima clave es la proteína transportadora 3-hidroxiacil-acil-Coenzima A transferasa (PhaG), la cual transforma R-3-hidroxiacil-ACP en R-3-hidroxiacil-CoA para la síntesis de PHA (Huijberts et al., 1994).

En términos generales, las vías basadas en fuentes de carbono para producir PHA se pueden clasificar en tres categorías: carbohidratos, triglicéridos, e hidrocarburos. Pero con el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica de los microorganismos productores de PHA, han surgido las investigaciones hacia materias primas sostenibles para no depender de sustratos puros que se traduce en costos más altos (G. Jiang et al., 2016a). El uso de fuentes de carbono renovables y de bajo costo, como residuos de desechos, y cultivos mixtos en combinación con buenas estrategias de fermentación, optimiza los procesos de producción de PHA con un alto rendimiento (Bedade et al., 2021).

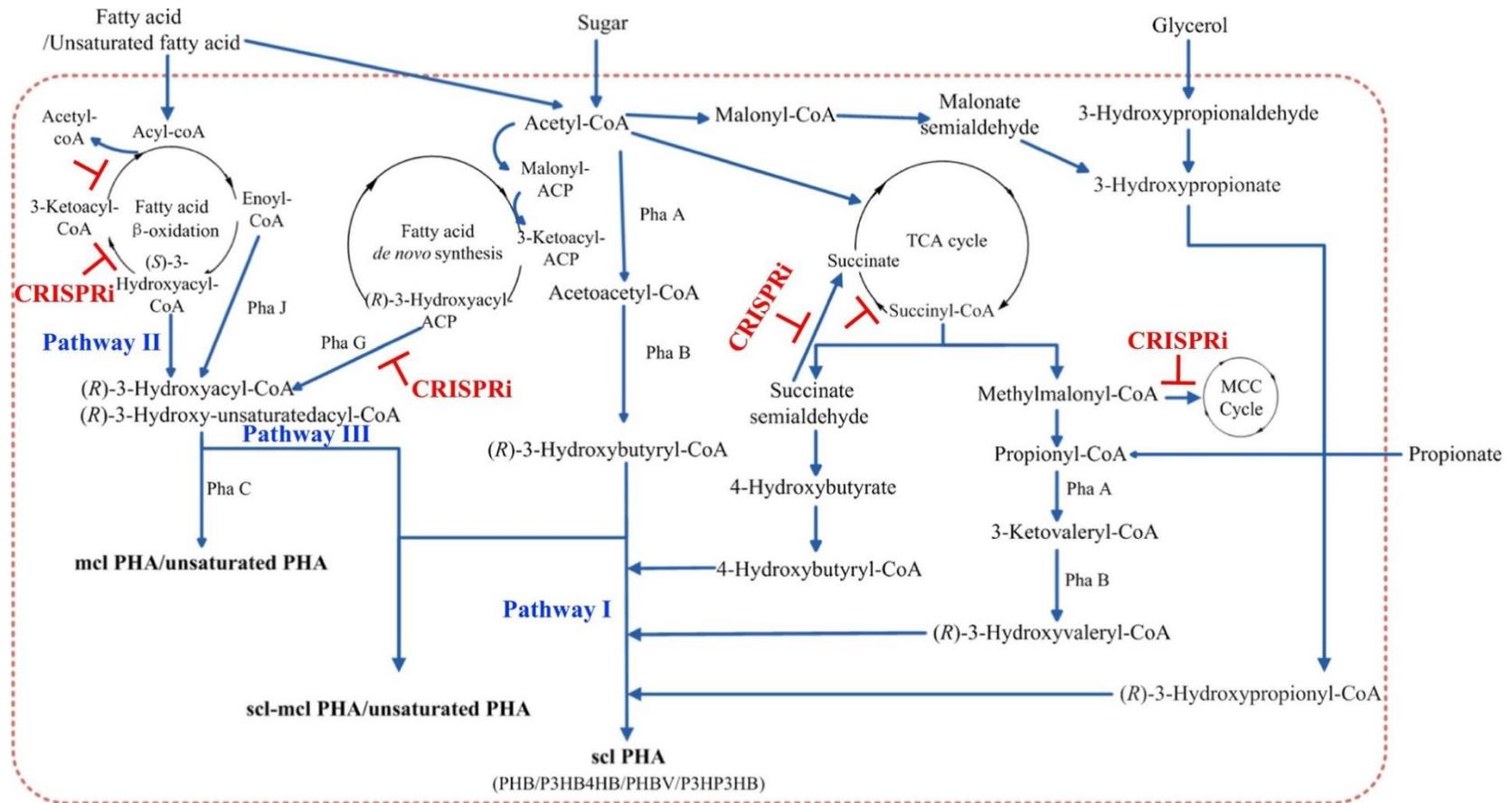


Figura 4. Principales vías de síntesis de PHA (X. Zhang et al., 2020b)

### 1.3.3 Microorganismos acumuladores de PHA

Los microorganismos productores de PHA se encuentran en casi todos los ecosistemas, como tapetes microbianos marinos, sedimentos, estuarios, la rizosfera, sedimentos de aguas subterráneas, así como en plantas de tratamientos de aguas residuales (Koller et al., 2017). Los PHA son sintetizados por un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas; se han reportado por lo menos 75 géneros diferentes, aunque solo unas pocas consiguen altos rendimientos. Algunos de los cultivos empleados industrialmente para la producción de PHA incluyen: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes Latus* y varias *pseudomonas* sp (*P. oleovorans*, *Pdesnitificans*, *P. Putida*) (Koller et al., 2008).

La producción de PHA por microorganismos surge por la limitación del crecimiento celular, y son de dos tipos:

1. Limitación externa, es la escasez en el medio de nutrientes para el crecimiento.
2. Limitación interna, la adaptación fisiológica de los microorganismos cuando son sometidos a condiciones alternas de presencia y ausencia de sustrato.

Las dos limitaciones dan lugar a un proceso de crecimiento desequilibrado, en donde la producción de biomasa activa es reducida y el sustrato es acumulado como reservas intracelulares. Los PHA pueden servir como una fuente de carbono o energía para los microorganismos que están en un periodo de ayuno o de estrés nutricional (Punrattanasin et al., 2006). En la tabla 3, se representan algunos de los microorganismos reportados como acumuladores de PHA, así como los sustratos comerciales utilizados para la producción.

Tabla 3. Microorganismos utilizados para la producción de PHA

Microorganismos	Tipo de PHA	Fuente de Carbono	% PHA	Referencia
<i>Methylobacterium organophilum</i> NCIB 11278	PHB	Metanol	52	(S. W. Kim et al., 1996)
<i>Alcaligenes eutrophus</i> NCIMB 11599	PHB	Glucosa	82	(Ryu et al., 1997)
<i>P. putida</i> KT 2440 ATCC 47054	mcl-PHA	Ácido oleico	51.4	(S. Y. Lee et al., 2000)
<i>Burkholderia sacchari</i> IPT 189	PHB	Sacarosa	42	(da Cruz Pradella et al., 2010)
<i>C. necátor</i> DSM 545	P(3HB-co-3HV)	Ácido propiónico Ácido butírico	88	(Grousseau et al., 2014)

#### 1.4 Tipos de cultivos

En ambientes naturales existe una gran diversidad de bacterias capaces de producir PHA. Hoy en día se han aislado bacterias con alta capacidad de almacenar PHA, así mismo, se han mejorado genéticamente para incrementar su rendimiento. En cuanto a la síntesis de PHA mediante microorganismos se conocen dos tipos: los cultivos puros bacterianos y los cultivos mixtos bacterianos. Existen dos metodologías para producir PHA la primera es la utilización de cultivos puros, esta incluye, esterilización, sustratos puros, equipos de alta gama y mantenimiento (Munir & Jamil, 2018). El segundo método consiste en utilizar cultivos mixtos microbianos, en el cual se omite la esterilización, además, se pueden ocupar desechos económicos como fuente de sustrato (Mannina et al., 2019).



### **Cultivos puros**

Para la producción de los PHA, a escala industrial se utilizan cultivos puros o cultivos genéticamente modificados (Tabla 3), lo que implica el uso de sustratos puros. Otro punto es que para la síntesis de PHA, un cultivo puro requiere tener procesos de esterilidad y sustratos filtrados, porque pueden limitar el proceso de comercialización (Sabapathy et al., 2020). Por ejemplo, la compañía Danimer Scientific utiliza una cepa modificada de *R. eutropha* y ácidos grasos volátiles como sustrato para la producción de PHA a gran escala. Otro ejemplo es la empresa Polyferm, Canadá, que produce mcl-PHA bajo el nombre comercial VersaMer™ a partir de aceites vegetales y glucosa. Los microorganismos que utilizan para sintetizar el PHA son: *Ralstonia eutropha* (PHB, PHBV y P3HB4HB), *Aeromonas hydrophila* (PHBHHx) y *Pseudomonas putida* (PHOHHx) (Bedade et al., 2021).

### **Cultivos mixtos (CM)**

Los consorcios mixtos microbianos, o cultivos mixtos (CM) proporcionan rutas ventajosas para la síntesis de PHA, estos cultivos se pueden trabajar en sistemas abiertos, evitando mantener la esterilidad que puede incrementar los costos de producción. Los consorcios mixtos, los podemos encontrar en desechos agroindustriales y municipales, y lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Gahlawat et al., 2020).

La acumulación de PHA con cultivos mixtos se da en sistemas donde el donante de electrones y la disponibilidad del aceptor de electrones se encuentran limitados o cuando el sustrato no está disponible en forma dinámica para los microorganismos. El PHA tiene una relación directa con el metabolismo de las bacterias llamadas GAO y PAO (microorganismos acumuladores de glucógeno y microorganismo acumuladores de polifosfatos, respectivamente). La forma de almacenar el PHA en cultivos mixtos es importante; usualmente, el lodo es sometido a periodos consecutivos de disponibilidad de sustrato (saciedad) y periodos de ausencia de sustrato (ayuno) (Bedade et al. 2021). Bajo estas condiciones dinámicas, cuando hay un exceso de la fuente de carbono, la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para crecimiento y acumulación del biopolímero, y cuando el sustrato se agota puede utilizar el polímero acumulado como fuente de energía y fuente de carbono (Arcos Hernández, 2008).

En los CM no es necesario que existan condiciones limitantes para el crecimiento, como sucede en los cultivos puros, limitando la disponibilidad de un nutriente esencial para favorecer la

acumulación del polímero intracelular (Reis et al., 2003a). Cuando el cultivo es expuesto a condiciones de estrés la tasa de acumulación de material de reserva es más alta que la tasa de crecimiento. Esto se debe a las condiciones desbalanceadas, ya que, si el sustrato se suministra constantemente, la tasa de crecimiento sería mayor que la de acumulación, esto por una adaptación fisiológica. Entre más tiempo estén en contacto con el sustrato la tasa de crecimiento será mayor, por otra parte, la tasa de acumulación de PHA tienen mucho que ver con la historia celular.

Se ha observado que los lodos jóvenes tienen tasas menores de acumulación de PHB en comparación con aquellos de mayor edad celular (Arcos & Vargas, 2007) . Por lo tanto, es recomendable utilizar cultivos mixtos de mayor edad para favorecer la acumulación del PHB, porque tienen la información genética que serán transmitidos a los nuevos microorganismos.

### 1.5 Tipos de sustratos

Los sustratos comúnmente utilizados para la síntesis de PHA son azúcares puros, ácidos grasos o aceites; representan alrededor del 50% del costo total de producción de los PHA (Koller et al., 2005). Las investigaciones han ido explorando otros sustratos más económicos y ricos en carbono que permitan una producción económicamente viable (Koller et al., 2017).

Una alternativa para reducir los costos para la síntesis de PHA, es sustituir los sustratos por residuos con alto contenido de materia orgánica, como los desechos agrícolas, melazas, aguas residuales y lodos, con lo cual se le da un valor agregado a estos desechos (Albuquerque et al., 2010a). En la tabla 4 se muestra algunos residuos utilizados para la producción de PHA.

*Tabla 4. Producción de PHA a partir de distintos residuos*

<b>Fuente de sustrato</b>	<b>Producción de % PHB</b>	<b>Referencia</b>
Efluente de aguas residuales con acetato-propionato	25	(Morgan-Sagastume et al., 2019a)
Residuos del tratamiento de la madera	18	(Queirós et al., 2017)
Lixiviados de composteo de la FORSU	78	(Korkakaki et al., 2016a)
Glicerol crudo	81	(Burniol-Figols et al., 2018)
Glicerol crudo	80	(Fauzi et al., 2019)
Lixiviados de composteo de la FORSU	16	(Sánchez Valencia et al., 2021a)

Un residuo que ha ido tomando relevancia para la producción de PHA son los lixiviados producidos a partir del composteo de la Fracción Orgánica de los Residuos Sólidos Urbanos (FORSU). Estos se producen durante el proceso de degradación de la materia orgánica y presentan altos contenidos de ácidos grasos de cadena corta, que pueden ser utilizados como sustrato para la producción de PHB (A. I. Sánchez Valencia et al., 2021; Colombo et al., 2017a; Korkakaki et al., 2016b).

## **1.6 Aplicaciones de los PHA**

La literatura reporta que por sus propiedades termoplásticas o elastómeras, físicas y mecánicas, pesos moleculares relativamente altos, los PHA son candidatos perfectos para diversas aplicaciones como en, medicina, farmacia, agricultura, alimentos, pudiendo ser materias primas para las síntesis de químicos semi puros y para la producción de pinturas (Chen & Wu, 2005).

Los PHA son los más utilizados en la fabricación de botellas desechables para shampoo, contenedores de productos alimenticios, bolsas y otros productos desechables como pañales, servilletas, vasos y cubiertos (González García et al., 2013). Dentro de la familia de los PHA están los copolímeros de P(3HBco3HV), los cuales se usan en la fabricación de material de empaque, productos higiénicos, agrícolas y biomédicos (X. Zhang et al., 2020a). Otras aplicaciones son, en la fabricación de juguetes electrónicos, herramientas y, autopartes; además se han empezado a utilizar en la industria biomédica para la fabricación de suturas, implantes, sustitutos pericárdicos y se ha propuesto usarlos para fabricar jeringas desechables y lubricantes de los guantes de cirugía (Sukumaran & Gopi, 2021). Los fabricantes a gran escala venden el PHA en forma de gránulos o polvo que se usan como materia prima para posteriormente sea procesada. Por ejemplo, Metabolix, sintetizó un micropolvo a base de PHA para uso cosmético, también ThephaFLEX fabrica mallas y películas de uso medicinal a partir de los gránulos de PHA (Dietrich et al., 2017).

## **1.7 Polihidroxibutirato (PHB)**

### **1.7.1 Generalidades de los PHB**

Dentro de la familia de los PHA se encuentra el Poli(3-hidroxibutirato) (P3HB). La síntesis del PHB se ha estudiado en cultivos puros con diferentes tipos de bacterias, siendo una de las más estudiadas *Cupriavidus necátor*, la cual tiene la capacidad de almacenar hasta un 80% de PHB, con respecto a su peso celular seco (Franz et al., 2011). Otro microorganismo ampliamente estudiado



es la *Ralstonia eutropha*, del cual se conoce la ruta metabólica de síntesis y degradación (Figura 5):

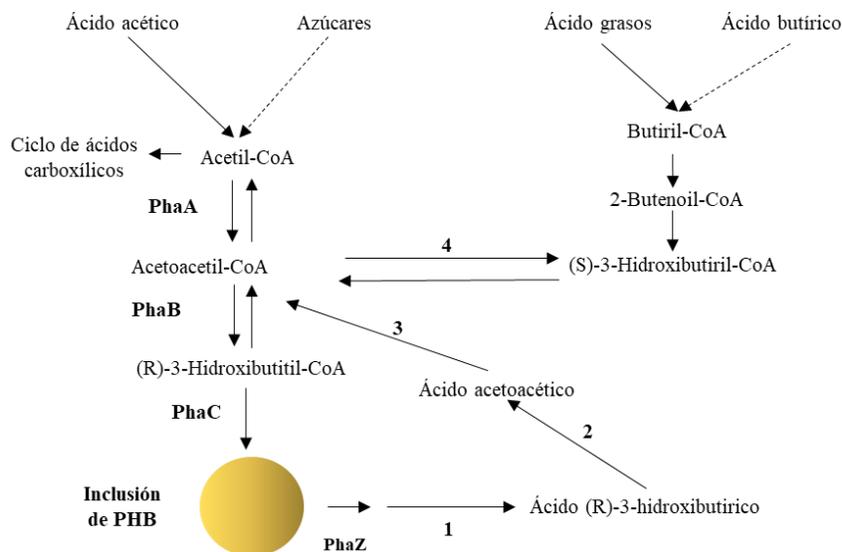


Figura 5. Ruta metabólica de síntesis y degradación de PHB de *Ralstonia eutropha* (Sudesh et al., 2000)

El PHB es el más utilizados industrialmente y cuenta con propiedades físicas similares a los plásticos derivados del petróleo como el polipropileno (PP). La tabla 5 muestra una comparación de las propiedades de ambos polímeros. A pesar de que algunas de las propiedades del PHB son muy semejantes al PP, este presenta algunas limitaciones debido a que es un material quebradizo y de alta dureza. Las propiedades mecánicas del polímero pueden ser mejoradas mediante la combinación con otros monómeros de PHA, plásticos de distinta naturaleza o con la incorporación de aditivos (Delgado & Cordoba, 2015).

Tabla 5. Propiedades físicas del PHB y PP (Delgado & Cordoba, 2015)

Parámetro	PHB	PP
Temperatura de fusión (°C)	177	176
Temperatura de transición vítrea	2	-10
Cristalinidad (%)	60	50-70
Fuerza de tensión (MPa)	43	38
Extensión hasta quiebre (%)	5	400

El PHB es completamente degradable por acción microbiana, de esa reacción se produce agua y dióxido de carbono en condiciones aerobias y metano mediante fermentación anaerobia. La degradación dependerá de las propiedades del polímero (humedad, temperatura y pH). En ambientes naturales, los microorganismos degradan el polímero mediante las PHA despolimerasas extracelulares (Arias Roblero, 2022)

Los implantes fabricados con PHB han demostrado que se adaptan al tejido óseo, sin general inflamación o rechazo. Estos materiales proceden de un proceso de cultivo con sustratos estériles y cultivos de cepas puras (Arcos Hernández, 2008). Los bioplásticos procedentes de sustratos agroindustriales, generalmente se utilizan para fabricación de películas plásticas, empaques y envases.

### 1.7.2 Sistemas de producción de PHB

Por sus propiedades, el PHB ha sido de interés para producirlo a escala industrial y remplazar al plástico derivado de hidrocarburos. La producción de PHB se clasifica por el tipo de sustrato empleado durante la fermentación, y se puede llevar acabo de dos formas en: Fermentación en medio líquido (FML) y Fermentación en medio sólido (FMS) (Subramaniyam & Vimala, 2012). En la tabla 6 se presentan las principales características de ambos procesos de fermentación; se puede observar que la agitación es un requerimiento constante en el proceso de FML.

*Tabla 6. Características principales de la FMS y FML (Ramadas et al., 2013; Koller, 2018a)*

<b>Característica</b>	<b>FMS</b>	<b>FML</b>
Régimen de operación	Sin agitación	Con agitación
Agua utilizada	Escasa	Indeterminada
Suministro de oxígeno	Difusión	Aireación
Volumen de fermentación	Pequeño	Grande
Aguas residuales	Mínima	Volúmenes significativos
Requerimientos energéticos	Bajos	Altos
Recursos humanos	Altos	Bajos
Inversión	Baja	Alta

La FML que es el crecimiento de microorganismos en una disolución rica en nutrientes, se utiliza principalmente para la producción de metabolitos secundarios. Tienen una facilidad de extracción de los metabolitos y gracias a esto es empleada para el cultivo de bacterias, que necesitan un gran contenido de humedad para su crecimiento (Subramaniyam & Vimala, 2012). En FML los microorganismos se encuentran dispersos en suspensión con aireación o sin aireación (Castilho et al., 2009). El microorganismo en FML realiza un mayor gasto energético cuando se encuentra ligado a la asimilación de oxígeno para su crecimiento. Se recomienda utilizar una agitación intermitente para evitar la acumulación de calor metabólico que pueda perjudicar el proceso de fermentación (Vásquez Vanegas, 2013).

La FMS es una matriz sólida con una fase formada de agua superficial en forma de película en el cual el crecimiento celular es adherido a las partículas sólidas (Mitchell & Krieger, 2006). Los sustratos usados en FMS son subproductos agroindustriales de frutas y verduras o forestales y en ocasiones se agregan nutrientes adicionales dependiendo de los requerimientos de los microorganismos (Ravichandran & R, 2012). Una de las ventajas del uso de residuos agroindustriales como sustrato para la producción de PHB en FMS, es que no requiere un sistema de fermentación estéril, lo que disminuye los costos de producción (Serafim et al., 2004a). La biotransformación de productos orgánicos por medio de la FMS resuelve problemas ambientales, convirtiendo los desechos en productos de valor agregado (Ortega et al., 2006).

### **1.7.3 Tipos de reactores para la producción de PHB**

Los reactores biológicos son diferentes a los químicos, la cinética no está determinada exclusivamente por la velocidad de la reacción, esta depende de características intrínsecas del organismo o cultivo tales como, la velocidad de crecimiento, tasa de división celular y distintas variables de operación (Sindhu et al., 2015). Los principales reactores que se emplean para la producción de PHB son: BATCH o lote, reactores continuos de tanque agitado (CSTR), reactor de flujo pistón, reactor discontinuo secuencial (SBR), entre otros (Chang Lee, 2001.).

A continuación, se describe la operación del CSTR y SBR, por ser los más utilizados.

#### **Reactores continuos de tanque agitado (CSTR)**

El reactor CSTR se utiliza ampliamente para la producción de levaduras, vinagre o etanol, entre otros metabolitos (Koller, 2018b). Permiten lograr una mezcla completa entre el sustrato y la biomasa. Estos tipos de reactores evitan que la velocidad de agitación destruya bacterias que se



encuentran en suspensión ya que se utilizan clarificadores de sedimentación por gravedad para separar el manto (W. S. Lee et al., 2014). La figura 6 presenta algunos ejemplos de operación de reactores CSTR para la biosíntesis de PHB:

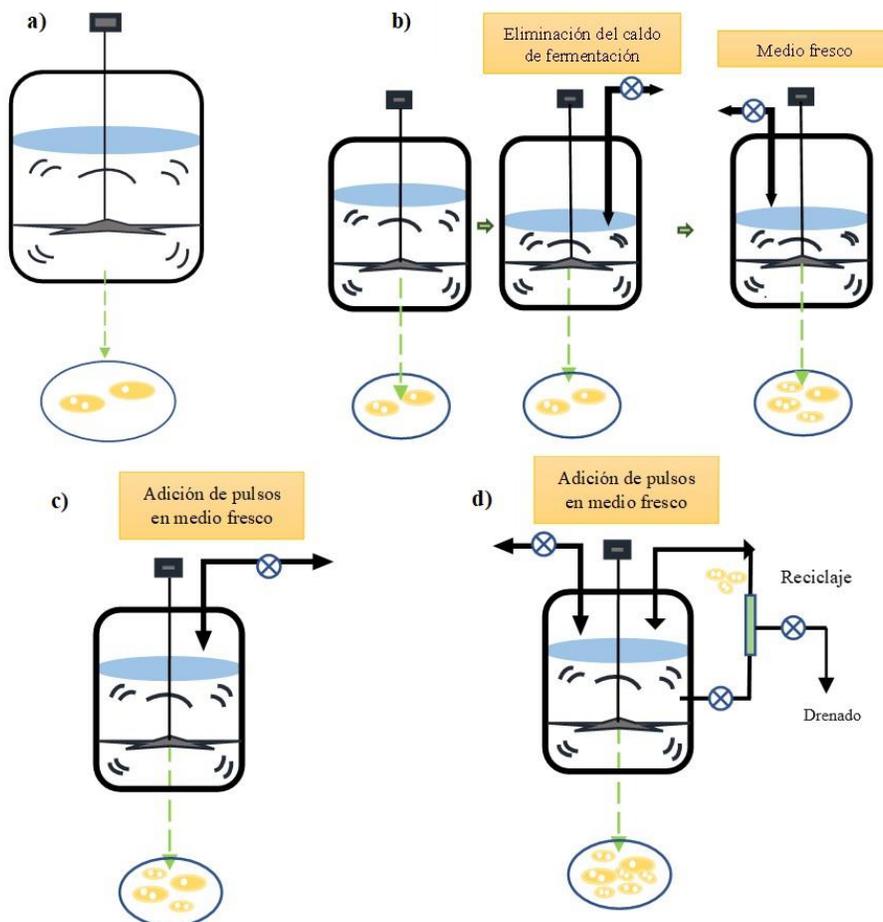


Figura 6. Esquemas descritos para la biosíntesis de PHB operados por procesos discontinuos, a) lote, b) lote repetido (alimentado), c) lote alimentado y d) lote alimentado con recirculación de células para incrementar la retención de biomasa (Koller, 2018b)

### Reactor discontinuo secuencial (SBR)

Los reactores SBR son una modificación del sistema de lodos activados, donde en un mismo sistema se llevan a cabo las etapas de reacción y sedimentación; alternando ciclos de mezcla, reacción y sedimentación, (Ramos Gómez, 2019).

Generalmente estos reactores cuentan con cuatro etapas que se llevan a cabo de manera secuencial: I) etapa de llenado (adición de sustrato al reactor), II) etapa de reacción (el reactor se

somete o no a aireación dependiendo del tratamiento), III) etapa de sedimentación (separación de sólidos para lograr un sobrenadante clarificado como efluente) y IV) etapa de vaciado (extracción del efluente clarificado del reactor) (Figura 7).

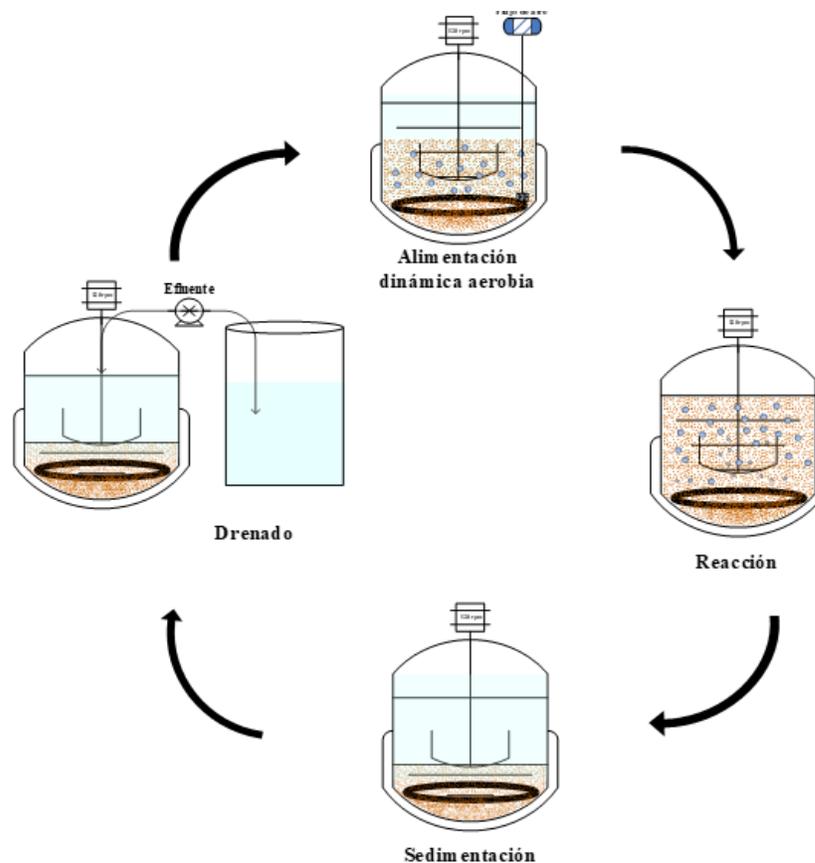


Figura 7. Reactor tipo SBR

Los reactores SBR han resultado ideales para la producción de PHB con cultivos mixtos, estos pueden ser operados en condiciones microaerofílicas/aerobias (Serafim et al., 2004b).

#### 1.7.4 Condiciones de operación para producción de PHB en reactores SBR

Como se mencionó en el apartado 2.4, la producción de PHA puede realizarse con cultivos puros o bien con cultivos mixtos, y la producción de PHB no es la excepción. A continuación, la estrategia utilizada para la producción de PHB con cultivos mixtos en reactores SBR.

La producción de PHB con cultivos mixtos se realiza en dos etapas. Etapa I, se utiliza un reactor SBR llamado de enriquecimiento selectivo y etapa II, reactor SBR llamado de cultivo o producción (Koller, 2018a).

El primer reactor se inocula con alta concentración de biomasa (sólidos volátiles) y se somete a ciclos para suministrar el sustrato (Dionisi et al., 2006a; Serafim et al., 2004b). Generalmente se opera mediante periodos de saciedad/ayuno, de esta manera la biomasa se adapta al medio y predominan aquellos microorganismos capaces de almacenar el PHB y sobrevivir durante los periodos de ausencia del sustrato. En el segundo reactor se selecciona la biomasa con la mayor capacidad para almacenar el PHB, la cual se transfiere a un reactor productor de PHB, donde la biomasa estará sometida a nuevas condiciones aumentando la concentración del sustrato alimentado, para llevar a la biomasa a un punto de saturación de acumulación intracelular de PHB (Casillas, 2007).

La productividad del polímero depende de las condiciones operativas del reactor, como la concentración de sustrato, carga orgánica, tipo de fuente de carbono, la relación carbono-nitrógeno (C/N), tiempo de residencia de sólidos (SRT), pH, relación saciedad/ayuno (S/A), concentración de oxígeno disuelto (OD) y temperatura (J. M. Dias et al., 2006).

**Carga orgánica:** Es el flujo másico de materia orgánica por unidad de volumen. Se expresa como velocidad de suministro al sistema (materia orgánica disuelta) con unidades de  $\text{kg DQO/m}^3 \text{ d}$  o  $\text{Kg DBO}_5/\text{m}^3 \text{ d}$  (Reyes-Lara & Reyes-Mazzoco, 2009). Con altas cargas se puede tener una concentración menor de sustrato en la descarga del tratamiento, si se opera con limitación en la aireación y con variaciones en la composición del sustrato. Los reactores SBR tienen la ventaja de poder operar con variaciones de cargas orgánicas (Santos et al., 2003). El aumento de la carga orgánica generalmente conduce a un crecimiento de biomasa, por lo tanto, podría mejorar la productividad de PHA. Dionisi et al., (2004) trabajaron en un SBR con ciclos saciedad/ayuno donde el aumento en la carga orgánica provocó que la concentración de biomasa aumentara, pero en cuanto a la tasa de producción de PHA disminuyó. Por lo tanto, al utilizar sustratos complejos como los lixiviados de la FORSU es necesario evaluar el efecto del incremento de la carga orgánica sobre la acumulación de PHB. Ya que se ha reportado que, al utilizar lixiviados de la FORSU, el incremento en la carga orgánica de 2.01 a 3.88  $\text{g DQO/L}\cdot\text{d}$  provocó una disminución en la acumulación de PHB. La máxima acumulación alcanzada fue de 6.49  $\text{g PHB/g peso-seco}$ , debido a que la capacidad respiratoria se vio afectada después de 38 días de operación (Sánchez Valencia et al., 2021).

Son escasos los trabajos que reportan la implementación de reactores de enriquecimiento para evaluar las eficiencias de eliminación de DQO y  $\text{NH}_4^+$ , principalmente porque se centran en la producción de PHB. Morgan-Sagastume et al. (2015) reportan que con una carga orgánica de 3.0 g DQO/L·d se alcanzaron eficiencias de eliminación de 24 y 60 % para  $\text{NH}_4^+$  y DQO, respectivamente; Bengtsson et al. (2017) aplicaron una carga orgánica de 1.8 g DQO/L·d y obtuvieron eficiencias de eliminación del 95 y 76 % para  $\text{NH}_4^+$  y DQO, respectivamente; Valentino et al. (2019) obtuvieron eficiencias de eliminación entre el 85-97 % para  $\text{NH}_4^+$ , y 86-92 % para DQO con una carga orgánica de 4 g DQO/L·d. Estos trabajos muestran la utilidad de los reactores de enriquecimiento para equilibrar las eficiencias de eliminación y enriquecer la biomasa con microorganismos productores de PHB.

**Relación C/N:** Es importante operar bajo limitación en el contenido de nitrógeno, ya que promueve la acumulación de PHB (Guleria et al., 2022), esto se logra aumentando la relación carbono/nitrógeno (C/N). Existe una correlación entre la síntesis de PHB y la presencia de altas concentraciones de NAD(P)H y acetil-CoA, y baja concentración de coenzima-A libre, esto siempre involucra un factor de limitación de crecimiento por limitación de la fuente nitrogenada (Quillaguamán et al., 2010). En cuanto al carbono cuando abunda va a beneficiar a la acumulación del biopolímero, aunque dependerá del microorganismo que se utilice. Gayosso-Sánchez et al., (2024) determinaron el efecto de la relación C/N en la producción de PHB y exopolisacáridos (EPS) con una cepa de *Enterobacter soli* y demostraron que hay una relación entre la relación C/N, biomasa y síntesis de PHB. Las concentraciones más altas tanto de biomasa como de PHB se obtuvieron con una relación C/N de 11, 200 mg/L y 30 mg/L, respectivamente. Mientras que con la relación C/N de 3, el PHB rondaba en los 13 mg/L y la biomasa en 140 mg/L.

Por otro lado Sánchez Valencia et al., (2021) evalúa distintas relaciones C/N en un cultivo mixto alimentado con lixiviados de la FORSU, (13.3, 23.2, 25.2, 38.1 y 42.1), a relaciones de 13.3 y 23.3 se promovió la acumulación PHB alcanzando un máximo de 16.8 g PHB/g peso-seco de biopolímero almacenado. Mientras que a relaciones C/N más altas provocó una reducción de la acumulación de PHB, 5.8 g PHB/g peso-seco para C/N de 42.1. Además, se observó la reducción de la actividad respiratoria del cultivo, de 2.458 a 0.244 mg  $\text{O}_2$ /g SSV·min. Esto se debe a los prolongados periodos de ayuno y a los compuestos orgánicos no biodegradables que contienen los lixiviados de la FORSU. En general, la producción de PHB se va a ver afectada cuando las

relaciones C/N no estén por debajo de 3 y por arriba de 30, esto dependerá de la capacidad del microorganismo si se está trabajando con un cultivo puro o consorcio microbiano, así como la relación saciedad/ayuno.

**Tiempo de residencia de sólidos (TRS):** Es un factor importante para la degradación de la materia orgánica (Valdovinos Lepine, 2018). Su definición es el tiempo medio que la biomasa permanece en el reactor, y se determina al dividir la cantidad de microorganismo totales en el reactor entre la cantidad de microorganismos que salen del sistema por unidad de tiempo, es uno de los parámetros de diseño y operación más importantes en reactores de lodos activados, ya que determina en gran parte la bioquímica del proceso y con los requerimientos energéticos asociados a la aireación y disponibilidad de nutrientes (Matos et al., 2021). El TRS, está estrechamente ligado a la competencia entre almacenamiento de PHB y crecimiento. El TRS regula teóricamente la edad de los macroorganismos, y se puede asumir que, cuando se alimenta C y N, a un TRS alto se logra una tasa de crecimiento específico, y por lo tanto, aumenta significativamente el almacenamiento de PHB (Matos et al., 2021). El TRS varía porque depende de varios factores como el sustrato, la carga orgánica y la temperatura (Vögeli, 2014). Se producen mayores rendimientos de PHB en TRS más largos cuando las células crecen más lentamente (promedio de  $\mu$  inferior a  $0.1 \text{ h}^{-1}$  para un TRS superior a 0.5 d).

**pH:** Este parámetro es importante en todos los procesos biológicos. El intervalo reportado para la producción de PHA es muy amplio va desde 4.5 a 9, sin embargo, para la producción de PHA a partir de AGV se requiere un intervalo de pH de 5 a 7. Esto debido a que los precursores para estos biopolímeros son el ácido butírico y el ácido valérico (HV) (Guleria et al., 2022). La mayoría de los estudios realizados con cultivos mixtos en condiciones de saciedad/ayuno, han manejado este intervalo de pH; sin embargo, a lo largo del ciclo de operación de un SBR, el pH aumenta durante la fase de saciedad y conforme va avanzando el ciclo este se estabiliza (J. M. L. Dias et al., 2006). Chua et al., (2003) utilizó acetato como sustrato para la producción de PHB, evidenciando que con un pH entre 8-9 se alcanzaba un rendimiento de 25-32%. Se puede observar que el intervalo de pH no es un parámetro determinante para la producción de PHB.

**Concentración de oxígeno disuelto (OD):** Es un parámetro que indica la concentración de oxígeno gaseoso ( $\text{O}_2$ ) disuelto en un medio acuoso ( $\text{mg O}_2/\text{L}$ ), o en proporción en el agua saturada ( $\%\text{O}_2$ ) (Valencia et al., 2015). El efecto de la concentración de OD en la producción de PHA fue

estudiado por Third et al., (2003), obteniendo un rendimiento de PHA sobre acetato de 0.49 g de PHA/g de sustrato, cuando el oxígeno era limitante, mientras que bajo condiciones de exceso de oxígeno el rendimiento fue de 0.34 g de PHA/g. Se realizó un modelo metabólico que demostró que a bajas concentraciones de OD, la disponibilidad de ATP es limitada e impedía un crecimiento significativo de la biomasa y que la mayor parte de ATP se usaba para el transporte de acetato al interior de la célula. Al contrario, las altas concentraciones de OD dieron un excedente de ATP y mayores tasas de crecimiento celular, lo que disminuyó el rendimiento de PHB (Dias et al., 2008).

**Estrategia Saciedad/Ayuno (S/A):** Se refiere a establecer periodos consecutivos de disponibilidad de sustrato (saciedad) y periodos de ausencia de sustrato (ayuno) (Serafim et al., 2004c). Estas condiciones hacen referencia a que, cuando hay un exceso de la fuente de carbono la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para su crecimiento y para acumulación de polímero, y cuando el sustrato se agota, puede utilizar el polímero acumulado como fuente de energía y carbono. La figura 9 muestra un diagrama del proceso de S/A, donde se puede apreciar claramente que durante la etapa de saciedad el sustrato está siendo utilizado simultáneamente con el oxígeno, al mismo tiempo se produce PHB. Una vez agotado el sustrato se registra un incremento en la concentración de oxígeno, indicativo de que concluyó la etapa de saciedad e inició la etapa de ayuno, Este comportamiento se presenta durante cada ciclo de operación de los reactores.

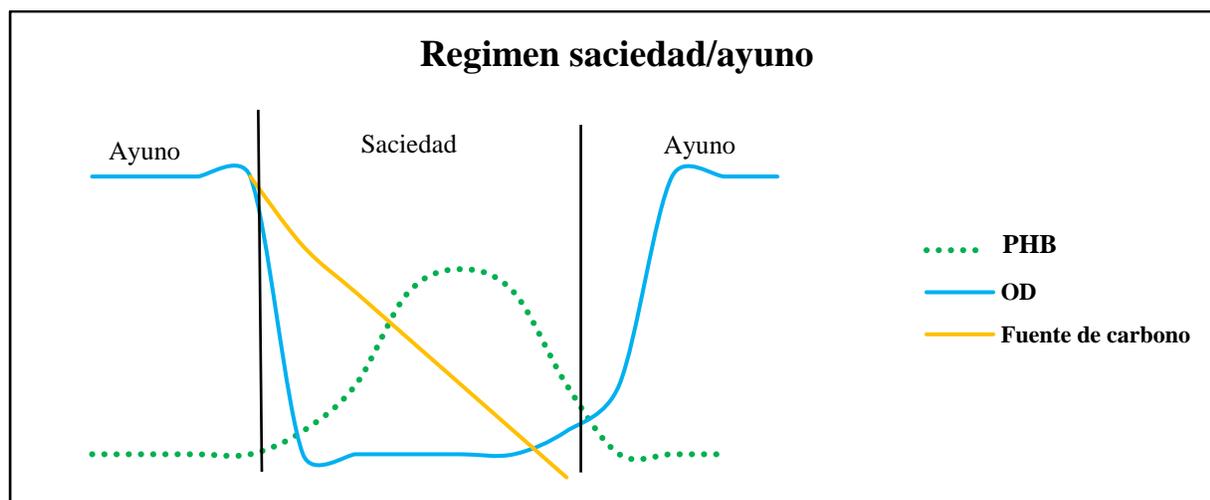


Figura 8: Alimentación Dinámica Aerobia imagen adaptada de Serafim, 2006

Bajo la estrategia de S/A en periodos consecutivos, en la fase de saciedad entre un 66%-100% del sustrato es consumido para el almacenamiento y el restante usado para crecimiento y

mantenimiento, siendo mayor el crecimiento en la etapa de saciedad (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004a). Las etapas de S/A son determinadas a partir del OD, debido a la relación entre la concentración del sustrato presente en el reactor y el comportamiento del OD. El aplicar la alimentación dinámica aerobia (ADA) y en conjunto con la estrategia S/A en los ciclos de operación, permite la selección aquellos microorganismos capaces de acumular PHA (Kourmentza et al., 2017). La relación S/A reportada por algunos autores para la acumulación de PHA es de 0.03-0.15 (h/h) (Morgan-Sagastume et al., 2019b; Colombo et al., 2017a).

**Temperatura:** Es una variable que involucra al metabolismo microbiano para la producción del biopolímero. La mayoría de las investigaciones trabajan con temperaturas de 30 °C, aunque existen reportes donde han trabajado con 22 °C y 37 °C (Gómez Cardozo, 2013). Se investigó el efecto de la temperatura en la síntesis de PHB en la cepa de *B. cereus* en el rango de 20 a 45 °C, se obtuvo un contenido de PHB de 1.1 g/L y 33.17 g PHB/g peso-seco a una temperatura de 37 °C. Mientras que a temperaturas más altas se retardo el crecimiento y la síntesis de PHB. Se ha reportado que los dominios de Arqueas y bacteria que acumulan PHB en ambientes con pH severo y temperaturas extremas. Como lo son los extremófilos, tienen el potencial de hacer que el proceso sea más viable, reduciendo costos de producción, ya que no tienen que estar a condiciones específicas.

Dionisi et al., (2006a) evaluaron el efecto de la temperatura sobre la producción de PHB, reportan que cuando hubo un aumento de 15 a 35 °C condujo a una disminución del rendimiento de PHB sobre el acetato de 0.43 a 0.072 g PHA/g de sustrato y disminuyó la productividad específica de 0.12 a 0.060 g PHA/g de célula del peso seco/h. Aunque las bajas temperaturas (15-20 °C) permiten que el proceso sea menos costoso a través del ahorro de energía, además de favorecer al aumento de la productividad volumétrica de PHA (Guleria et al., 2022).

### **1.8 Enriquecimiento de biomasa productora de PHB**

Como se mencionó previamente, el uso de CM representa una alternativa para reducir los costos de producción, sin embargo, es necesario llevar a cabo como etapa inicial un enriquecimiento o selección de microorganismos capaces de acumular PHB. La operación periódica discontinua o en modo secuencial por lotes, así como la estrategia saciedad/ayuno, la limitación de nutrientes y oxígeno, son parámetros que en conjunto ayudan al enriquecimiento de microorganismos acumuladores de PHB.

Los sistemas diseñados para la producción de PHB con CM generalmente se realizan en dos etapas. En la primera, de enriquecimiento selectivo, los reactores SBR han resultado una buena alternativa, estos son inoculados con una concentración de biomasa (Serafim et al., 2004b). El enriquecimiento se puede llevar a cabo con medios sintéticos ricos en AGV o bien algún residuo prefermentado. Bajo una estrategia de saciedad/ayuno se establece una selección natural de los microorganismos capaces de acumular PHB. La segunda etapa es la producción, en la cual se transfiere la biomasa generada en el primer reactor, al reactor de producción, con nuevas condiciones de operación (tiempo de sedimentación, alimentación, carga orgánica, y TRC) para la maximización de la síntesis de PHB. En este reactor se puede utilizar la misma fuente de carbono u otra distinta (Dionisi et al., 2004; Korkakaki et al., 2016b).

### **1.9 Residuos agroindustriales como sustrato para la producción de PHB**

Los residuos agroindustriales son un problema para el medio ambiente, las industrias contribuyen con un volumen importante de desecho, principalmente es el sector alimenticio. El principal uso que se le da a estos residuos es como alimento para ganado, sin que esto resuelva el problema ya que la generación de residuos llega a ser mayor que la demanda de alimento. Surge una alternativa para que estos sean usados en procesos biotecnológicos, debido a su bajo costo y su composición nutricional. Pueden ser utilizados como fuente de carbono, nitrógeno y minerales, para el crecimiento de microorganismos y para la producción de compuestos de alto valor agregado (Diez & Sandoval, 2012). Cabe destacar que algunos residuos agroindustriales están constituidos por matrices poliméricas complejas como la lignina, por eso es necesario realizar pretratamientos químicos o mecánicos antes de utilizarlos como sustrato. Los pretratamientos térmicos, la hidrólisis química y la reducción del tamaño de partícula se utilizan para incrementar la biodisponibilidad de los nutrientes para permitir un crecimiento adecuado. Muchos de los desechos que son ocupados como sustratos para la producción de bioplásticos de PHB, tienen nutrientes limitados y es posible que tengan que suplementarse para permitir el crecimiento suficiente de las bacterias que acumulan el PHB (Manpreet et al., 2005).

Entre los residuos que se han investigado para la producción de PHB se encuentran aguas residuales de diferentes industrias, como son aguas residuales de la industria láctea, biodiesel, cervecera, papelera, azucarera, alimentos, municipales, entre otras (Colombo et al., 2017b; Valentino et al., 2017). También se ocupan aceites residuales como coco, soya, maíz, etc. (Kaur et al., 2021). La mayoría de estos residuos requieren una prefermentación para la conversión de la

fuentes de carbono en ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales son una de los sustratos principales en la ruta de síntesis de PHB (Colombo et al., 2017b).

Se han reportado rendimientos de acumulación de PHB similares a los obtenidos con cultivos puros, particularmente utilizando aguas industriales prefermentadas de la industria papelera, de la industria de dulces y melazas (Albuquerque et al., 2010b) y lixiviados de residuos orgánicos (Korkakaki et al., 2016b), obteniendo rendimientos de PHA entre 50-80% de peso celular. Sin embargo, al utilizar efluentes más complejos, los rendimientos se ven reducidos, de tal forma que la composición del sustrato es un factor importante en el proceso de síntesis de PHB (Kaur et al., 2021; Korkakaki et al., 2016b).

Kahar et al. (2004) reporta la obtención del 72-76 g PHB/g peso-seco intracelular, en FML utilizando biorreactores en lote con residuos de aceite de soya suplementado con un medio mínimo de sales, y utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Yan et al., (2006) evaluaron el uso de los lodos activados como inóculo, y como fuente de carbono acetato y glucosa, y diferentes aguas residuales de plantas de tratamiento, como de la fabricación de queso, almidón, municipales y del papel, para la síntesis de PHA. El experimento se realizó en matraces agitados, los resultados arrojaron que en las aguas residuales de industria del papel fue con las que más PHA se acumuló, 43 g PHB/g peso-seco.

Bengtsson et al., (2008) llevaron a cabo la síntesis de PHA con lodos activados utilizando como sustrato el efluente de un molino de papel. Se realizó en tres etapas: la primera una fermentación acidogénica para convertir la materia orgánica del agua residual a AGV. La segunda etapa incluía operar un reactor inoculado con lodos activados y alimentado con el prefermentado, bajo condiciones de saciedad/ayuno para enriquecer a las bacterias capaces de acumular PHA. Y finalmente la etapa de producción, la cual se llevó a cabo en reactores en lote. El contenido máximo producido de PHA fue de 48 g PHA/g peso-seco.

Albuquerque et al., (2010) utilizó un cultivo mixto microbiano y como sustrato melaza de azúcar prefermentada, analizó el efecto de la concentración del sustrato en el enriquecimiento del cultivo para la producción de PHA. La concentración de sustrato que se utilizó fue de 30 a 60 mmol AGV/L. Con la concentración de 60 mmol AGV/L, se observó una limitación de crecimiento debido a la deficiencia de micronutrientes destacando al magnesio y fósforo. La limitación del

fosforo provocó el aumento de la concentración de biomasa, pero en cuanto la duración del ayuno tuvo un impacto en la selección de microorganismos productores de PHB. La concentración de 45 mmol AGV/L mostro ser la adecuada para sintetizar el PHA porque ni la concentración de sustrato ni la relación saciedad/ayuno fueron factores limitantes, alcanzando un contenido máximo del 74.6 g PHB/g peso-seco.

Recientemente, se han buscado sustratos alternativos para producir PHA, destacando los lixiviados del composteo de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU). Estos lixiviados tienen un alto contenido de materia orgánica y relaciones C/N altas, lo que favorece la síntesis de PHA. Trabajos previos reportan que se lleva a cabo de manera natural a través de dos vías: en la primera, los microorganismos que se encuentran en este lixiviado maximizan el PHA dentro de la biomasa enriquecida, y en la segunda se utiliza la misma fuente cuando hay escases de nutrientes (Guleria et al., 2022). Valentino et al., (2019) realizo la producción de PHA en reactores de lote alimentado a escala piloto, utilizando lixiviados de FORSU y un cultivo mixto como inóculo. Se logró una acumulación de 46 g PHA/g peso-seco. Se hizo un análisis desde una perspectiva a gran escala, tomando en cuenta los flujos másicos en cada paso del proceso, dando un rendimiento global de 65 g de PHA/kg de SVT. Sánchez Valencia et al., (2021) estudio la producción de PHA a partir de lixiviados de composteo de desechos orgánicos con un cultivo mixto. El enriquecimiento de la biomasa se dio en 30 días y alcanzo una acumulación máxima de 16.8%, a partir del enriquecimiento se analizó la relación C/N sobre la acumulación de PHB.

Por lo tanto, se propone utilizar residuos esto ayudara a compensar el costo de producción de los los PHA. Los lixiviados de la FORSU, hacen que sea un sustrato potencial para la producción de PHA por su alto contenido de AGV (16-25 g AGV/L) (Castilla-Hernández et al., 2016). Además, son otra alternativa viable para la producción de PHA, los cuales se pueden obtener durante el composteo y la digestión aerobia de residuos orgánicos (Cárdenas Medina, 2013) . El utilizar los lixiviados de la FORSU para la síntesis de PHA y otros productos de valor agregado es una forma de innovar y recuperar la energía total.

# **Capítulo II. Planteamiento del problema**

### 2.1. Justificación

Una de las propiedades del plástico que ha resultado en su éxito como material altamente útil, es su durabilidad y versatilidad de aplicaciones. Actualmente, la producción de plásticos supera los 348 millones de toneladas al año y se estima que el 50% es de un solo uso (Shen et al., 2020). La producción masiva de plásticos, aunada a su persistencia en el ambiente, es una de las causas de la crisis medioambiental a la que nos enfrentamos hoy en día. Esta gran acumulación en el medio ambiente no solo presenta problemas de desestabilización de los ecosistemas sino también problemas de salud.

Debido a esto se han explorado nuevas alternativas para sustituir los plásticos por materiales sostenibles, que compartan propiedades similares a los derivados del petróleo, pero que sean de fácil degradación. Los materiales que comparten estas similitudes son los bioplásticos en particular los PHA. Usualmente el proceso de síntesis de estos biopolímeros involucra cepas puras, así como medios sintéticos, haciendo que el proceso sea costoso, El uso de cultivos mixtos y residuos agroindustriales como sustratos son una alternativa viable para la producción de PHA, ya que es posible disminuir el costo de producción entre el 30-40% (Kourmentza et. al 2015). Se han utilizado una gran variedad de residuos agroindustriales para la producción de PHA, como son: melazas, licor de estiércol, aguas residuales, entre otros; sin embargo, estos residuos requieren una prefermentación para transformar la materia orgánica en moléculas fácilmente biodegradables como lo son los ácidos grasos volátiles, los cuales son los intermediarios para la producción de PHA. Los lixiviados generados durante el composteo de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU), presentan unas características que los hace ideales para la síntesis de PHA; ya que tienen un alto contenido de carbono soluble fermentado, principalmente ácidos grasos volátiles (AGV) (Castilla-Hernández et al. 2016), lo cual los convierte en una fuente ideal para la producción de PHA.

La estrategia de enriquecimiento de microorganismos acumuladores de PHA más prometedora es someter a los CM a periodos consecutivos de sustrato (saciedad) y periodos de ausencia de sustrato (ayuno) (relación S/A). Bajo estas condiciones, se establece un exceso de la fuente de carbono (saciedad), durante la cual la biomasa utiliza el sustrato simultáneamente para crecer y acumular el biopolímero, cuando el sustrato se agota (ayuno) la biomasa puede utilizar el biopolímero almacenado como fuente de energía. Esta estrategia ayuda a que la biomasa alcance una adaptación fisiológica y que predominen aquellos microorganismos capaces de almacenar

PHA y sobrevivir a los periodos de ayuno (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004b). La literatura reporta un gran intervalo de relaciones S/A para el enriquecimiento de biomasa productora de PHA, de 0.03 a 1.5, usando residuos agroindustriales. Este intervalo depende de diversos factores como son: reactor usado, carga orgánica, tipo de residuo agroindustrial, ciclo de operación, TRH, TRS, pH, temperatura etc. A pesar de que existe un valor reportado como óptimo de la relación saciedad/ayuno (0.03-0.15) (Morgan-Sagastume et al., 2019b; Colombo et al., 2017a) cada residuo agroindustrial tienen sus particularidades.

Por lo antes expuesto, en este estudio se busca evaluar el efecto de distintas relaciones S/A sobre la aclimatación de MC acumuladora de PHB usando lixiviados de la FORSU.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1 General**

Evaluar el efecto de la relación saciedad/ayuno en el enriquecimiento de biomasa suspendida productora de Polihidroxi butirato en un SBR a escala laboratorio, usando un cultivo mixto como inóculo y lixiviados de la FORSU de la planta de composteo de Bordo Poniente como sustrato.

### **2.2.2 Específicos**

- Definir las condiciones operacionales de un reactor SBR con biomasa suspendida que permitan enriquecer biomasa acumuladora de PHB.
- Operar un reactor SBR para evaluar la relación saciedad/ayuno para la incrementar el rendimiento de producción de PHB utilizando el cultivo mixto enriquecido como inóculo.

### **2.2.3 Hipótesis**

La aplicación de la estrategia de saciedad/ayuno favorecerá la acumulación de PHA utilizando lixiviados de la FORSU como sustrato y un cultivo mixto enriquecido como inóculo.



# **Capítulo III. Metodología y desarrollo experimental**

### 3.1 Materiales y métodos

En la presente tesis se llevó a cabo la operación de dos reactores SBR inoculados con un cultivo mixto, para enriquecer biomasa acumuladora de PHA, usando como fuente de carbono lixiviados de la FORSU. El diseño experimental se muestra en la figura 9 y 10.

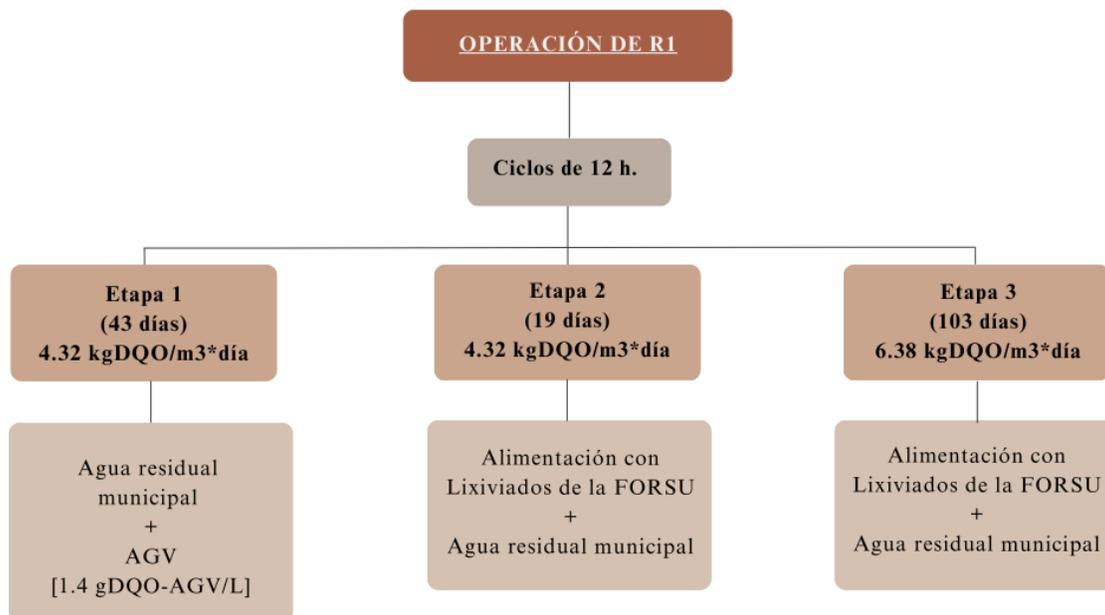


Figura 9. Diseño Experimental del primer SBR

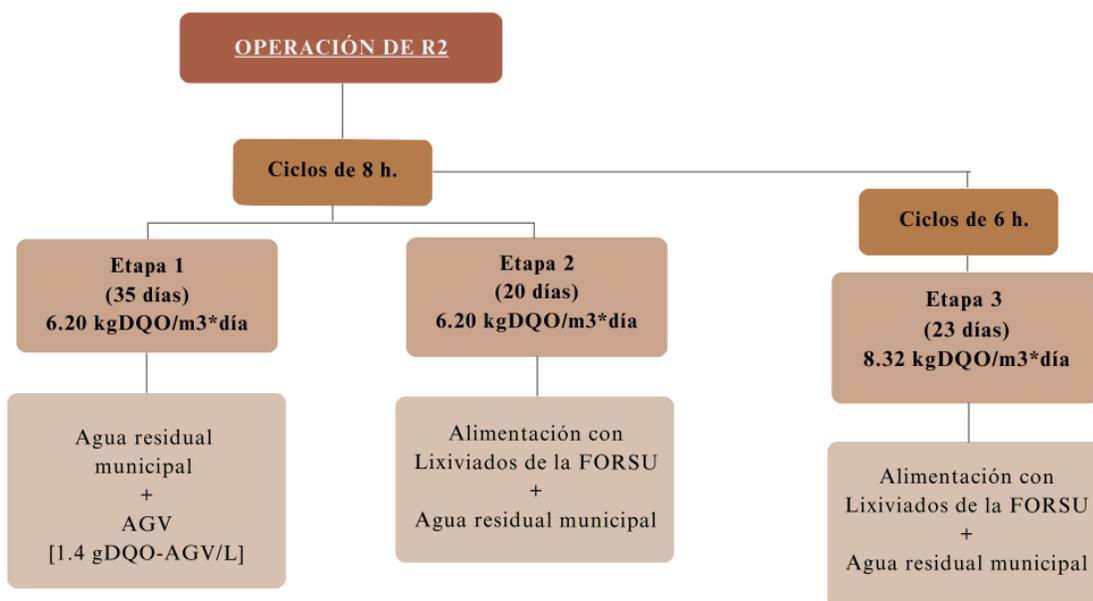


Figura 10. Diseño Experimental del segundo SBR

### 3.1.1 Reactor de lote secuencial (SBR) para el enriquecimiento de biomasa productora de PHB

Para el enriquecimiento de biomasa productora de PHB se utilizaron dos reactores SBR de cristal con un volumen útil de 1 L. El reactor 1 (R1) operó con ciclos de 12 h de duración por 165 días, mientras que el reactor 2 (R2) operó durante 55 días a un ciclo de 8 h y después se modificó el ciclo a 6 h con una duración de 23 días (Figura 11). En ambos reactores se suministró una aireación constante de 3 mL/min mediante un compresor (VIVOSUN 950) acoplado a un rotámetro. El compresor se conectó a un difusor flexible instalado al fondo del reactor y funcionando como agitador. Cada ciclo tuvo un volumen de intercambio del 25% y se mantuvo a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C). Los ciclos fueron controlados con controladores de tiempo programables (TEMP-08E, Steren). Cada ciclo operativo incluyó una fase de Alimentación Dinámica Aerobia (ADA), seguida por una etapa de reacción, sedimentación y drenado (Figura 10).

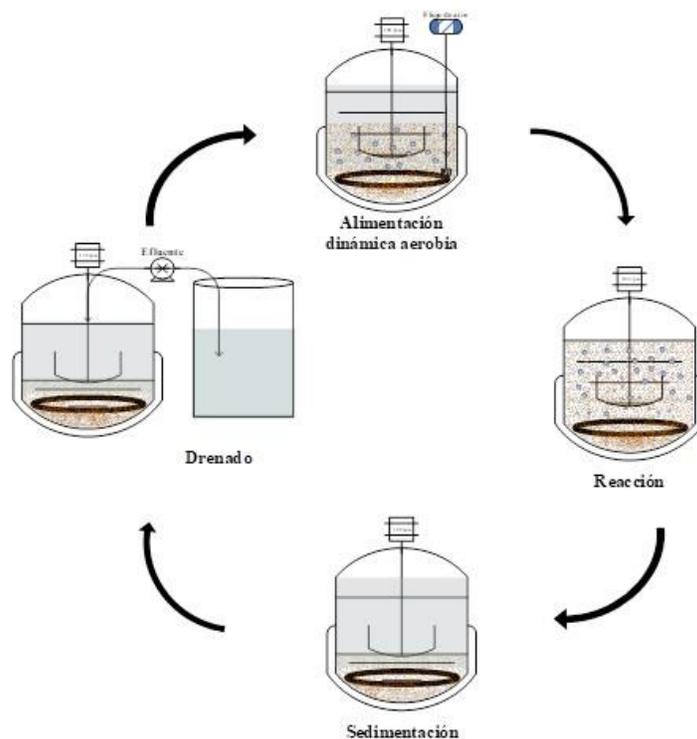


Figura 11. Ciclos de operación de los reactores SBR

### 3.1.2 Inóculo

El inóculo consistió en una muestra de lodos activados tomado del sedimentador secundario de la “Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Cerro de la Estrella” ubicada en la Alcaldía Iztapalapa. A este lodo se le cuantificó el contenido de sólidos volátiles, sólidos totales y sólidos fijos (APHA, 2017). Posteriormente, se realizó la inoculación de los reactores de enriquecimiento con 800 mL de lodos activados, resultando en una concentración para R1 de 8.0 g SSV/L y R2 de 8.5 g SSV/L.

Se realizó la identificación de PHB por microscopia con el uso de azul de Nilo para determinar los microorganismos acumuladores de PHB.

### 3.1.3 Muestreo de agua residual y lixiviados

Se realizaron 4 muestreos de agua residual de la “Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Cerro de la Estrella” ubicada en la Alcaldía Iztapalapa, la cual fue utilizada como medio de alimentación para R1 y R2. Las muestras fueron caracterizadas analizando los parámetros: pH,  $\text{NH}_4^+$ , DQOt y DQOs, AGV, conductividad, salinidad y TDS.

Así mismo, se realizaron tres muestreos de lixiviado en los meses de mayo, octubre del 2022 y febrero del 2023; en la planta de composteo de “Bordo Poniente”, ubicada en el Estado de México. Para el muestreo se obtuvieron muestras representativas de la fracción líquida generada en las pilas de FORSU, las muestras obtenidas fueron congeladas y filtradas hasta su caracterización (pH,  $\text{NH}_4^+$ , DQOt y DQOs, AGV, conductividad, salinidad y TDS).

### 3.1.4 Alimentación

Para la adaptación ambos reactores, la alimentación utilizada consistió en agua residual municipal suplementada con una mezcla de AGV (ARM + AGV) (Tabla 7). Se preparo un lixiviado sintético, simulando el lixiviado de la FORSU. La aclimatación del cultivo mixto con ARM+AGV es crucial por muchas razones, una de ellas es el funcionamiento del reactor y la eficiencia del tratamiento. La adaptación de biomasa en el SBR se trabajó por ciclos de alimentación, reacción, sedimentación y extracción, la mezcla de ARM+AGV ayudó a que la biomasa se adaptará a los ciclos de operación. Esto facilitó a que hubiera una comunidad estable y eficaz de microorganismos, antes de exponerlos a la variabilidad y posible toxicidad del lixiviado de la FORSU (Marang et al., 2013).

Tabla 7. Composición de la mezcla de AGV

Porcentaje de cada AGV en el medio sintético	Concentración en mg/L	Concentración equivalente en mg DQO/L
HA: 19%	196.16	263.70
HP: 22 %	325.70	307.45
HB: 21%	143.04	291.70
HV: 38%	293.88	558.99
		DQO Total = 1,421.84

Ácido acético (HA): Ácido Propiónico (HP): ácido Butírico (HB): Ácido Valérico (HV)

Una vez detectada la presencia de bacterias acumuladoras de PHB por medio de la técnica de microscopía de fluorescencia (positivo a tinción azul Nilo), se cambió la alimentación por lixiviado de la FORSU diluido con agua residual municipal (ARM+LIX). La tabla 8 muestra las condiciones de operación de ambos reactores.

En este estudio, se utilizaron dos reactores SBR, para evaluar como la carga orgánica influye en la producción de PHB bajo la relación S/A y operando a diferentes ciclos. El primer reactor opero en un ciclo de 12 horas con dos cargas orgánicas, donde se analizó las variaciones de las cargas orgánicas impactaron en la acumulación de PHA en función de las relación S/A. Con base a los resultados obtenidos en R1 se optó por implementar un reducción de los ciclos, para la etapa uno y dos de 8 h y para la etapa 3 de 6 horas (Tabla 8). Este ajuste nos permitió evaluar si una reducción en el tiempo de ciclo optimizaba la producción de PHA y ver la influencia de estos factores .

Tabla 8. Condiciones de operación del SBR

Reactor	Inóculo (gSSV/L)	Etapas	Tiempo de operación (días)	Carga	Ciclo (h)	Distribución del ciclo (min)
R1	8.5	1 (Aclimatación) ARM + AGV	43	4.32 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día	12	ADA: 5 Reacción: 680 Sedimentación: 30 Drenado: 5
		2 ARM + LIX	19	4.32 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día		
		3 ARM + LIX	103	6.38 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día		
R2	8.0	1 (Aclimatación) ARM + AGV	35	6.20 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día	8	ADA: 5 Reacción: 440 Sedimentación: 30 Drenado: 5
		2 ARM + LIX	20	6.20 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día		
		3 ARM + LIX	23	8.32 kg DQOs/m <sup>3</sup> ·día	6	ADA: 5 Reacción: 320 Sedimentación: 30 Drenado: 5

### 3.2 Configuración de los ciclos de operación de los reactores SBR

Para el desarrollo de esta tesis se operaron dos reactores SBR, a continuación, se describen las condiciones de operación de cada uno.

#### Reactor 1 (R1)

La operación de R1 se llevó a cabo en tres etapas y se evaluaron diferentes parámetros fisicoquímicos. En la Etapa I, se realizó la aclimatación del lodo, este se alimentó con agua residual suplementada con AGV, a una carga de 4.32 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día y un ciclo de 12 h. Bajo estas condiciones se realizaron dos cinéticas de consumo de DQOs, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y de oxígeno disuelto (OD) a los 27 y 37 días de operación. El tiempo de operación en esta etapa fue de 43 días. Posteriormente, para la etapa 2, se cambió la alimentación por lixiviado diluido con agua residual, con la finalidad de minimizar el efecto por el cambio de sustrato, se alimentó a la misma carga de 4.32 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. Durante esta etapa se realizaron dos cinéticas (DQOs, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y OD) en los 43 y 63 días de operación, respectivamente, con ellas se determinó la relación S/A. Finalmente, en la etapa 3 se incrementó la carga a 6.38 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. Durante esta etapa, se monitoreo el OD para determinar la relación S/A en estas condiciones. El tiempo de operación del reactor en las dos últimas etapas fue de 122 días.

#### Reactor 2 (R2)

La operación del R2 consistió también en tres etapas. Para el arranque del reactor, etapa 1, se procedió de la misma forma como se realizó en R1, modificando únicamente el tiempo del ciclo de operación a 8 h. Bajo dichas condiciones el reactor opero durante 35 días, se realizó una cinética a los 10 días de operación, debido a que el enriquecimiento se logró en menos tiempo y se confirmó mediante las observaciones realizadas con la técnica de microscopía de fluorescencia. A partir de la etapa 2, se cambió la alimentación por lixiviado diluido con agua residual municipal, con una carga inicial de 6.20 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. Se determinó la relación S/A mediante una cinética, a los 38 días. En la Etapa 3, se redujo el tiempo del ciclo a 6 h, manteniendo el resto de las condiciones de operación. A los 66 días de operación se realizó la última cinética para determinar la relación S/A.

### 3.3 Técnicas analíticas

Para el desarrollo de esta tesis se realizaron las técnicas analíticas reportadas en la tabla 9, para el monitoreo de los reactores, caracterización de agua residual, lixiviados y cinéticas.

Tabla 9. Técnicas analíticas

Muestra	Parámetro Analizado	Referencia
Lodo	SST, SSF y SSV	(APHA, 2017)
	Microscopia de fluorescencia	(Cardona Echavarría et al., 2013).
Agua Residual	DQOt, DQOs	(APHA, 2017)
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(Campuzano Angeles, 2015)
	AGV	
	Conductividad, Temperatura, Salinidad y TDS	
Lixiviado	SST, SSF y SSV	(APHA, 2017)
	DQOt, DQOs	(APHA, 2017)
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(Campuzano Angeles, 2015)
	AGV	
Cinéticas	DQOs	(APHA, 2017)
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
	OD	
	SSV	

A continuación, se describen brevemente las técnicas analíticas usadas en esta tesis.

### **Conductividad, Temperatura, Salinidad, Sólidos Disueltos Totales (SDT) y Oxígeno Disuelto (OD)**

Las mediciones de los parámetros de conductividad, temperatura, SDT y OD fueron medidos con el multiparámetro portátil (WTW MultiLine® Multi 3430 IDS); con un electrodo TETRACON 925 WTW y un electrodo FDO 925, respectivamente (APHA, 2017).

### **pH**

Se monitoreo el pH del reactor mediante un potenciómetro Thermo Scientific (modelo ORION STAR A215) y el electrodo ORION (8157BDNUMD).

### **DQOt y DQOs**

Se realizó la determinación del contenido de materia orgánica en los lixiviados, influente y efluente del reactor por medio de la técnica de reflujó cerrado, cuantificando la DQO como la cantidad de oxígeno equivalente para oxidar completamente la materia orgánica contenida en la muestra (APHA, 2017). (Anexos).

### **Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

Esta determinación está basada en la reacción de hipoclorito de sodio en presencia de fenol, formando primero, monocloramina la cual, en presencia de una solución de nitroprusiato de sodio, se transforma en un compuesto de azul de indofenol a un pH mayor de 9.6, el cual tiene su máxima absorbancia a 640 nm (APHA, 2017). Los análisis se realizaron para el influente y efluente del reactor SBR, así como para la caracterización del lixiviado. (Anexos).

### **Sólidos Totales, Fijos y Volátiles**

El contenido de sólidos totales en las muestras de lixiviado, influente, efluente y reactor fueron analizadas por el método gravimétrico (APHA, 2017). Los sólidos totales están compuestos de material suspendido, sedimentable, coloidal y disuelto.

Los sólidos totales (SST) es la expresión que se aplica a la cantidad de materia que permanece como residuo después de la evaporación de la muestra a una temperatura de 103-105 °C, mientras que los sólidos fijos (SSF) es el residuo obtenido después de la calcinación a 550 °C donde se encuentra el contenido mineral, y los volátiles (SSV) son la diferencia entre los totales y fijos. (Anexos)

### **Ácidos Grasos Volátiles (AGV)**

La determinación de AGV se realizó para el lixiviado, influente y efluente del reactor por medio de cromatografía de gases en un equipo Agilent Technologies 7820A, Shanghai, con una columna Agilent J&W DB-FFAP, las condiciones de trabajo se muestran en los Anexos.

### **Identificación de PHB por microscopia**

La naturaleza lipídica de las bacterias productoras de PHB se puede identificar con el uso colorantes lipofílicos como el negro Sudán, el rojo Nilo y el azul de Nilo, siendo el colorante más empleado es este último (Cardona Echavarría et al., 2013). Se determinó la presencia de PHB por microscopia óptica tiñendo las células con azul de Nilo II.

Azul Nilo: se preparó una solución al 1 % de agua destilada y se filtró usando un filtro de 0.2 µm, para la tinción se utilizó una dilución de 1:25. Las células se fijaron a un portaobjetos durante 15 minutos a 50 °C, se tiñeron con el colorante y se dejaron reposar 15 minutos. Posteriormente se lavó el exceso de colorante con HA al 8%.

Se observaron las muestras en un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS (modelo U-PMTVC), a una longitud de onda de 460 nm, equipado con una cámara AXION Cam ERC5S. Se utilizó un filtro Cian que emitía fluorescencia en una longitud de onda entre los 440-490 nm y el aumento de la lente del microscopio fue de 100x. Se realizó la captura de imágenes mediante el software Image-Pro-6.3 Plus (Media Cybernetics, Maryland Estados Unidos).

### **Cuantificación de PHB por gravimetría**

El contenido de PHB se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Gómez Cardozo, (2013). Para determinar el contenido de PHB en peso seco, la biomasa se seca a 105 °C, posteriormente se le agrega cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) al 99% v/v e hipoclorito de sodio (NaClO) al 4.5% p/v a la biomasa seca (1 mL de cada reactivo por cada 20 mg de biomasa). Posteriormente las muestras se incuban a 200 rpm durante de 2 h 30 min. a 30 °C; pasando el tiempo se centrifugan durante 15 min a 6000 rpm, como resultado se obtienen 2 fases, la fase orgánica (cloroformo) que contiene el biopolímero fue separada por decantación y la fase inorgánica conformada principalmente por el (hipoclorito) residual. Posteriormente se transfiere la fase orgánica a vasos de precipitados previamente pesados y se le adiciones gotas de metanol (95% v/v) hasta observar que se obtiene un precipitado, después la mezcla se mantiene en reposo a 4 °C durante 24 horas. Pasado el tiempo se adicionan gotas de metanol y se coloca a baño maría y la muestra se evapora a 60 °C, teniendo cuidado de no quemar el polímero y se realizaron 3 lavados con metanol. Finalmente se pesa el recipiente de PHB y realizar una diferencia de pesos para obtener el peso seco de PHB.

### **Variables de respuesta**

Ambos reactores fueron evaluados mediante el cálculo de variables de respuesta tales como: eficiencia de eliminación de DQO ( $E_{DQO} (\%) = [(mg/L \text{ DQO inicial} - mg/L \text{ DQO final}) / mg/L \text{ DQO inicial}] * 100$ ), velocidades volumétricas de consumo de sustratos ( $q_{rs} = mg \text{ de DQOs}/L \cdot d$ ). Eficiencia de eliminación  $NH_4^+$  ( $E_{NH_4^+} (\%) = [(mg/L \text{ } NH_4^+ \text{ inicial} - mg/L \text{ } NH_4^+ \text{ final}) / mg/L \text{ } NH_4^+ \text{ inicial}] * 100$ ), velocidades volumétricas de consumo de sustratos ( $q_{rs} = mg \text{ de } NH_4^+/L \cdot d$ ).

### **Perfiles cinéticos**

Se realizaron perfiles cinéticos para ambos reactores. La primera cinética se realizó para evaluar las condiciones iniciales de la biomasa enriquecida. Las cinéticas tuvieron una duración de 6 h (365 minutos), y la toma de las muestras se realizó al inicio de la fase de alimentación. Durante

este periodo, se recolectaron muestras de 10 mL, las cuales fueron sometidas a centrifugación para su posterior análisis. Se evaluaron los siguientes parámetros el consumo: AGV, DQOs,  $\text{NH}_4^+$  y OD (oxígeno disuelto). La actividad de la degradación se determinó mediante las velocidades de consumo de sustrato ( $r_s$ ) y de oxígeno ( $r_{O_2}$ ). Las distintas  $r_s$  se calcularon a partir de los perfiles cinéticos de consumo de DQOs y  $\text{NH}_4^+$ . La tasa de consumo de oxígeno (OUR) se determinó a partir de la máxima pendiente, producida por el consumo de DQO durante la fase de saciedad. La tasa de consumo específico de oxígeno (SOUR) se calculó dividiendo la OUR entre la concentración de biomasa que se encuentra en el reactor (g SSV/L). Además, se realizaron las determinaciones de la constante de primer orden (Ec. 1) y ecuación linealizada (Ec. 2):

$$Ct = C_0 * e^{-[k*t]} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\ln \left( \frac{C_0}{C} \right) = k * t \quad \text{Ecuación 2}$$

#### **Cálculo de la relación saciedad/ayuno**

La relación S/A se define como la relación entre el tiempo de saciedad y el tiempo total del ciclo, por lo tanto, las unidades están en h/h. LA terminación de la etapa de saciedad y el inicio de la etapa de ayuno se determinó en función del aumento rápido en la concentración de OD.

$$S/A = \frac{t_{\text{Saciedad}}}{t_{\text{Ciclo}}}$$

Donde:

$t_{\text{Saciedad}}$ : tiempo en el que el sustrato está disponible en el SBR para la acumulación de PHA

$t_{\text{Ciclo}}$ : tiempo total del ciclo de operación

# **Capítulo IV.**

## **Resultados y Discusión**

#### 4.1 Caracterización del Inóculo

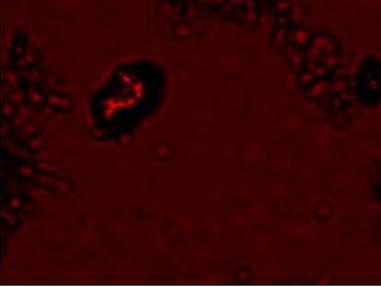
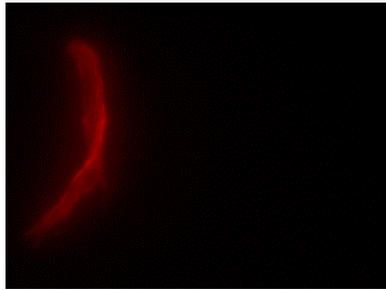
El inóculo utilizado fue un lodo activado aerobio proveniente del sedimentador de la “Planta de Tratamiento de Aguas Residuales del “Cerro de la Estrella” ubicada en la Alcaldía Iztapalapa. Se obtuvieron dos muestras en tiempos distintos, que fueron utilizados para inocular a R1 y R2 y ambos reactores fueron inoculados con 800 ml de lodos activados. A los lodos obtenidos durante los 2 muestreos les determinó el contenido de SST, SSF y SSV, obteniendo valores para el inóculo de R1 de: 12.56 g SST/L, 8.52 g SSV/L y 4.04 g SSF/L; para el inóculo del segundo reactor R2, valores de 11.36 g SST/L, 8.06 g SSV/L y 3.29 g SSF/L, respectivamente. Sánchez Valencia et al., (2021), también trabajo con lodos provenientes de la planta de tratamiento “Cerro de la Estrella” con un contenido de SSV de 3.35 g/L, este dato es menor al contenido de sólidos volátiles (SSV) del presente trabajo. Esto se puede deber a varios factores como: el crecimiento microbiano, la presencia de compuestos orgánicos volátiles, la falta de eficiencia en la eliminación de sólidos, cambios en la composición del agua residual y condiciones operativas. Otro factor que se considero fue la diferencia de concentración de biomasa activa fue el lugar de donde se tomaron los lodos. En el caso de Sánchez Valencia et al., (2021) se tomó directamente del tanque de aireación de la PTAR, lo que hace necesario concentrar todo la biomasa. En el presente proyecto los lodos fueron recolectados del sedimentador secundario, donde los sólidos se encuentran asentados y la biomasa ha alcanzado una mayor concentración de manera natural. La tabla 10 muestra el porcentaje de SV, tomando en cuenta el muestreo 1 de lodos activados para R1 nos da el 68% y el muestreo 2 para R2 arroja el 71%, con esto podemos concluir que hay suficientes sólidos volátiles.

Estos valores son importantes, ya que el PHA está ligado a los SSV; los cuales representan a la posible biomasa activa, y al tener una mayor concentración de biomasa, se lograría una mayor acumulación del PHA (Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004b).

Se realizaron tinciones al inóculo con azul Nilo, previo al arranque de los dos reactores, esta tinción es específica para PHB (Ostle & Holt, 1982). Se detectó una baja fluorescencia, lo que podría ser un indicador de una baja concentración de bacterias acumuladoras de PHB (Tabla 10). La tinción no es una técnica cuantitativa, sólo permite confirmar la presencia de PHB, por lo tanto, no se puede corroborar cuanto contenido de PHB tenemos. Para cuantificar el contenido de PHB en el inóculo, se realizó un análisis gravimétrico (Tabla 10), esto ayudó a comprobar que los lodos activados aerobios tienen microorganismos acumuladores de PHB, arrojando un valor de  $6.32 \pm$

0.90 g PHB/ g peso seco. Algunos estudios han encontrado que el contenido de PHB en los lodos activados usados como inóculo oscila entre el 1 y 7 g PHB/g peso-seco. Dionisi et al., (2004) al inicio de la operación de un reactor utilizando lodos activados como inóculo, obtuvo una acumulación de 5 g PHB/g peso-seco, mientras que Jiang et al., (2011) reportó que su inóculo tenía el 5.6 g PHB/g peso seco y Sánchez Valencia, (2016) un 6.6% de PHA. Los valores reportados en el presente trabajo son semejantes de lo reportado en la bibliografía. Sin embargo, estos datos pueden variar, debido a las diferentes condiciones de operación, origen del inóculo y la composición del agua residual (AR).

*Tabla 10. Caracterización del inóculo*

Reactor	% SSV/SST	g PHB/g peso seco	Microscopia de fluorescencia
R1	68	7.6	
R2	71	5.9	

## 4.2 Muestreo de lixiviados y agua residual

### 4.2.1 Caracterización de agua residual

Diversos autores sugieren para la selección de microorganismos acumuladores de PHA usar un medio mineral con una mezcla de AGV (Kavitha et al., 2016; Ryu et al., 2008; Serafim et al., 2008). En este trabajo se decidió usar agua residual municipal suplementada con AGV, para la etapa de aclimatación, así como para diluir el lixiviado durante las etapas posteriores. De esta forma se aprovechan los nutrientes contenidos en el agua residual, estableciendo un sistema sustentable

dándole un valor agregado a estos residuos, promoviendo de esta manera la gestión sostenible de recursos y la economía circular.

Se realizaron 4 muestreos de agua residual municipal (ARM) de la “Planta de Tratamiento de Aguas residuales del Cerro de la Estrella” ubicada en la alcaldía Iztapalapa. Los valores de materia orgánica total y soluble arrojaron  $360.75 \pm 37$  mg DQOt/L y  $288 \pm 46.62$  mg DQOs/L (Tabla 11). Una DQO baja es un indicador de que hay menos materia orgánica disponible para los microorganismos. De acuerdo con la clasificación de Metcalf & Eddy, (2003), la concentración de DQOt de las aguas residuales de la planta de tratamiento de “Cerro de la estrella” son consideradas de carga media, ya que están en un intervalo de 200 y 600 mgDQOt/L.

El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) fue otro parámetro que se caracterizó, dando un valor promedio de  $14.74 \pm 10.40$  mg  $\text{NH}_4^+$ /L.

En cuanto la concentración de AGV en el ARM siempre arrojó resultados bajos, de los 4 muestreos realizados se obtuvo una concentración promedio de  $141 \pm 68.2$  3 mg DQO-AGV/L (Tabla 11).

Es relevante recalcar que el principal aporte de nutrientes y materia orgánica no fue el agua residual (AR), sin embargo, se utilizó para equilibrar el contenido de nutrientes y para diluir el lixiviado, ya que el proceso de producción de PHA no requiere esterilidad estricta, y se evita el uso de agua potable. En resumen, los niveles de dichos parámetros en el AR de la planta de tratamiento de “cerro de la estrella” son demasiados bajos para influir en el proceso mencionado. Las condiciones óptimas para la producción de PHA, especialmente en cultivos mixtos es de 1-4 g/L en ácidos de cadena corta (G. Jiang et al., 2016b).

La tabla 11, muestra la caracterización de los cuatro lotes del agua residual.

*Tabla 11. Caracterización de agua residual*

Parámetro	2023			2024
	Febrero	Agosto	Octubre	Enero
<b>pH</b>	7.3	7.4	8.1	7.4
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L)</b>	29.73	5.76	12.45	11.02
<b>DQO<sub>T</sub> (mg/L)</b>	402	369	360	312
<b>DQOs (mg/L)</b>	349	298	262	243
<b>SST (g/L)</b>	0.44	0.80	0.73	0.75
<b>SSF (g/L)</b>	0.27	0.36	0.30	0.30
<b>SSV (g/L)</b>	0.17	0.43	0.43	0.44
<b>AGV (mg DQO/L)</b>	237.59	139.62	101.83	85.30
<b>Conductividad ms/cm</b>	1088	878	986	878
<b>SDT (mg/L)</b>	1090	868	986	868

#### 4.2.2 Caracterización de lixiviados de la FORSU

Los lixiviados de la FORSU se obtuvieron de la planta de composteo “Bordo Poniente” en los meses de mayo, octubre y febrero. Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su caracterización fisicoquímica. Los resultados obtenidos de la caracterización se muestran en la tabla 12 y se comparan con muestreos realizados por otros autores, en diferentes años.

En lo que respecta al pH este se encontraba en un intervalo de  $6.2 \pm 0.7$ . Es posible observar que este valor se encuentra significativamente por encima de lo reportado por Castilla-Hernández et al., (2016) y Sánchez Valencia et al., (2021), quienes indicaron que su rango de pH se encontraba en  $4.7 \pm 0.3$ .

El contenido de DQO soluble fue de  $29.2 \pm 4.0$  g/L, la cual representa el 69% de la DQO total, y es material biodisponible. Mientras que la concentración obtenida de amonio fue de  $1.76 \pm 0.11$  mg  $\text{NH}_4^+$ /L, la cual es similar a lo reportado por Sánchez Valencia et al., (2021), quien reporta un valor de  $1.10 \pm 0.4$  mg  $\text{NH}_4^+$ /L. En la tabla 12, en el apartado de Castilla Hernández et al. (2016), reporta rangos similares en la temporada de secas.

El contenido promedio de AGV fue de  $7.7 \pm 3.2$  g DQO-AGV/L, teniendo una composición de 47:24:12:17 (HA:HP:HB:HV), respectivamente. Estos datos difieren a lo reportado previamente por Castilla-Hernández et al., (2016) quien reporta una concentración promedio de  $16.2 \pm 6.3$  y Sánchez Valencia et al., (2021) reporta una concentración de  $10.7 \pm 5.4$ . Estos cambios posiblemente se deben a los cambios en la operación de la planta de composteo.

La conductividad es otro parámetro que toma relevancia en la producción de PHA, ya que está relacionada con la concentración de iones presentes, como sales y nutrientes. Estos iones influyen en la actividad enzimática y en la estabilidad de las membranas celulares de los microorganismos (W.-H. Lee et al., 2008). Carozzi et al., (2020), evaluó el efecto de la salinidad en la síntesis de PHB, reportó que a una salinidad media de 1.5 % alcanzó una concentración de 412 mg PHB/L y en porcentaje peso obtuvo 16.1 gPHB/g peso-seco, mientras que a una salinidad de 4.5% aumentó la concentración del biopolímero de 820 mg PHB/L y 33.0 gPHB/g peso seco.

Desde 2016 se trabajó en la rehabilitación y transformación de la Planta de Composteo Bordo Poniente, la planta sólo recibe residuos orgánicos de las centrales de abasto y se enfoca en gestionar los residuos de forma sostenible transformándolos en energía. A pesar de la variabilidad en la composición de los lixiviados, estos siguen conteniendo concentraciones adecuadas para su aprovechamiento en la producción de PHA. En resumen, el tipo de residuo, el tratamiento, la gestión de lixiviados, factores ambientales y operacionales, pueden ser la causa de la variación entre los resultados previamente obtenidos y los reportados en este trabajo, como se puede apreciar en la tabla 12.

En resumen, a pesar de la disminución en el contenido de contaminantes presentes en los lixiviados derivado de las modificaciones operacionales realizadas en la última década en la planta, este no deja de ser un residuo altamente contaminante y que dadas sus características se puede aprovechar mientras sea tratado adecuadamente.

Tabla 12. Caracterización de lixiviados Bordo Poniente

Parámetro	Castilla-Hernández et al., (2016)		Sánchez Valencia et al., (2021)	Este trabajo
	Lluvias	Secas		
pH	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.3	4.7 ± 0.3	6.2 ± 0.7
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/L)	0.8 ± 0.4	1.9 ± 0.3	1.10 ± 0.4	1.76 ± 0.11
DQOt (g/L)	100.1 ± 16.6	119.0 ± 11.6	86.7 ± 19.2	43.4 ± 7.13
DQOs (g/L)	91.3 ± 17.4	107.9 ± 8.1	78.2 ± 16.3	29.2 ± 4.0
SST (g/L)	90.7 ± 18.4	69.0 ± 10.6	68.7 ± 17.0	45.5 ± 13.1
SVT (g/L)	59.5 ± 14.7	69.0 ± 10.6	45.1 ± 13.2	38.0 ± 10.9
AGVt (gDQO/L)	16.2 ± 6.3	24.5 ± 8.9	10.7 ± 5.4	7.7 ± 3.2
Proporción HA:HP:HB:HV	70:14:12:4	80:10:7:3	52:16:28:4	47:24:12:17
T (°C)	-----	-----	-----	21.0
Conductividad (mS/cm)	-----	-----	-----	88.6 ± 17.02
TDS (mg/L)	-----	-----	-----	1330.8 ± 17.4
COT (g/L)	35.2 ± 6.4	39.4 ± 2.5	22.0 ± 3.5	-----

### 4.3 Operación del Reactor 1 (R1)

Para el arranque se usó agua residual suplementada con una mezcla de AGV a una carga de 4.32 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día una vez detectada fluorescencia en los lodos se cambió la alimentación por lixiviado diluido con agua residual. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH (4 M) o HCl (1 M), según fuera necesario. La operación del reactor tuvo una duración de 165 días y operó con ciclos de 12 h como se describe en materiales y métodos. Una vez que R1 estuvo aclimatado, en las dos siguientes etapas se alimentaron con lixiviados de la FORSU a dos diferentes cargas orgánicas a 4.32 y 6.38 kg DQOs/m<sup>3</sup>.

### 4.3.1 Perfil de consumo de DQO

En la primera etapa, se alcanzó una eficiencia de remoción promedio de  $94 \pm 3.97\%$  (Figura 12). Al comparar las eficiencias de remoción con Morgan-Sagastume et al., (2019) donde evaluó el efecto de aclimatación de lodos activados en un SBR y trabajó con la estrategia S/A. Operaron en 16 ciclos y con una carga orgánica de 3.1 g DQO/L·día. Su alimentación consistió en agua residual municipal suplementada con ácido acético y propiónico, alcanzando eficiencias de aproximadamente 80%, las cuales son menores a las obtenidas en este trabajo. Las diferencias de las eficiencias de remoción, se pudo deber al mayor tiempo de aclimatación del cultivo mixto, el cual fue de 86 ciclos para este trabajo, en comparación con los 16 ciclos que reportan los autores. En este sentido, hay evidencia que indica que al incrementar el número de ciclos se garantiza que la comunidad microbiana se aclimata mejor al sustrato.

Cuando R1 alcanzó un estado pseudoestacionario (43 días de operación), se cambió la alimentación por lixiviados de la FORSU diluidos con agua residual, que corresponde a la Etapa 2

En la Etapa 2, R1 fue alimentado con lixiviados diluidos con AR a una carga de 4.32 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día y operó bajo estas condiciones durante un periodo de 19 días. Como se puede apreciar en la figura 12, el cambio de alimentación afectó temporalmente la eficiencia de remoción, disminuyendo hasta  $75.06 \pm 10.10\%$  en el día 51, recuperándose gradualmente de forma posterior hasta alcanzar una eficiencia promedio de remoción hasta alcanzar una eficiencia promedio de remoción de DQOs a  $83.92 \pm 9.25\%$ . Dado que el reactor se recuperó en los últimos días de operación de la etapa 2, decidimos aumentar la carga a los 20 días de operación para evaluar su respuesta en condiciones más exigentes.

A partir del día 64 se inició la Etapa 3, en la cual se incrementó la carga orgánica a 6.38 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día. En estas condiciones se observó una pérdida de la eficiencia de remoción de DQO soluble, la cual registro un promedio de  $68 \pm 0.73\%$  (Figura 12).

A partir de los resultados obtenidos es posible inferir que el cultivo experimentó un estrés significativo por la alimentación del lixiviado de la FORSU y el incremento en la carga aplicada. Esto resultó en una disminución de la eficiencia de remoción. Este comportamiento coincide con lo reportado por Sánchez Valencia et al., (2021) quienes usaron lixiviados de la FORSU de “Bordo Poniente”, para operar un SBR el cual fue alimentado a dos cargas orgánicas distintas, 2.01 y 3.88

gDQOs/L•día, registrando una pérdida en la eficiencia de remoción de DQOs  $68 \pm 4.83$  y  $40 \pm 11.4\%$ , con el incremento en la carga.

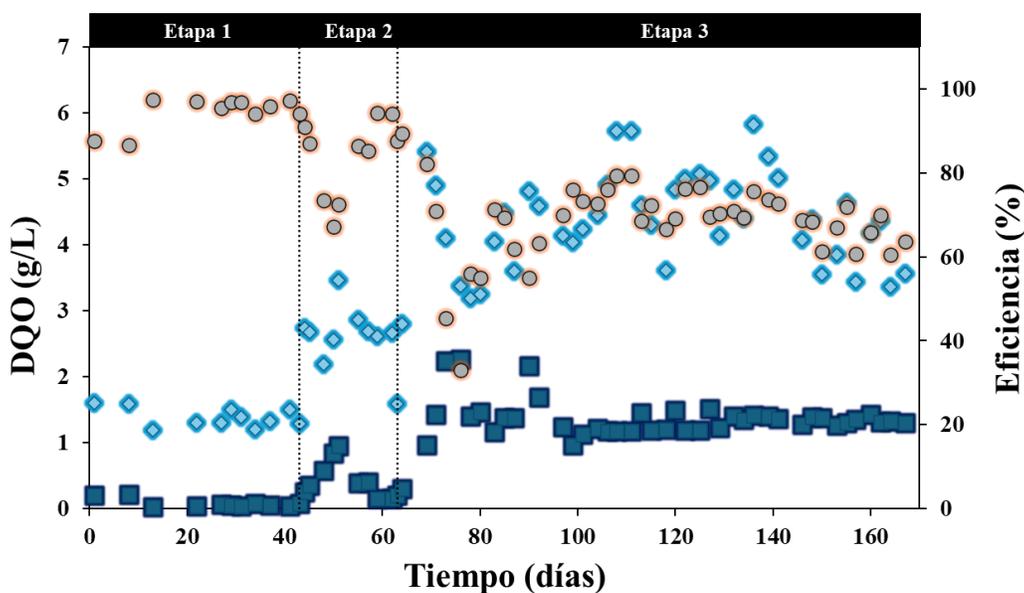


Figura 12. Perfil de DQOs del SBR con aumento de cargas Influyente (◇), Efluente (■) y Eficiencia (○) en R1

#### 4.3.2 Perfil de consumo de Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )

El amonio es un nutriente que utilizan los microorganismos para el crecimiento celular. Cuando se restringe su concentración del nitrógeno, las vías metabólicas lo dirigen hacia la acumulación de material de reserva, por ejemplo PHB y no a la producción de biomasa (Khatami et al., 2021).

En la etapa 1, R1 fue alimentado con el agua residual suplementada con una mezcla AGV, donde la cantidad de fuente nitrogenada fue la aportada por el agua residual, equivalente a  $29.7 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$ . En esta etapa debido a los problemas con el manejo de las muestras para la determinación de amonio por medio de un electrodo selectivo de amonio (Thermo Scientific Orion 9512. HPBVW) no fue posible obtener resultados reproducibles por lo cual no se reportan los valores correspondientes.

Durante la Etapa 2, se alimentó el reactor con lixiviado de la FORSU, los cuales contienen un alto contenido de  $\text{NH}_4^+$ , de  $1.7 \text{ g/L}$ , que al diluirlo con agua residual disminuyó su concentración

a  $258.86 \pm 32.14$ . En la figura 13, se muestra el perfil de  $\text{NH}_4^+$ , bajo estas condiciones de operación, se obtuvo una eficiencia de remoción del 100%.

En la etapa 3, al incrementar la concentración de amonio en la alimentación a 435.75 mg/L la eficiencia de remoción, no se vio perjudicada como en el caso de la DQO, obteniéndose una remoción del  $99.71 \pm 0.55\%$ . De acuerdo a Johnson et al., (2010) quienes estudiaron el efecto de la concentración del amonio sobre la producción de PHA, reportan que las concentraciones idóneas oscilan entre 72–450 mg  $\text{NH}_4^+$ /L. La concentración de amonio baja afectará al metabolismo de los microorganismos, provocando un estrés nutricional y a su vez favoreciendo la acumulación PHA, aunque esto dependerá del tipo de microorganismo y las condiciones específicas de operación. Este comportamiento es similar a lo ha reportado Liu et al., (2008), quienes estudiaron la producción de PHA, utilizando, aguas residuales de las fábricas de conserva de tomates, con concentración de 20 a 705 mg  $\text{NH}_4^+$ /L y un cultivo mixto como inóculo, obteniendo una remoción del 100%. Las condiciones cambiantes de los macronutrientes, en este caso el  $\text{NH}_4^+$  indujeron al incremento en la producción de PHA, obteniendo un contenido de 20 gPHB/g peso-seco

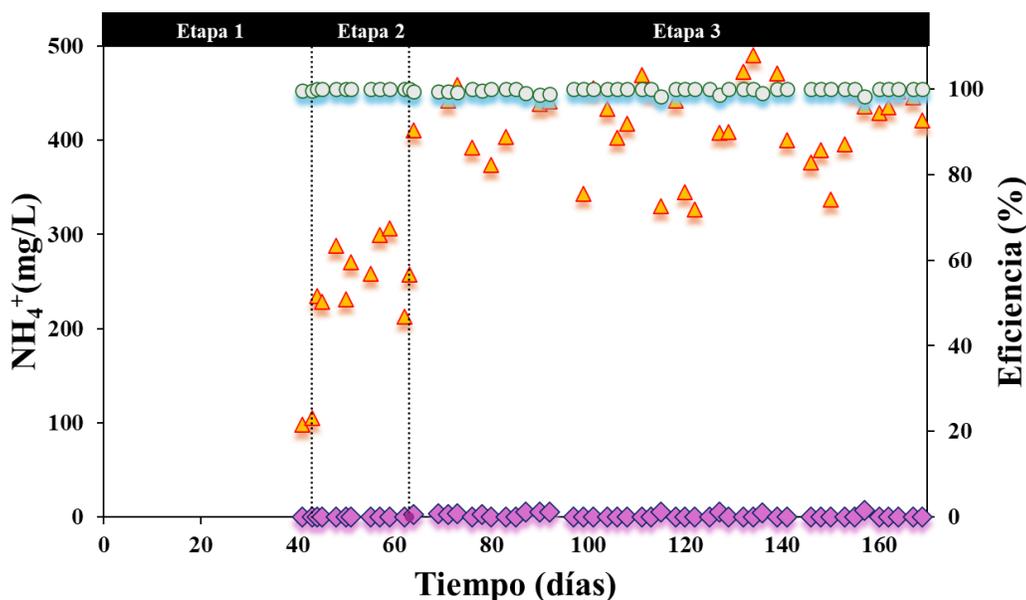


Figura 13. Perfil de consumo de  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacktriangle$ ) Influyente, ( $\blacklozenge$ ) Efluente y Eficiencias ( $\bigcirc$ ) en RI

#### 4.3.3 Perfil de consumo de AGV

Durante la operación del reactor, se observó un comportamiento similar en la remoción de la DQO<sub>s</sub>. En la Etapa 1, de aclimatación, cuando el reactor fue alimentado con ARM+AGV, la

composición de los AGV fue 19:22:21:39 (HA:HB:HP:HV), con una concentración final de  $1421.84 \pm 30.48$  mg DQO/L. Bajo estas condiciones, R1 registró una eficiencia de remoción del  $91.0 \pm 0.33\%$  (Figura 14).

En la etapa 2 el reactor fue alimentado con LIX+ARM, resultando en una concentración final de AGV de  $1,098.39 \pm 45.52$  mg DQO/L. A pesar de que se estuvo alimentado con la misma carga orgánica, la disminución de la concentración de AGV en la alimentación se puede deber a que, en el lixiviado de la FORSU, existen otros microorganismos que pueden aprovechar los compuestos que contienen como fuente de nutrientes. Para el día 53 se presentó una remoción del 75% coincidiendo con la remoción de DQOs, debido al cambio de alimentación.

En cuanto a la etapa 3, el incremento en la concentración de lixiviados en la alimentación dio como resultado una concentración de AGV de  $2381.43 \pm 294.80$  mg DQO/L. En este caso la eficiencia de remoción se vio afectada, disminuyendo a  $71.0 \pm 9.27\%$ . Se ha reportado que la operación de reactores SBR aerobios con lixiviados de la FORSU, provoca problemas de inhibición de los microorganismos, debido a la presencia de ácidos húmicos y otros compuestos recalcitrantes (Sánchez Valencia, 2016).

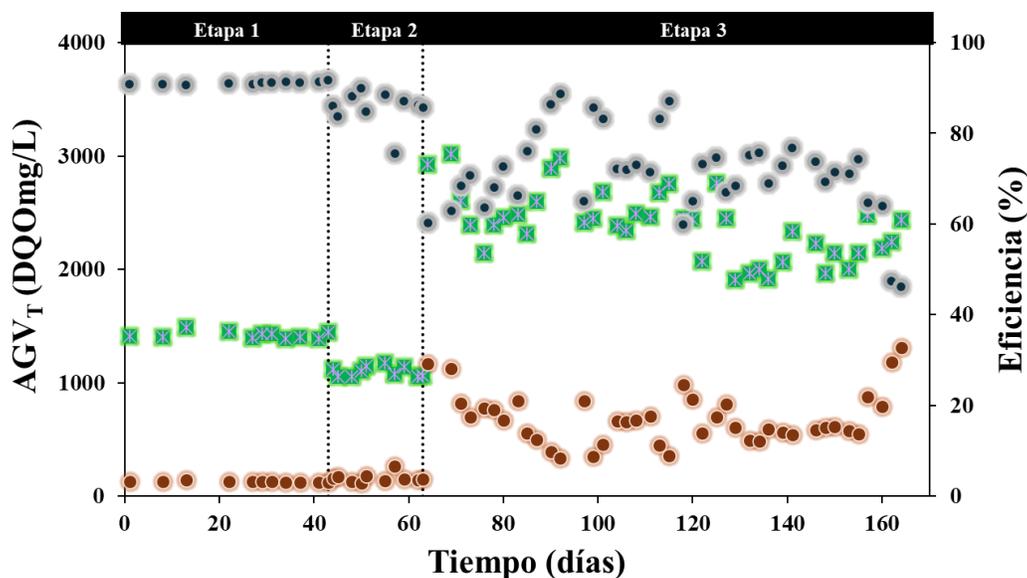


Figura 14. Perfil de  $AGV_T$  (X) Influyente, (●) Efluente y (●) Eficiencia en R1

#### 4.3.3.1 Remoción de AGV individuales

Es importante destacar que uno de los precursores inmediatos para la síntesis de PHB son el ácido acético y butírico, siendo este último el preferido para formar el PHB. El ácido acético

debe pasar por una serie de transformaciones: primero convertirse a Acetil-CoA y después a hidroxibutil-CoA; mientras que el butírico es activado mediante la formación de butiril-CoA y después a hidroxibutil-CoA (Lemos et al., 2006). El perfil de consumo de los ácidos individuales se presenta en la tabla 13.

En la Etapa 1, se utilizó agua ARM+AGV con la finalidad de simular la composición de los lixiviados de la FORSU, además al utilizarse sustratos sintéticos, tiene una composición constante y controlada que permite estabilizar el proceso en un menor tiempo. La proporción final de AGV fue 13:31:17:39 (HA:HP:HB:HV). Al tener un cultivo mixto adaptado al sustrato sintético puede formar biomasa más robusta y estará mejor preparada para degradar compuestos complejos.

En la tabla 13 se muestran las eficiencias de remoción de AGV para las tres etapas:

En la etapa 1 como se ha ido mencionando se utilizó como sustrato el agua residual suplementada. Se puede observar que la composición constante y controlada de AGV, permitió una alta remoción, siendo el HV el AGV que se consumió casi en su totalidad 96.0%, seguido del acético 92.08%, propiónico 88.0% y el minoritario el butírico 85.0%.

La caracterización de los lixiviados mostró la siguiente proporción 47:24:12:17 (HA:HB:HP:HV), siendo los mayoritarios el ácido acético (HA) y el ácido butírico (HB). De acuerdo con los perfiles de consumo, el que está después del HA es el ácido valérico (HV). Esto se debe a que, cuando se almacenan los lixiviados en condiciones anaerobias, favorecen la formación y acumulación de AGV. Esto paso debido a la alta concentración de materia orgánica, nutrientes y agua, la cual crea el ambiente propicio para la actividad microbiana. A medida que el residuo permanece almacenado, los microorganismos degradan progresivamente los compuestos orgánicos presentes, lo que modifica la composición de AGV, favoreciendo la producción de ácidos de cadena corta como el HA y HP. Estos se acumulan en mayores concentraciones con el tiempo (Prasanna Kumar et al., 2024).

En la etapa 2, cuando se alimenta el reactor con ARM+LIX, se observa en la tabla 13, que la proporción de los AGV cambia y las concentraciones promedio fueron HA de  $161.31 \pm 20.27$ , HP de  $369.33 \pm 34.50$ , HB de  $127.92 \pm 8.16$  y HV de  $439.83 \pm 14.83$  (15:34:12:40). Se puede apreciar que la remoción de HB fue del 90% y para HV de 94%, para ambos ácidos, seguido del HA con una eficiencia de remoción del 78.45% y el minoritario el HP con 75.58%.

En la etapa 3, la proporción de AGV cambio a 43:17:14:26 (HA:HP:HB:HV), debido a que el lixiviado estuvo almacenado durante 122 días, el cual aún en refrigeración no evita su degradación. Como se observa en la tabla 13, al aumentar la carga orgánica se registró una pérdida en la eficiencia de remoción de los AGV. El HA fue el que mayor eficiencia de remoción presentó  $83.0 \pm 7.94\%$ , seguido del HV con  $66.28 \pm 18.17\%$ , mientras que el HB y HP una eficiencia similar de 58%. La eficiencia de remoción de los AGV, para esta etapa, fue inferior a la encontrada en las etapas 1 y 2.

Tabla 13. Resumen de consumo de AGV individuales en R1

AGV	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
<b>HA<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	$263.70 \pm 3.87$	$161.31 \pm 20.27$	$1028.49 \pm 169.64$
<b>HA<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	$20.88 \pm 1.04$	$34.08 \pm 12.81$	$177.10 \pm 88.36$
<b>Eficiencia (%)</b>	$92.08 \pm 0.40$	$78.45 \pm 9.65$	$83.0 \pm 7.94$
<b>HP<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	$307.45 \pm 16.69$	$369.33 \pm 34.50$	$407.51 \pm 70.97$
<b>HP<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	$37.61 \pm 4.59$	$89.50 \pm 3.78$	$165.29 \pm 42.65$
<b>Eficiencia (%)</b>	$88.0 \pm 1.61$	$78.58 \pm 2.55$	$58.0 \pm 14.64$
<b>HB<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	$291.70 \pm 35.27$	$127.92 \pm 8.16$	$336.10 \pm 62.52$
<b>HB<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	$43.74 \pm 6.82$	$11.88 \pm 27.07$	$145.60 \pm 95.82$
<b>Eficiencia (%)</b>	$85.0 \pm 1.95$	$90.46 \pm 15.62$	$58.0 \pm 25.12$
<b>HV<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	$559 \pm 21.92$	$439.1 \pm 14.83$	$619.33 \pm 133.00$
<b>HV<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	$23.73 \pm 2.53$	$22.44 \pm 30.63$	$198.26 \pm 107.25$
<b>Eficiencia (%)</b>	$96.0 \pm 0.51$	$94.89 \pm 7.04$	$66.28 \pm 18.07$

Inf: influente; Ef: efluente

A través del análisis de los AGV individuales, se puede inferir que tipo de PHA se estaba acumulando. Investigaciones anteriores han demostrado que la composición de AGV puede influir de manera directa en el tipo de PHA sintetizado (D. Zhang et al., 2019). Como el estudio realizado por Colombo et al., (2016), ocupó dos conjuntos con composiciones diferentes de AGV, donde el primero contenía HA y HB en proporciones 16:26 y 58% de ácido láctico, respectivamente. El segundo conjunto contenía HA, HP, HB y HV en proporciones de 58:19:13:4 y 4% de ácido láctico. Los resultados arrojaron que el primer conjunto produjo PHB, mientras que el segundo conjunto al

contener HV, produjo un 40% de PHV. Se ha reportado que los AGV con número de carbono par como el HA y HB son los precursores de la síntesis de PHB, el cual contiene solo un monómero (HB), mientras que los AGV de número impar de carbono como HP y HV, producirán el copolímero PHB/PHV (J. M. L. Dias et al., 2006). Por lo tanto, a través de esta investigación puede inferirse que los biopolímeros que se produjeron fueron polihidroxibutirato (PHB) y polihidroxivalerato (PHV) o bien el copolímero PHB/PHV. En apartados siguientes se abordará este tema.

Los datos reportados confirman que cuando los microorganismos acumuladores de PHA se encuentran en una exposición prolongada con el lixiviado de la FORSU reducen su actividad respiratoria y destinan la energía a mantenimiento. Uno de los componentes que podría causar esta inhibición son las sales, la conductividad dentro del SBR en los últimos días de operación, marcaba  $31.7 \pm 6.14$  mS/cm. De acuerdo con Rueda et al., (2022), una conductividad superior a 24 mS/cm, afecta la producción PHB. Las sales que se acumulan en el reactor no solo inhiben la síntesis de PHB, sino también el crecimiento de la biomasa (Mothes et al., 2007).

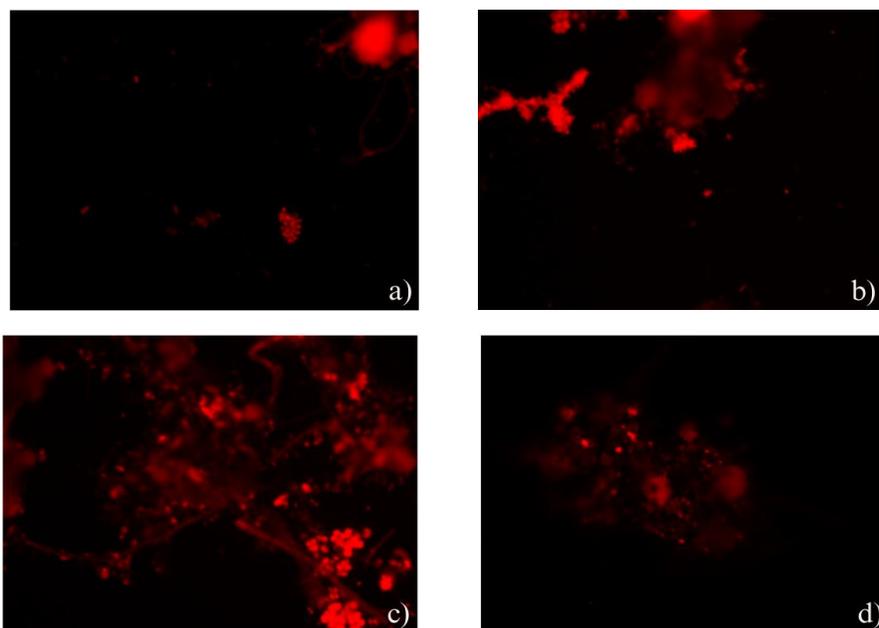
### **4.3.4 Identificación de PHA por fluorescencia**

Trabajos previos mencionan que los ácidos butírico y acético son los principales precursores del PHB, mientras que el propiónico y valérico lo son para el PHV (Koller, 2018a). De acuerdo con (Ostle & Holt, 1982) el azul de Nilo II, es un colorante específico para gránulos de PHB, los cuales florecen a una longitud de onda de 460 nm de color anaranjado brillante, así mismo, se reporta que existe una estrecha relación entre la cantidad de PHB en el cultivo y la intensidad de fluorescencia (Koller, 2018a).

En la etapa 1, a los 22 días de operación, el cultivo presentó algunas bacterias fluorescentes, lo que indica que se estaba favoreciendo la proliferación de microorganismos productores de PHB (Figura 15a). Estos resultados coinciden con Sánchez Valencia et al., (2021), que logró el enriquecimiento de su biomasa durante los primeros 12 días de operación, usando lixiviados de la FORSU.

En el día 44 de la etapa 2, cuando el reactor estaba siendo alimentado con el ARM+LIX, la biomasa presentó mayor densidad de gránulos fluorescentes (Figura 15b).

Sin embargo, en la etapa 3 conforme transcurrió el tiempo de operación para el día 150, se registró una disminución en la intensidad de fluorescencia (Figura 15d). El aumento de la carga no favoreció la síntesis de PHB, así lo demostró la baja remoción de AGV. Además, se observó un incremento en las bacterias filamentosas, por lo que su proliferación parece estar relacionada a la exposición prolongada al lixiviado de la FORSU y en cargas orgánicas altas, lo que provoca que se incremente significativamente la materia orgánica (Eikelboom, 2000). El incremento de bacterias filamentosas influye negativamente en la producción de PHA, ya que existe una competencia entre las bacterias acumuladoras de PHB y las filamentosas, provocando una proliferación excesiva de estas que interfiere con la sedimentación y separación de la biomasa activa (Sam et al., 2022).



*Figura 15. Identificación por microcopia de fluorescencia a 460 nm con aumento 100X: a) 22, b)44, c)129 y d)150 días de operación de R1*

#### **4.3.5 Cuantificación de PHB por gravimetría**

En la etapa 1 de, aclimatación, se determinó el contenido de PHB en el inóculo, por el método gravimétrico, arrojando un contenido de 7.6 g PHB/g peso seco, en el día uno.

En el día 44 de operación, cuando inició la etapa 2, se duplico la producción registrándose un 15.7 g PHB/g peso-seco (Figura 16). Sin embargo, para el día 52 se observó una ligera

disminución en la producción del PHB a 10.8 g PHB/g peso-seco, este comportamiento puede ser debido a que el reactor se estaba adaptando al cambio de alimentación del ARM+LIX. Posteriormente en el día 62 de esta etapa se registró una recuperación en la producción de PHB alcanzando 19.5 g PHB/g peso-seco (Figura 16).

En el día 73 de la etapa 3 se observó una disminución en la producción de PHB a un valor de 10.9 g PHB/g peso seco con el aumento de la carga. Posteriormente se observó una nueva recuperación, alcanzando para el día 91 una acumulación de 18.0 g PHB/g peso-seco. Durante esta etapa se alcanzó una máxima acumulación en el día 113 con 55.7 g PHB/g peso-seco. Este comportamiento coincidió con la dinámica de consumo de  $AGV_T$ , pues para el día 73 la eficiencia de remoción bajo a 68%, y para el día 113, donde se reporta la máxima acumulación de esta etapa la eficiencia de aumento a 80%.

A partir del día 118 se observó una disminución gradual en la producción de PHB, obteniendo para el final de la operación del reactor una acumulación del 3.08 g PHB/ g peso-seco. La disminución de la capacidad de almacenamiento se atribuye a la baja tasa de absorción de sustrato, pues en esta última parte de la etapa la eficiencia de remoción de AGV fue de 47%. Este comportamiento ha sido reportado previamente por Colombo et al., (2017) analizaron la inhibición en la producción de PHA en cultivos mixtos al utilizar lixiviados de la FORSU como fuente de carbono. Encontraron que el amoníaco presente en el lixiviado limitaba la acumulación de PHA ante esto implementaron un pretratamiento para mitigar el efecto. Pudimos observar que conforme se aumentó la carga, hubo una pérdida de la eficiencia de remoción en comparación con la etapa 1, esto se debe a que los microorganismos al lixiviado por periodos prolongados pierden la capacidad respiratoria. Esto puede deberse a que diversos autores reportan que los lixiviados contienen ácidos húmicos, compuestos con estructuras químicas complejas, conformadas de cadenas largas de carbono y anillos aromáticos (Chianese et al., 2020) que presentan efectos nocivos o inhibitorios sobre los microorganismo productores de PHA. Estos compuestos usualmente no son asimilados por los microorganismos, por lo que se acumulan en el sistema, potencializando la inhibición.

Otro estudio que contrasta con lo reportado, es el de Korkakaki et al., (2016), quienes lixiviados de la FORSU pretratados, para la producción de PHB registrando un 20.2 g PHB/g peso-seco de acumulación de PHB a una carga de 8.11 g DQO/L-día en un SBR.

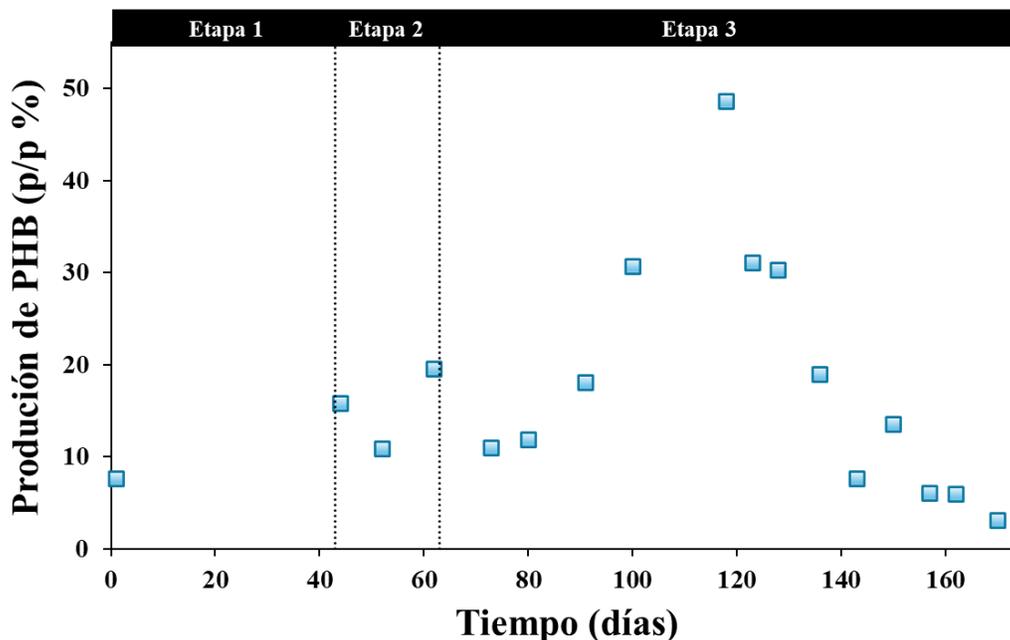


Figura 16. Perfil de producción de PHB durante el enriquecimiento en R1 (■) PHB

#### 4.3.6 Evolución de sólidos volátiles

El enriquecer biomasa con microorganismos acumuladores de PHA requiere de la ADA, que es una de las opciones ampliamente exploradas basada en la estrategia S/A. En esta, se induce al cultivo mixto a almacenar parte del carbono disponible en forma de PHA durante la etapa de saciedad para aumentar la capacidad de supervivencia durante el periodo de ayuno (Jayakrishnan et al., 2020).

En la figura 17, se muestra el perfil de la concentración sólidos volátiles dentro del reactor en las tres etapas. Al inicio de la operación, una concentración de 8.5 g SSV/L. Posteriormente, en el día 26 la concentración disminuyó a 2.84 g SSV/L, lo cual ocurrió por la adaptación del lodo en el reactor, que influye en los microorganismos acumuladores de PHB, permitiendo que se desarrollen y replacen a la población que no se adapta a las estrategias operacionales. Al final de la etapa 1 con la alimentación del ARM+AGV se obtuvo una concentración de  $3.21 \pm 0.54$  g SSV/L.

En la etapa 2, la alimentación con los lixiviados ayudó a que aumentaran los SV y hubo una recuperación de biomasa haciendo que se mantuviera constante durante esta etapa. La concentración alcanzada fue de  $3.49 \pm 0.19$  g SSV/L.

Al inicio de la etapa 3 hubo una drástica pérdida de biomasa debido al incremento de carga, alcanzando en el día 70 una concentración 1.83 g SSV/L. Posteriormente se observó una recuperación para el día 84, alcanzando una concentración de 7.19 g SSV/L. Una alta carga orgánica generalmente resulta en una mayor concentración de SV que ayudaría a producción de biomasa microbiana (Jayakrishnan et al., 2021). Este comportamiento no se mantuvo para el resto de la operación ya que se registró una pérdida gradual de biomasa en el día 163, alcanzando un valor de 2.52 g SSV/L, lo que indica una pérdida de la biomasa activa por el incremento de bacterias filamentosas.

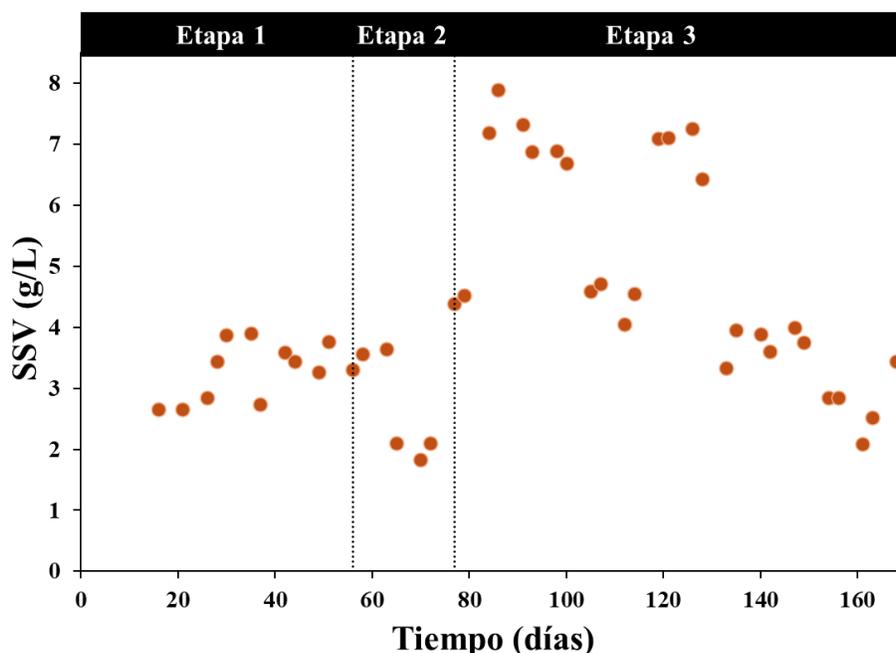


Figura 17. Perfil de sólidos volátiles en R1.

#### 4.3.7 Parámetros cinéticos de operación

En las distintas etapas experimentales se llevaron a cabo cinéticas para evaluar el consumo de DQOs,  $\text{NH}_4^+$ , SSV, OD, OUR y SOUR.

A continuación, se muestra un perfil cinético que se realizó en día 122, de la etapa 3, (Figura 18). La cinética inició con 3.15 g DQOs/L, 99 mg  $\text{NH}_4^+$ /L, 5.98 mg OD/L y 9.1 gSV/L. Se puede observar que durante los primeros 30 min de operación, la DQO se consumió a una velocidad de 0.024 g DQO/L min, con una actividad específica de 3.9 g DQO/g SSV·d. Después de ese tiempo se continúa consumiendo la materia orgánica a una menor velocidad y actividad específica 0.0003

g DQOs/L y 0.047 g DQO/g SSV·d, respectivamente. Por otra parte, el consumo de amonio se dio a una velocidad de 1958.4 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/min, con una actividad específica de 215.20 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/g SSV·d, consumiéndose por completo a los 90 min.

En cuanto al OD se puede observar en la figura 18, que hubo un rápido consumo durante los primeros 5 minutos, el cual se mantiene constante hasta los primeros 60 minutos en 0.17 mg OD/L, lo cual se asocia al consumo de material fácilmente biodegradable como los AGV. Después de los 96 minutos el OD disuelto se incrementa gradualmente hasta alcanzar la saturación. Después de este tiempo el consumo de DQO continua lentamente quedando al final del ciclo un residual de 1.52 g DQOs/L, y una eficiencia de 66%, lo cual indica que el periodo ayuno podría ser largo y en ese tiempo empezaría a consumirse el material de reserva, el PHB.

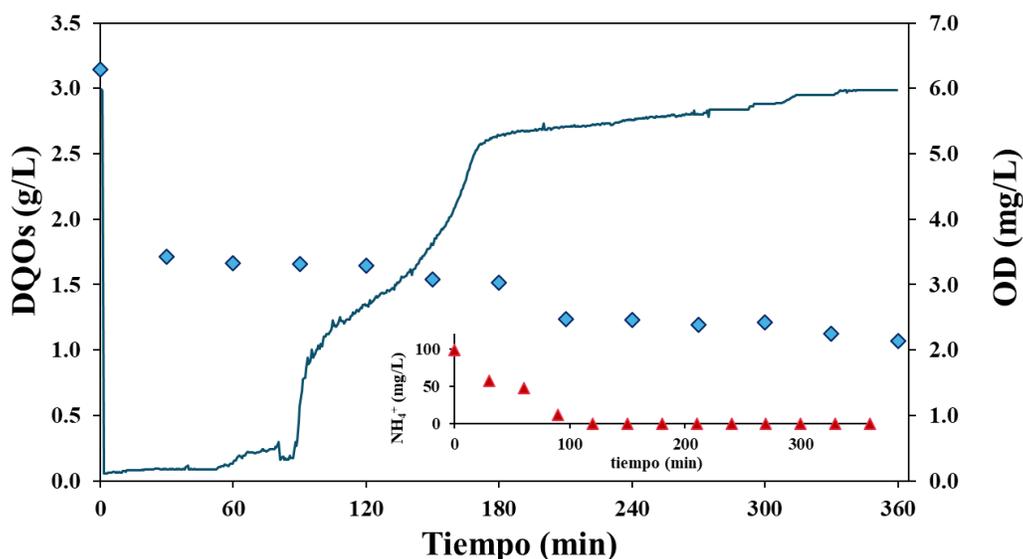


Figura 18. Perfil cinético de 6 horas de operación del reactor R1 en la etapa de producción. (—)OD, (◆)DQOs y (▲)NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

La tabla 14 presenta los parámetros cinéticos obtenidos para las distintas cinéticas realizadas. Uno de los parámetros a destacar es la SOUR la tasa respiratoria específica por sus siglas en inglés. Este parámetro nos indica la capacidad que tienen los microorganismos de oxidar la materia orgánica. En la etapa 1 de R1 en el día 27, se obtuvo una SOUR de 2.4 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min con velocidades de consumo de 4.32 g DQO/L·día y 54.86 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L·día. Cabe destacar que en esta etapa el sustrato a utilizar era de fácil degradación debido a los AGV incorporados en el medio.

Para el día 37 se registró un incremento de la SOUR a 3.3 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min, lo cual indicaba que el lodo se adaptó eficientemente al sustrato.

En la etapa 2, a partir del día 43 cuando el reactor empezó a operar con los LIX+ARM se observó que la SOUR disminuyó a 2.5 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min, lo cual pudo deberse al cambio en la composición del sustrato, considerando los compuestos inhibidores o recalitrantes presentes en los lixiviados. En general, se puede inferir que el cambio en la composición del medio afectó el metabolismo de los microorganismos, limitando el consumo de nutrientes y reduciendo la SOUR y, por lo tanto, disminuyendo la capacidad metabólica para acumular el PHB. Para el día 62 la SOUR disminuyó a 1.1 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min, lo cual indica que el cultivo no logró adaptarse al lixiviado. En la tabla 14 se puede observar que también disminuyó la tasa de consumo de materia orgánica y nutrientes. En cuanto a la relación S/A este se mantuvo constante en 0.13 en el día 43 y con una producción de PHB de 15 g PHB/g peso-seco y en el día 62 de 19 g PHB/g peso-seco, respectivamente.

Durante la etapa 3, la SOUR fue bajando progresivamente, registrándose al final de la operación del reactor un valor de 0.02 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min. La reducción de la SOUR estuvo acompañada con la baja tasa de consumo de DQO registrándose en 11.95 g DQO/L·día. La pérdida de la capacidad respiratoria se puede deber a la exposición prolongada (143 días) del cultivo al lixiviado. Se presentó una caída de la acumulación de PHA a 7.6 g PHB/g peso seco, esto debido a que los microorganismos consumieron el sustrato en un tiempo de 16 minutos, este tiempo es relativamente corto, para que el microorganismo acumule PHB. Está reportado que cuando el cultivo está en exposición a periodos de ayuno prolongados, conduce al consumo de reservas endógenas como el glucógeno y el PHA (Jayakrishnan et al., 2021).

*Tabla 14. Parámetros cinéticos para R1*

<b>Etapa</b>	<b>Día de operación</b>	<b>qrDQOs</b>	<b>qrNH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>SOUR</b>	<b>S/A</b>	<b>PHB</b>
1	27	4.32	54.86	2.4	0.03	7.6
	37	5.18	458.64	3.3	0.05	7.6
2	43	7.77	221.51	2.5	0.13	15.7
	62	4.90	521.71	1.1	0.13	19.5

	76	10.8	459.79	1.2	0.10	10.9
3	122	31.68	938.40	0.6	0.25	30.6
	133	64.36	1958.40	0.4	0.04	18.9
	143	11.95	1195.20	0.02	0.02	7.6

qDQOs: Tasa de consumo de la Demanda Química de Oxígeno, gDQO/L•día

qNH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Tasa de consumo de Amonio, mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L•día

SOUR: Tasa de consumo específico de oxígeno mgO<sub>2</sub>/g SSV•min

S/A: Saciedad/ayuno, h/h

PHB: gPHB/g peso seco

En la figura 19 se observa la evolución de la SOUR con respecto al tiempo. La SOUR varió los primeros días de la etapa 1 donde alcanzo un punto máximo de 3.4 mg O<sub>2</sub>/g SSV•min, cuando se alimentó con el ARM+AGV. Esta SOUR indicó que los microorganismos estaban llevando de manera eficiente la actividad metabólica, lo que se confirmó con las remociones de materia orgánica y amonio que fueron de 94 ± 3.97% y 100% respectivamente. Sin embargo, se observó que en la etapa 2 y 3, cuando se comenzó a alimentar con los lixiviados de la FORSU, la SOUR fue en declive después de 102 días, registrándose valores por debajo de 0.02 mg O<sub>2</sub>/g SSV•min, indicando la perdida de la capacidad respiratoria en el cultivo mixto.

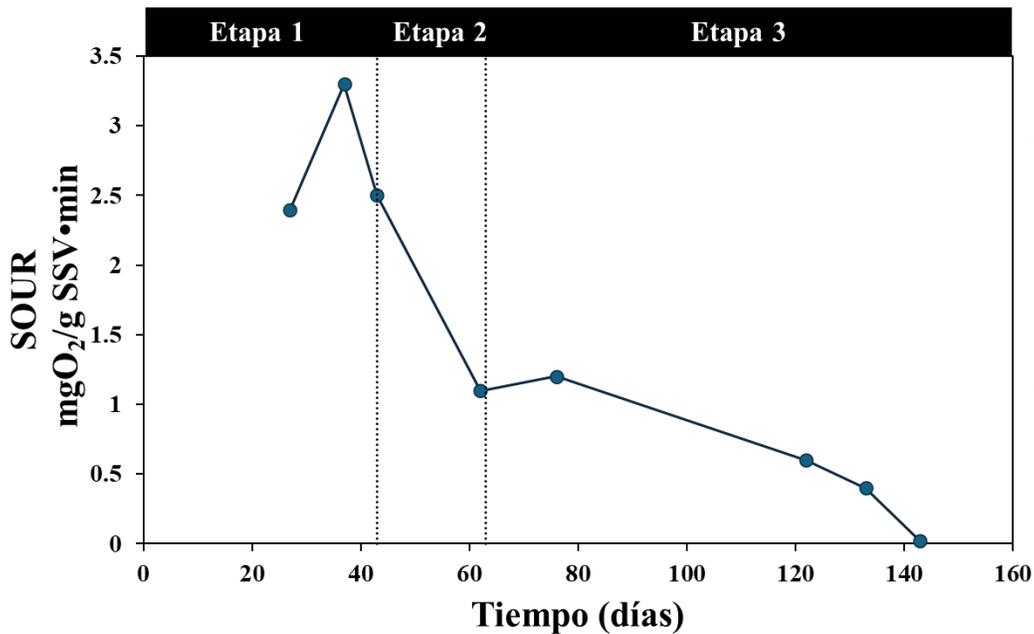


Figura 19. Perfil de SOUR en R1

Los resultados obtenidos son consistentes con los reportados por Sánchez Valencia et al., (2021), quien reporta que en los primeros 15 días de operación alcanzo una SOUR de 1.67 mgO<sub>2</sub>/g SSV·min, aplicando la estrategia S/A. Sin embargo, después de cuatro meses reporta una disminución de la SOUR la cual alcanzó un valor de 0.95 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min, indicando la pérdida de la capacidad respiratoria.

### **4.4 Operación del Reactor 2 (R2)**

#### **4.4.1 Perfil de consumo de DQO**

Para el arranque del reactor en la etapa 1, se procedió de la misma forma como con R1, fue modificando únicamente el ciclo de operación a 8 h, con la distribución que se muestra en la tabla 8, e inoculado con 8.06 g SSV/L. Una vez que alcanzó el estado pseudo-estacionario, se cambió la alimentación por lixiviado diluido con agua residual (ARM+LIX) manteniendo el mismo ciclo (8 horas), por último, en la etapa 3 se modificó el ciclo de operación a 6 horas. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

La operación de R2 en la etapa 1 duro 35 días a una carga de 6.20 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día, bajo estas condiciones de operación se obtuvo una eficiencia de DQOs promedio de 92 ± 6.26% (Figura 20)

En la etapa 2, se siguió manteniendo el ciclo de operación de 8 horas, pero ahora se cambió la alimentación por lixiviados, diluidos con agua residual municipal (ARG+LIX). Durante esta etapa la carga fue de 6.20 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día y se obtuvo una eficiencia de remoción del 78.56 ± 5.23%. En los primeros días de operación con el cambio de alimentación en la etapa 2, se registró el mismo efecto que en R1, caracterizado por una ligera pérdida en la eficiencia de remoción, la cual cayó a 74.36 % en día 38, posteriormente esta se recuperó y alcanzó una eficiencia de remoción del 79%.

En la etapa 3, se cambió el ciclo de operación a 6 horas con una carga de 8.32 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día alcanzando una eficiencia del 85.82 ± 1.20%. Se observa en la figura 20, que no hubo un cambio significativo en cuanto a la eficiencia de remoción por la reducción del ciclo de operación de 8 a 6 horas. Lo cual indica que la reducción en el tiempo de residencia no afecta el tratamiento de lixiviados.

Los resultados obtenidos para R2 son semejantes a los reportados por Amulya et al., (2015), quienes operaron en un SBR, con un efluente de desechos alimentarios y con dos ciclos diferentes. Con el ciclo de 24 h alcanzaron una remoción de DQO de 63%, mientras que con 12 h fue de 86%, respectivamente. La reducción en la duración del ciclo provocó que la producción de PHA aumentara de  $12.6 \pm 0.25\%$  a  $16.36 \pm 0.32\%$ , respectivamente.

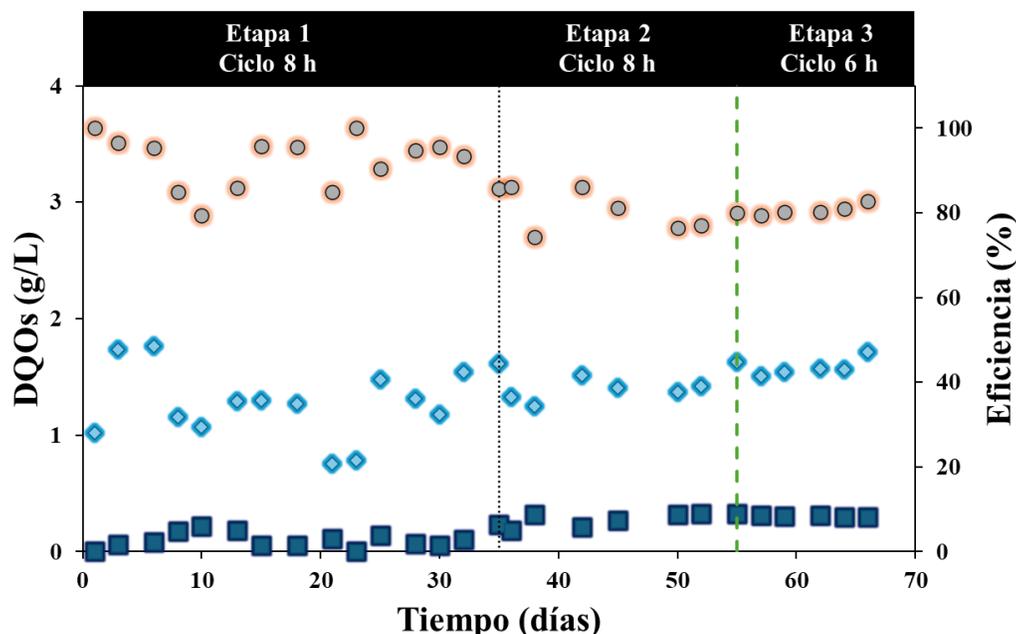


Figura 20. Perfil de DQOs de R2 con aumento de cargas Influyente (  $\circ$  ), Efluente (  $\square$  ) y Eficiencia (  $\circ$  ) en R2

#### 4.4.2 Perfil de consumo de $\text{NH}_4^+$

En la etapa 1 se obtuvo una concentración promedio de  $98.30 \text{ mgNH}_4^+/\text{L} \pm 43.21$ , posteriormente, con el cambio de alimentación en la etapa 2, la concentración promedio se incrementó a  $183.51 \pm 43.21 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$  manteniéndose sin cambios significativos en la etapa 3 la  $198 \pm 34.51 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$ . En cuanto al comportamiento del  $\text{NH}_4^+$  las eficiencias de remoción para las tres etapas fueron entre 97-99% (Figura 21), similar a lo reportado en el R1 y también coincidiendo con lo reportado por Sánchez Valencia, (2016) que empleó concentraciones más bajas ( $23 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$ ) y se registró una eficiencia de remoción de  $99\% \pm 0.3$ .

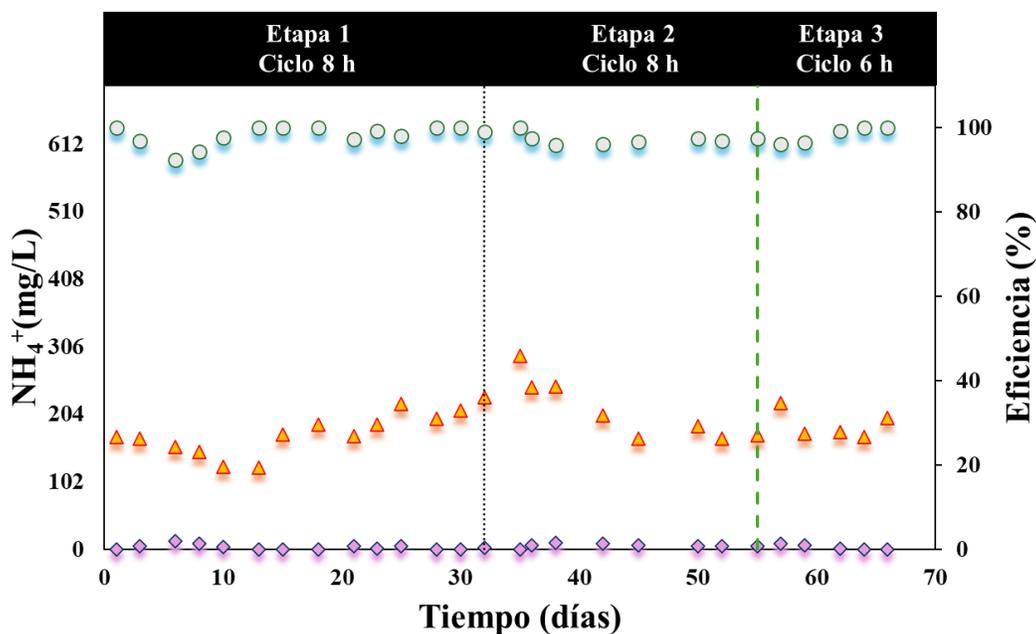


Figura 21. Perfil de consumo de  $\text{NH}_4^+$  Influyente ( $\blacktriangle$ ), Efluente ( $\blacklozenge$ ) y Eficiencia ( $\odot$ ) en R2

#### 4.4.3 Perfil de consumo de AGV

En el perfil de los AGV totales para el influente como para el efluente y las eficiencias de remoción de AGV, presentaron el mismo comportamiento observado en la remoción de la DQO soluble y semejante a lo reportado por R1. En la etapa 1, se obtuvo una concentración promedio de  $1211.65 \pm 97.07$  mg DQO-AGV/L y se registró una eficiencia de  $90 \pm 5.4\%$ . Para la etapa 2, la concentración promedio fue de  $969.71 \pm 18.81$  mg DQO-AGV/L, y la eficiencia obtenida fue de  $87 \pm 5.25\%$ . Finalmente, para la etapa 3 la concentración promedio alcanzada fue de  $1198.52 \pm 47.30$ , alcanzando una eficiencia de  $90 \pm 3.22\%$  (Figura 22). La concentración inicial de AGV es un parámetro importante que puede afectar el funcionamiento de las células, una concentración alta de AGV puede ser tóxica para los microorganismos (Amulya et al., 2015).

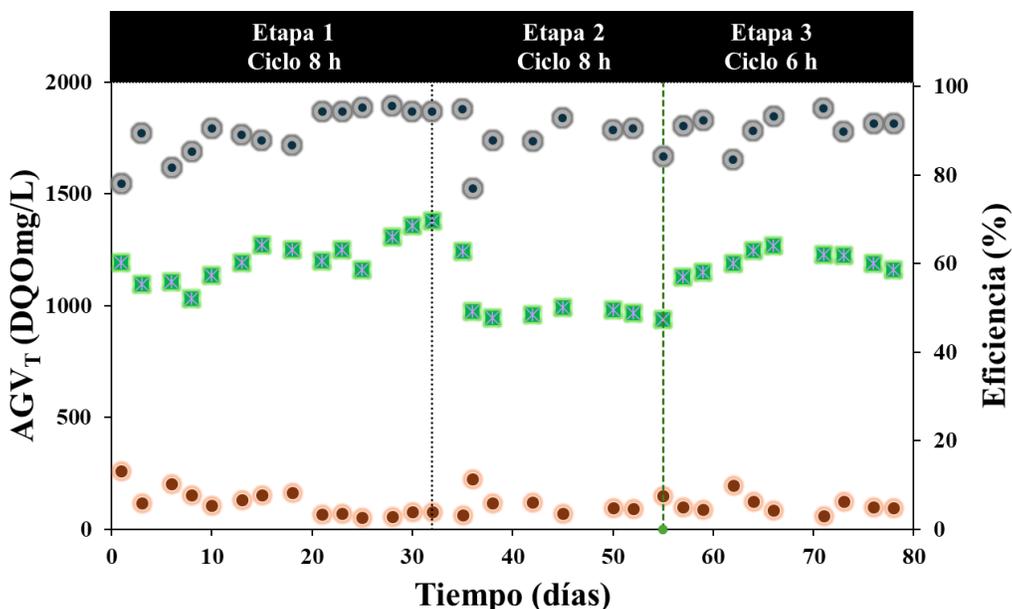


Figura 22.  $AGV_T$ , (x) Influyente, (●) Efluente y (●) Eficiencia en R2

#### 4.4.3.1 Remoción de AGV individuales

En la etapa 1, cuando R2 fue alimentado con ARM+AGV en ciclos de 8 h, en la tabla 16 muestra que el HV fue el AGV predominante, con una concentración  $470.96 \pm 72.52$ , seguido por el HB  $315.25 \pm 47.63$ , HP  $265.59$  y HA  $159.84 \pm 7.01$  mg DQO-AGV/L. Se puede observar que el HV y el HP son los que alcanzaron la mayor remoción, 95% y 90%, respectivamente.

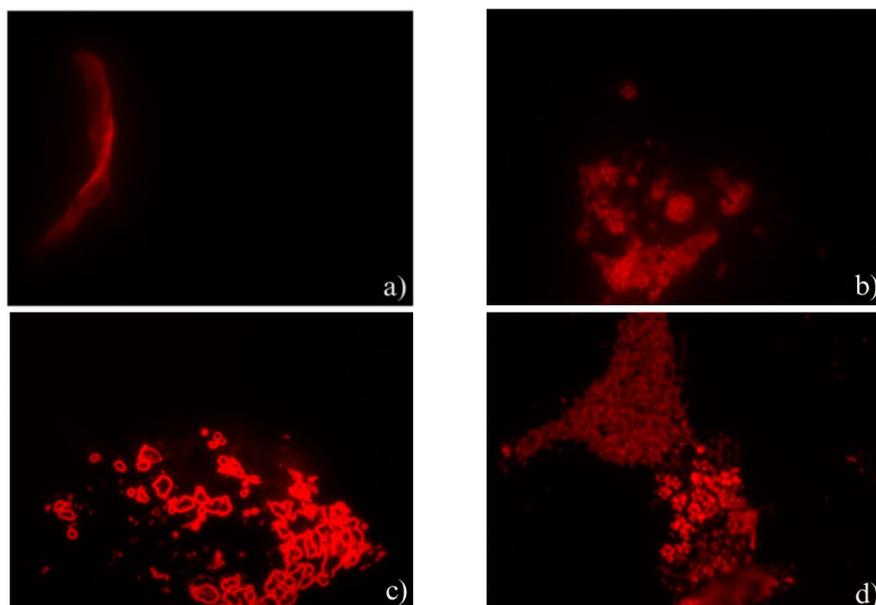
Para la etapa 2, con el LIX+ARM y el ciclo de 8 h, el HV se encontraba a una concentración de  $311.99 \pm 22.92$  mg DQO/L y registró una eficiencia de remoción del  $97.44 \pm 2.23$ , mientras que el resto de los AGV se removieron con eficiencias de 75 y 86% respectivamente. En la etapa 3, cuando se trabajó con el ciclo de 6 h, se puede observar en la tabla 15 que los AGV alcanzaron remociones arriba del 85%, con excepción del HV el cual fue el mayormente removido 98%. Este aumento de la eficiencia de eliminación de AGV podría deberse a la aclimatación de las bacterias al lixiviado y a las condiciones de alimentación dinámica aerobia, que mejora la absorción del sustrato más rápido y permite almacenar PHA (Amulya et al., 2015).

Tabla 15. Resumen de consumo de AGV individuales R2

AGV	ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
<b>HA<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	159.84 ± 7.01	173.68 ± 5.79	242.94 ± 35.08
<b>HA<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	30.64 ± 10.97	40.17 ± 37.22	36.54 ± 18.49
<b>Eficiencia (%)</b>	80.92 ± 6.61	75.01 ± 42.01	85.04 ± 6.76
<b>HP<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	265.59 ± 16.54	216.46 ± 7.32	226.29 ± 7.99
<b>HP<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	24.95 ± 4.76	29.60 ± 7.12	27.77 ± 7.68
<b>Eficiencia (%)</b>	90.91 ± 8.43	86.35 ± 3.07	87.67 ± 3.68
<b>HB<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	315.25 ± 47.63	263.01 ± 12.09	262.04 ± 12.49
<b>HB<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	41.21±21.95	46.41 ± 5.69	35.98 ± 12.09
<b>Eficiencia (%)</b>	86.62 ± 7.08	82.49 ± 18.53	86.31 ± 4.46
<b>HV<sub>Inf</sub> (mgDQO/L)</b>	470.96 ± 72.52	311.99 ± 22.92	467.26 ± 8.60
<b>HV<sub>Ef</sub> (mgDQO/L)</b>	20.37 ± 14.33	7.69 ± 5.40	8.60 ± 7.43
<b>Eficiencia (%)</b>	95.39 ± 3.58	97.44 ± 2.23	98.15 ± 1.61

#### 4.4.4 Identificación de PHA por fluorescencia

las tinciones de la biomasa de R2 confirman los resultados obtenidos de en en cada etapa con azul de Nilo (Figura 23), donde se puede observar que la reducción del tiempo del ciclo permitió incrementar la concentración de biomasa acumuladora de PHB, ya que se puede se observar que de la figura 23a a 23c hay un mayor número de células que presentan fluorescencia. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cabrera et al. (2021) quienes aplican como estrategia la reducción del tiempo del ciclo de 9 a 2.6 h, alcanzando relaciones S/A de 0.2 y 0.6 respectivamente, con lo cual logran aumentar la acumulación de 13 a 28 g PHB/g de peso seco (Oshiki et al., 2011).



*Figura 23. Microscopia de fluorescencia a) inóculo, b) etapa 1 (10 días), c) etapa 2 (38 días) y d) etapa 3 (66 días), en R2*

#### **4.4.5 Cuantificación de PHB por gravimetría**

En la figura 24 se muestra el perfil de acumulación de PHB durante la operación del R2. Al inicio de la operación en la etapa 1, la máxima acumulación alcanzada fue de 15.01 g PHB/g peso-seco, este resultado muestra que el cultivo ya fue enriquecido con microorganismos acumuladores de PHB.

La concentración de PHB fue aumentado con el tiempo de operación alcanzando una máxima de 15.19 g PHB/g peso-seco en la etapa 2, siendo un valor similar a lo reportado en la etapa 1. Para la etapa 3 durante los primeros días de operación de dicha etapa la acumulación se mantuvo constante. Reportando una acumulación de 18.64 g PHB/g peso-seco para el día 66, sin embargo, a medida que avanzaba el tiempo de operación se incrementó la acumulación de PHB, ya que en el día 76, se reportó la máxima acumulación de 43.5 g PHB/g peso-seco

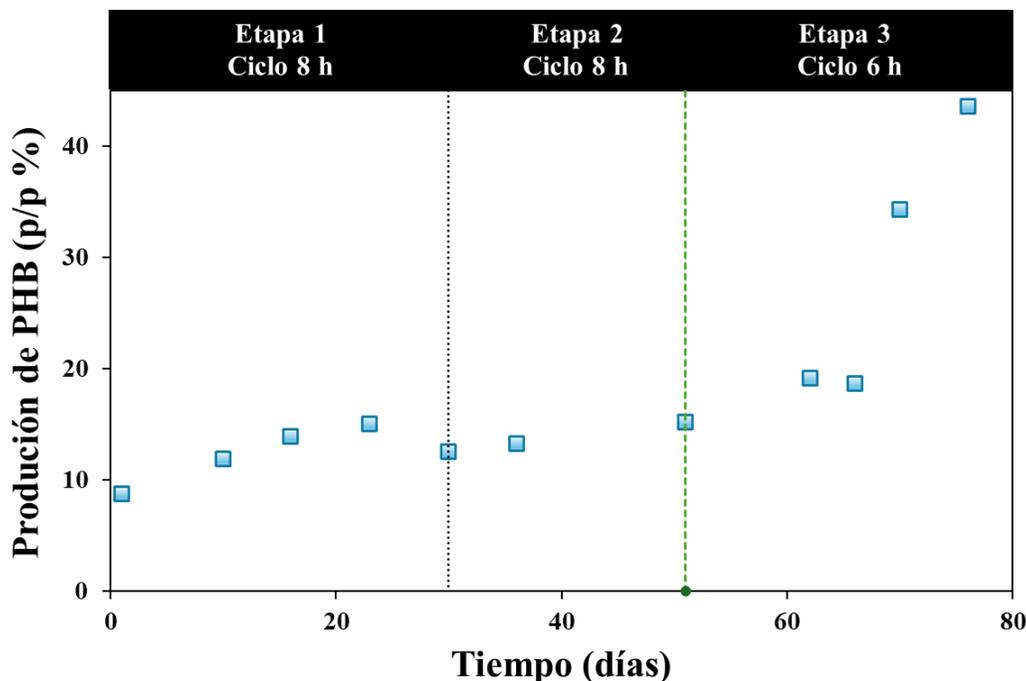


Figura 24. Perfil de acumulación en R2 durante las 3 etapas (■)%PHB

#### 4.5 Efecto de la relación saciedad/ayuno en la producción de PHB

Los cultivos mixtos que se encuentran en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales presentan periodos de S/A similares o los que se inducen en reactores SBR, en estos periodos los microorganismos están siendo alimentados en modalidad ADA, y en condiciones de estrés que estimulan la acumulación de biopolímeros. Sin embargo, las concentraciones de materia orgánica en las aguas residuales municipales y AGV no son suficientes para obtener altos rendimiento de acumulación de PHA (Tavera, 2021).

La estrategia saciedad/ayuno está diseñada para producir regímenes de alta y baja disponibilidad de sustrato mediante la adición de sustrato en ciclos. Esta estrategia ha sido utilizada para favorecer el enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA (Sánchez Valencia, 2016; Dias et al., 2006; Serafim et al., 2004). Durante la etapa de saciedad, la fuente de carbono es consumida en un determinado tiempo y acumulada como material de reserva, mientras que en la fase de ayuno el sustrato se agota y el material de reserva es empleado como fuente de carbono (Kourmentza et al., 2017).

Durante la operación de los dos reactores, se calculó la duración de las etapas de saciedad/ayuno, a partir los perfiles de consumo de OD. En la etapa de saciedad, la concentración

de OD es usado para la oxidación de la materia orgánica cayendo a concentraciones inferiores a 1 mg OD/L, este se mantiene constante mientras exista materia orgánica de fácil degradación. Una vez agotada la materia orgánica de fácil degradación se registra un incremento rápido en la concentración de OD alcanzado en algunos casos la concentración de saturación, lo que indica el final de la fase de saciedad, e inicio de la fase de ayuno (J. M. Dias et al., 2008)

El cálculo de la relación S/A se llevó a cabo por medio de cinéticas en cada ciclo de operación (12, 8 y 6 h) en diferentes días. Las cinéticas se siguieron durante 12 h. En la figura 25, se presentan tres perfiles de consumo de OD durante el ciclo de 12 h, realizadas en las tres etapas de operación de R1. Se observa en la etapa 1, de la cinética realizada en el día 27 de operación, el OD disuelto inicial, antes de adicionar el sustrato, se encontraba en 6.24 mg OD/L. Posteriormente cuando se adicionó el sustrato, el oxígeno fue consumido rápidamente debido a que fue utilizado como aceptor de electrones en el proceso de oxidación de la materia orgánica. La concentración de OD disminuyó rápidamente hasta 1.6 mg/L, lo cual concuerda con el consumo de la materia orgánica de fácil degradación (ARM+AGV). Después de 35 minutos la concentración de OD se va incrementando, alcanzando una concentración de 5.56 mg OD/L, hasta alcanzar la saturación. Con los perfiles obtenidos se calculó la relación S/A, que fue de 0.03, y la acumulación de PHB fue de 7.6 g PHB/g peso seco (Tabla 16). Durante esta etapa donde se llevó a cabo, la aclimatación de los microorganismos y enriquecimiento se observa que la duración de la saciedad es muy corta, esto se debe a que la materia orgánica es fácilmente degradable. Esto concuerda con el perfil de AGV donde se obtuvo una alta eficiencia de remoción, 90% (Tabla 13). Reis et al. (2003) reportaron que una saciedad prolongada promueve el crecimiento y no la acumulación, haciendo que no predominen los microorganismos acumuladores de PHB.

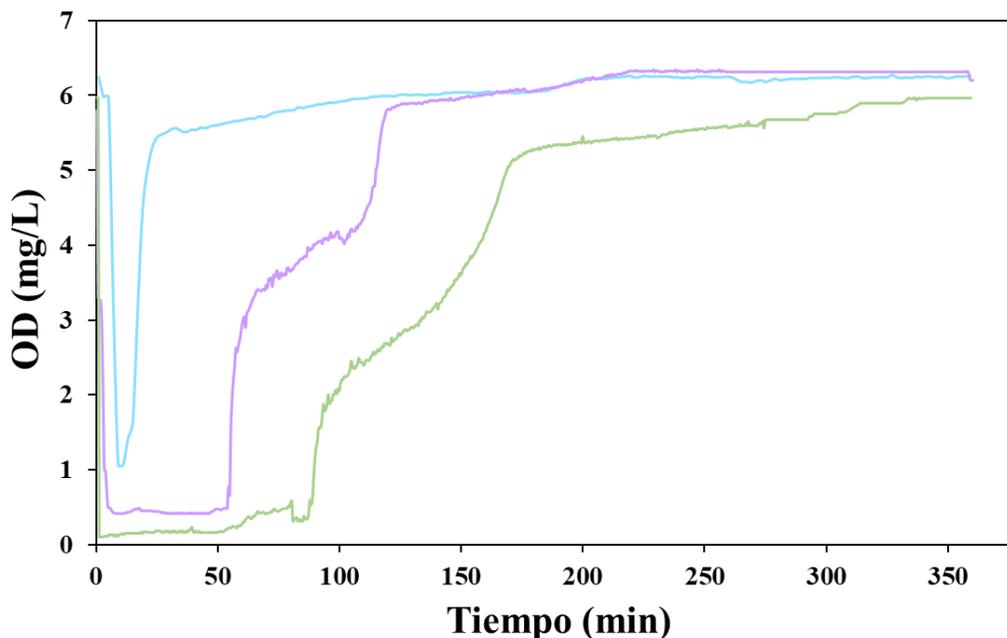


Figura 25. Cinéticas de consumo de OD en el R1 de la etapa 1 (día 27 — azul —), etapa 2 (día 63 — morado —) y etapa 3 (día 122 — verde —)

En la etapa 2, cuando el reactor fue alimentado con los lixiviados de la FORSU, se realizó una cinética (día 62) para determinar la relación S/A y la acumulación de PHB. En esta cinética el OD cae rápidamente hasta 0.42 mg OD/L y se mantiene constante por 54 minutos. Después de este tiempo comienza a incrementarse la concentración del OD disuelto hasta llegar a 6.32 mg OD/L, la relación S/A obtenida en esta etapa fue de 0.13 y una acumulación 19.5 g PHB/g peso-seco (Figura 25). Se ha reportado que una relación S/A menor de 0.33 garantiza la selección de microorganismos acumuladores de PHA (Jayakrishnan et al., 2020). Dentro de este contexto, la relación S/A obtenida en esta etapa está por debajo a lo reportado, así como la producción de PHB, atribuible a que el lodo se encontraba adaptándose al cambio de alimentación. La SOUR obtenida fue de 2.5 mgO<sub>2</sub>/g SSV·min, indicando que los microorganismos estaban llevando un metabolismo activo.

Para la etapa 3, en el día 122 con el incremento de la carga, se puede observar el mismo comportamiento en el consumo de OD (Figura 26), disminuye rápidamente por debajo de 0.5 mg OD/L, en este caso la santidad duro 170 minutos, obteniéndose una relación S/A de 0.25 y una producción de 30.6 g PHB/g peso seco. En la tabla 16 se puede apreciar que la máxima producción

de PHB se registró cuando la relación S/A fue de 0.25, consistente con lo reportado por Reis et al (2003). Sin embargo, conforme la biomasa estuvo expuesta al lixiviado de la FORSU, la relación S/A bajo hasta 0.02 y la producción de PHB cae al 7.6% (Figura 26).

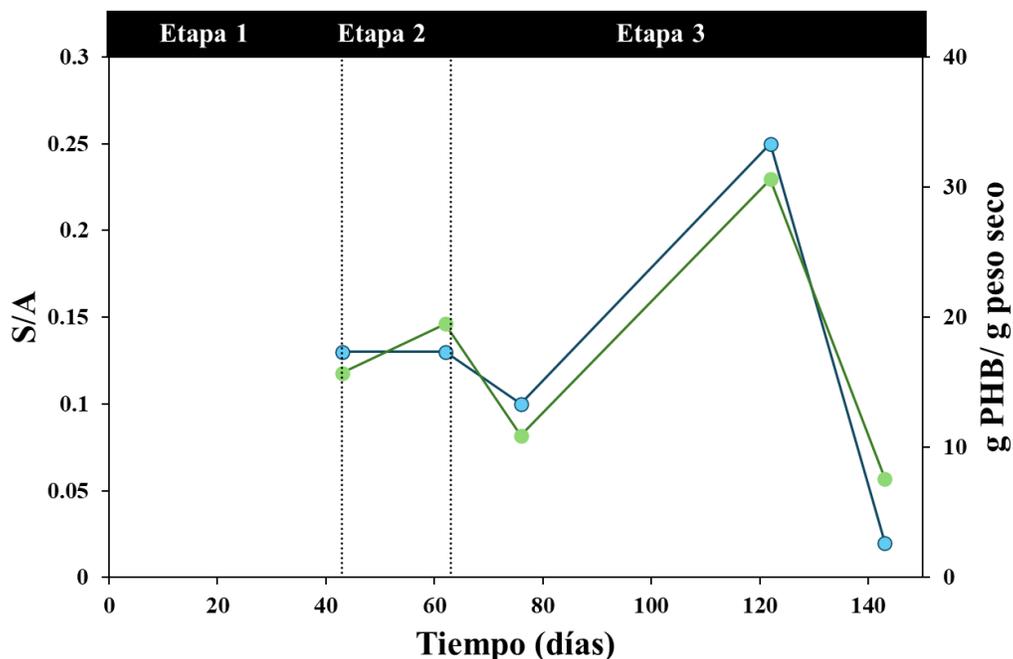


Figura 26. R1 Comportamiento de la S/A (—●—) contra la acumulación de PHB(—●—)

Estos valores están dentro del intervalo que reporta Hao et al., (2018) de S/A debe ser <0.33 para garantizar la implementación de los microorganismos acumuladores de PHB. Algunos autores como Morgan-Sagastume et al., (2019) que por medio de una ADA y la estrategia S/A, obtuvo una relación S/A de 0.25 que permitió acumular un 35 g PHA/g de peso-seco, Colombo et al., (2017), utilizaron lixiviados de la FORSU pretratados, acumulando un 22.3 g PHB/g peso seco con una relación S/A de 0.3.

En la figura 27, se muestran los perfiles de consumo de OD para R2, donde se cambiaron únicamente los ciclos de operación a 8 y 6 h respectivamente. En la etapa 1, se alimentó con los ARM+AGV y en la cinética realizada a los 10 días de operación, el OD inicia en 6.66 mg/L y cae hasta 2.95 mg OD/L en los primeros 10 segundos. Empieza a incrementarse casi inmediatamente hasta alcanzar la saturación. Bajo estas condiciones la relación S/A resultante fue de 0.10, y se registró una acumulación de 11.91 g PHB/g peso seco (Tabla 16)

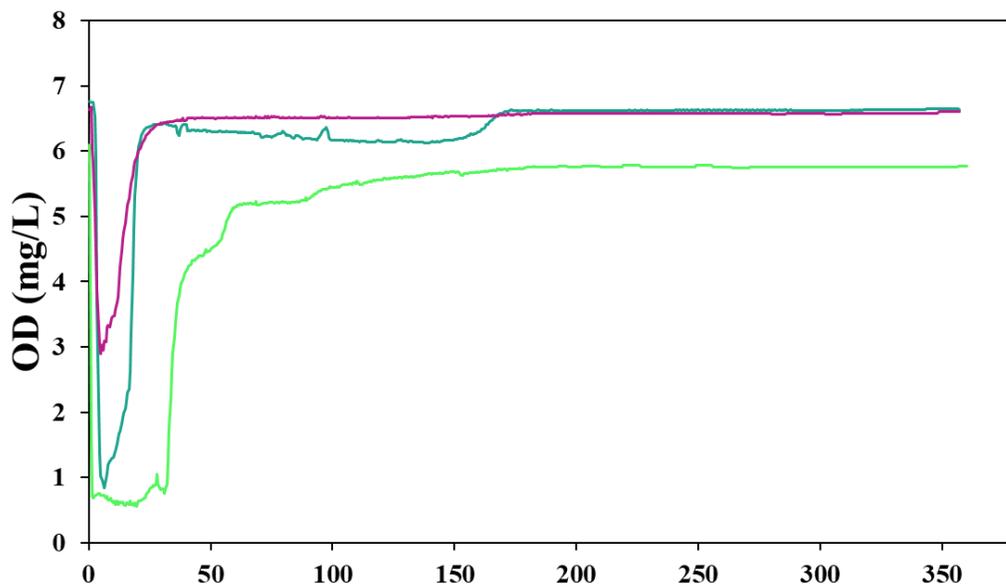


Figura 27. Cinéticas de consumo de OD en el R2 de la etapa 1 (día 10 —), etapa 2 (día 38 —) y etapa 3 (día 66 —)

En la etapa 2 cuando se alimentó con ARM+LIX, podemos observar en la cinética realizada en el día 38 de operación, que el OD inicia en 6.77 mg OD/L y cae hasta 0.89 mg OD/L, siguiendo un perfil semejante a la cinética previa y una relación S/A de 0.13. Se alcanzó una acumulación de 13.1 g PHB/ g peso seco ligeramente superior a la etapa previa que puede ser debida a el incremento en la selección de microorganismos acumuladores de PHB y al cambio de alimentación, en este caso lixiviado.

Para la última etapa el ciclo se redujo a 6 h, el perfil de consumo de OD realizado para la cinética del día 66, el OD inicia con una concentración de 6.09 mg OD/L y disminuye rápidamente a 0.72 mg OD/L y se mantiene constante por 31 minutos y poco a poco vuelve a incrementarse hasta alcanzar una concentración cercana a la saturación. La relación S/A obtenida fue de 0.28 y la producción de PHB en el día 66 fue de 18.6 g PHB/ g peso seco (Figura 28).

Cabe resaltar que la actividad biológica del cultivo va perdiendo su capacidad respiratoria (SOUR), con el tiempo de exposición a los lixiviados. A los 10 días de operación la SOUR registrada fue de 2.45 mg O<sub>2</sub>/g SSV·min, la cual disminuyó gradualmente hasta 1.4 O<sub>2</sub>/g SSV·min al final de la operación (Figura 28). Sánchez et al. (2021) reporta el mismo comportamiento al tratar los lixiviados de la FORSU.

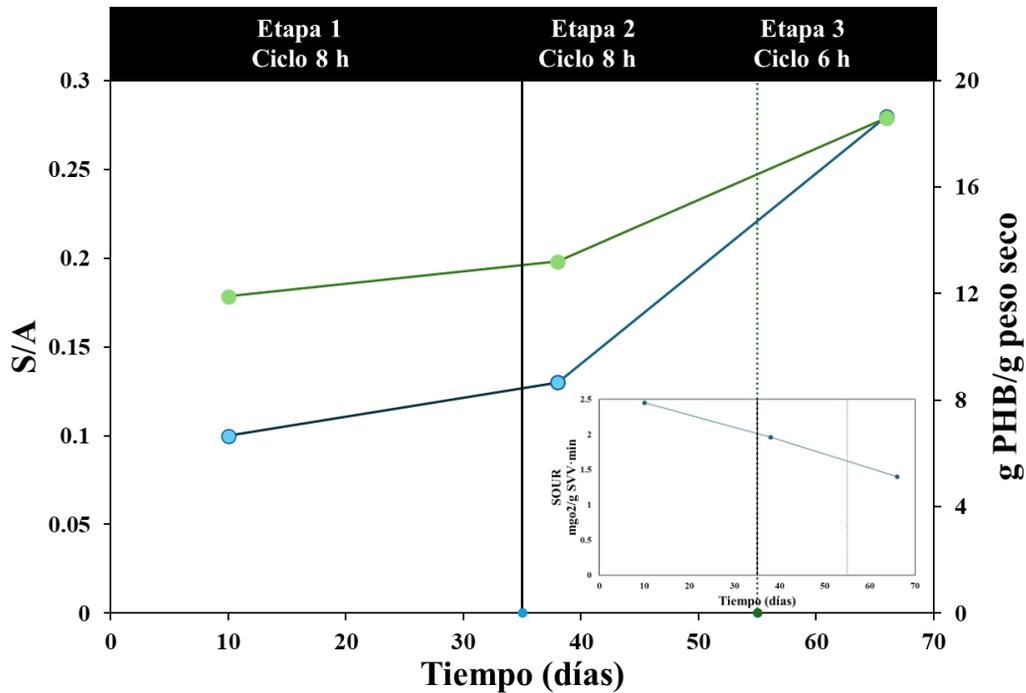


Figura 28. R2 Comportamiento de la S/A (—●—) contra la acumulación de PHB(—●—) y gráfica de la SOUR en cada etapa

Cabrera et al. (2021) reportan una acumulación de PHB de 45.5 g PHB/g peso-seco, cuando controlar la relación S/A en 0.6, usando un medio sintético con ácido acético como fuente de carbono. En este estudio la máxima acumulación de PHB fue obtenida a una relación S/A de 0.25, 30.6 g PHB/g peso seco, se debe considerar la complejidad del sustrato, lixiviados.

En la tabla 16 se muestra las distintas relaciones S/A obtenidas en ambos reactores y como influyeron en la producción de PHB.

Tabla 16. Producción de PHA con diferentes ciclos de operación.

Reactor	Ciclo	Alimentación	Cinética	Carga orgánica	S/A	PHB
R1	12	ARM + AGV	27	4.32	0.03	7.6
		ARM + LIX	62	4.32	0.13	19.5
		ARM + LIX	122	6.38	0.25	30.6
R2	8	ARM + AGV	10	6.20	0.10	11.9
		ARM + LIX	38	6.20	0.13	13.2
		ARM + LIX	66	8.38	0.28	18.6

Ciclo: horas

Cinética: días

Carga orgánica: Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día

PHB: g PHB/g peso-seco

Las figuras 26 y 28 se presentan la relación que existe entre el almacenamiento de PHB y la relación S/A, para R1 y R2, respectivamente. Al analizar R1 en la etapa 3, carga orgánica de 6.38 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día y R2 en la etapa 2, a una carga de 6.20 Kg DQOs/m<sup>3</sup>·día, ambos alimentados con lixiviados, se puede observar que en R1, la relación S/A fue de 0.25 y se obtuvo una acumulación de PHB de 30.6 g PHB/ g peso-seco. Mientras que para R2, la relación S/A fue de 0.13 con una acumulación de 13.2 g PHB/ g peso seco. La baja productividad en R2 puede ser debida al tiempo de operación ya que para R1 la cinética se realizó a los 120 días de operación, mientras que para R2 fue a los 38 días. Estos resultados demuestran que la biomasa en R2 no se encontraba completamente aclimatada al sustrato. Después de los 122 días de operación en R1 se puede apreciar que tanto la relación S/A y producción de PHB aumentan a 30.6 g PHB/ g peso-seco y una S/A de 0.25 (Tabla 16). Mientras que cuando en R2 se incrementa la carga en la etapa 3, con la carga 8.38 kg DQOs/m<sup>3</sup>·día, tanto la relación S/A como la productividad se incrementan a 0.28 y 18.6 g PHB/ g peso-seco, respectivamente. Este comportamiento es similar al reportado por Ozdemir et al., (2014) observan que al operar un reactor con ciclos de 12 y 8 h obtuvieron almacenamiento de PHB de 16 y 18 PHB/g peso-seco, respectivamente.

# **Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones**

### 5.1 Conclusiones

- Los lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales del “Cerro de la Estrella” al ser sometidos a la estrategia S/A fueron enriquecidos con microorganismos acumuladores de PHB en un periodo de 22 días para R1. El enriquecimiento de R2 se dio en menos tiempo (10 días), debido a la reducción del ciclo a 8 h.
- La relación S/A está estrechamente relacionada con el tiempo del ciclo, se garantiza una mayor disponibilidad de sustrato, lo que permite reducir la etapa de ayuno. Además, la disminución del tiempo en los ciclos de operación evita tiempos de ayuno prolongados que podría llevar a los microorganismos a consumir el PHA almacenada.
- En R1, los mejores rendimientos se alcanzaron con una carga orgánica e 6.38 kg DQO/m<sup>3</sup>·día, logrando una acumulación de PHB del 30 g PHB/g peso-seco. Por su parte, en R2, la carga orgánica de 8.32 kg DQO/m<sup>3</sup>·día, resultó en una acumulación de PHB del 43 g PHB/g peso-seco
- Se demostró que la relación S/A influye en la producción de PHB, conforme se incrementa esta se mejora la producción de PHB. Con lixiviados de la FORSU la máxima producción de PHB se obtuvo a una relación S/A 0.25 a una carga 6.38 kg DQO/m<sup>3</sup>·día y una producción de 30.6 g PHB/g peso-seco.
- La tinción con azul Nilo, al ser un colorante específico para PHB, confirmo que este fue el PHA que se sintetizo. Debido a que el lixiviado contiene una variedad de AGV, es posible que se formará el copolímero PHB/PHV.
- En conclusión, las estrategias aplicadas en esta tesis permitieron seleccionar microorganismos acumuladores de bioplásticos, por medio de un proceso sostenible, en el cual se valorizan lixiviados, agua residual municipal y lodos aerobios activados.

## 5.2 Recomendaciones

- Realizar una caracterización más profunda a los lixiviados de Bordo poniente, para poder definir cuáles son los compuestos que inhiben la producción de PHB y la capacidad respiratoria.
- Evaluar estrategias para mantener la actividad del inóculo por largos periodo de operación, al utilizar sustratos que contienen compuestos recalcitrantes, con la finalidad de proponer un sistema que opere en continuo.
- La exposición prolongada a los lixiviados afecta la capacidad respiratoria de los microorganismos, por lo que se recomienda que la operación no sobre pase los 80 días.
- Realizar un análisis molecular para identificar los microorganismos que se encuentran en el cultivo mixto enriquecido e identificar a los responsables de la producción de PHA.
- Identificar con exactitud, por Espectrometría de Infrarrojo el polímero sintetizado, y determinar a qué tipo de polímero o copolímeros de la familia de los PHA pertenece.



## Bibliografía

- Abe, M. M., Martins, J. R., Sanvezzo, P. B., Macedo, J. V., Branciforti, M. C., Halley, P., Botaro, V. R., & Brienzo, M. (2021). Advantages and disadvantages of bioplastics production from starch and lignocellulosic components. *Polymers*, *13*(15), 2484.
- Adeleye, A. T., Odoh, C. K., Enudi, O. C., Banjoko, O. O., Osiboye, O. O., Toluwalope Odediran, E., & Louis, H. (2020). Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry*, *96*, 174-193.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.05.032>
- Albuquerque, M. G. E., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2010a). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water research*, *44*(11), 3419-3433.
- Albuquerque, M. G. E., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2010b). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, *44*(11), 3419-3433.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.021>

- Ali, S. S., Elsamahy, T., Abdelkarim, E. A., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., Ruiz, H. A., Zhao, T., Li, F., & Sun, J. (2022). Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 363, 127869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869>
- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Durántez Jiménez, P., Simonneau, A., Binet, S., & Galop, D. (2019). Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience*, 12(5), 339-344.
- Amulya, K., Jukuri, S., & Venkata Mohan, S. (2015). Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. *Bioresource Technology*, 188, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.070>
- Arcos Hernández, M. V. (2008). *Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un biorreactor discontinuo.*
- Arcos, M., & Vargas, A. (2007). Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante Un biorreactor discontinuo. *Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Arias Roblero, M. (s. f.). *Aprovechamiento de un subproducto del procesamiento del banano para la producción de polihidroxibutirato (PHB) mediante fermentación sumergida.*
- Bedade, D. K., Edson, C. B., & Gross, R. A. (2021). Emergent Approaches to Efficient and Sustainable Polyhydroxyalkanoate Production. *Molecules*, 26(11), 3463. <https://doi.org/10.3390/molecules26113463>
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource technology*, 99(3), 509-516.

- Browning, S., Beymer-Farris, B., & Seay, J. R. (2021). Addressing the challenges associated with plastic waste disposal and management in developing countries. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 32, 100682.
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Alvarez, V., & Lazzeri, A. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polymer Letters*, 8, 791-808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>
- Burniol-Figols, A., Varrone, C., Le, S. B., Daugaard, A. E., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N. (2018). Combined polyhydroxyalkanoates (PHA) and 1, 3-propanediol production from crude glycerol: Selective conversion of volatile fatty acids into PHA by mixed microbial consortia. *Water research*, 136, 180-191.
- Campuzano Angeles, R. (2015). *Lixiviación de residuos sólidos orgánicos urbanos para incrementar la rapidez de producción de biogás*.
- Cárdenas Medina, K. N. (2013). *Tratamiento biológico de escurrimientos de basura orgánica en reactores anaerobios* (p. 9k41zd808) [Especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://doi.org/10.24275/uami.9k41zd808>
- Cardona Echavarría, A. C., Mora Martínez, A. L., & Marín Montoya, M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(2), 7129-7140.
- Carlozzi, P., Di Lorenzo, T., Ghanotakis, D. F., & Touloupakis, E. (2020). Effects of pH, temperature and salinity on P3HB synthesis culturing the marine *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2007-2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10352-1>
- Casillas, D. A. V. (s. f.). *ADVANCED WATER MANAGEMENT CENTRE, UNIVERSITY OF QUEENSLAND, CAMPUS ST. LUCIA, QUEENSLAND, AUSTRALIA*. 147.

- Castilho, L. R., Mitchell, D. A., & Freire, D. M. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource technology*, *100*(23), 5996-6009.
- Castilla-Hernández, P., Cárdenas-Medina, K., Hernández-Fydrych, V., Fajardo-Ortiz, C., & Meraz-Rodríguez, M. (2016). Compost Leachates Treatment in a Two-Phase Acidogenic-Methanogenic System for Biofuels Production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *15*(1), 175-183.
- Celletti, S., Fedeli, R., Ghorbani, M., & Loppi, S. (2023). Impact of starch-based bioplastic on growth and biochemical parameters of basil plants. *Science of The Total Environment*, *856*, 159163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159163>
- Chen, G.-Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, *26*(33), 6565-6578.
- Chianese, S., Fenti, A., Iovino, P., Musmarra, D., & Salvestrini, S. (2020). Sorption of Organic Pollutants by Humic Acids: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(4), 918. <https://doi.org/10.3390/molecules25040918>
- Chua, A. S. M., Takabatake, H., Satoh, H., & Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: Effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, *37*(15), 3602-3611. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00252-5)
- Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T. P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., & Adani, F. (2017a). Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for biofuels*, *10*, 1-15.

- Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T. P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., & Adani, F. (2017b). Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for Biofuels*, *10*(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0888-8>
- Colombo, B., Sciarria, T. P., Reis, M., Scaglia, B., & Adani, F. (2016). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from fermented cheese whey by using a mixed microbial culture. *Bioresource technology*, *218*, 692-699.
- da Cruz Pradella, J. G., Taciro, M. K., & Mateus, A. Y. P. (2010). High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. *Bioresource technology*, *101*(21), 8355-8360.
- Delgado, A. C. L., & Cordoba, A. M. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico*, *79*(1), 83-101.
- Dias, J. M. L., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., Ramos, A. M., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2006). Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience*, *6*(11), 885-906. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600112>
- Dias, J. M., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G., Ramos, A. M., Oliveira, R., & Reis, M. A. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromolecular bioscience*, *6*(11), 885-906.
- Dias, J. M., Oehmen, A., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Reis, M. A., & Oliveira, R. (2008). Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed

- microbial cultures. *BMC Systems Biology*, 2(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-59>
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L. F., & Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy—Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable production and consumption*, 9, 58-70.
- Diez, A. E. A., & Sandoval, L. M. C. (2012). BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES, A SUSTAINABLE ALTERNATIVE TO THE USE OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES. *Vitae*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.14331>
- Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., & Beccari, M. (2004). Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(6), 569-579. <https://doi.org/10.1002/bit.10910>
- Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., & Beccari, M. (2006a). Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 76-88. <https://doi.org/10.1002/bit.20683>
- Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., & Beccari, M. (2006b). Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 76-88. <https://doi.org/10.1002/bit.20683>
- Eikelboom, D. H. (2000). *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*. IWA Publishing.
- Elements of Chemical Reaction Engineering*. (s. f.). Recuperado 6 de diciembre de 2022, de <http://websites.umich.edu/~elements/5e/05chap/prof.html>

- European Bioplastics. (s. f.). *Clasificación de los Bioplásticos*. <https://www.european-bioplastics.org/>
- Fauzi, A. H. M., Chua, A. S. M., Yoon, L. W., Nittami, T., & Yeoh, H. K. (2019). Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 200-208.
- Franz, A., Song, H.-S., Ramkrishna, D., & Kienle, A. (2011). Experimental and theoretical analysis of poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) formation and consumption in *Ralstonia eutropha*. *Biochemical Engineering Journal*, 55(1), 49-58.
- Frías, A. C., Lema, I. I., & García, A. G. (2003). La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta ecológica*, 69, 67-82.
- Gahlawat, G., Kumari, P., & Bhagat, N. R. (2020). Technological Advances in the Production of Polyhydroxyalkanoate Biopolymers. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*, 7(3), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s40518-020-00154-4>
- Gayosso-Sánchez, A. P., Hernández-Martínez, R., Pacheco-López, N. A., Herrera-Corredor, J. A., Valdivia-Rivera, S., & Herrera-Pool, I. E. (s. f.). *Effect of the carbon-nitrogen ratio on the co-production of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides by Enterobacter soli*  
*Efecto de la relación carbono-nitrógeno en la coproducción de polihidroxicanoatos y exopolisacáridos por Enterobacter soli*.
- Gómez Cardozo, J. R. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos*. Universidad Nacional de Colombia.
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.

- Grousseau, E., Blanchet, E., Déléris, S., Albuquerque, M. G., Paul, E., & Uribe Larrea, J.-L. (2014). Phosphorus limitation strategy to increase propionic acid flux towards 3-hydroxyvaleric acid monomers in *Cupriavidus necator*. *Bioresource technology*, *153*, 206-215.
- Guleria, S., Singh, H., Sharma, V., Bhardwaj, N., Arya, S. K., Puri, S., & Khatri, M. (2022). Polyhydroxyalkanoates production from domestic waste feedstock: A sustainable approach towards bio-economy. *Journal of Cleaner Production*, *340*, 130661.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130661>
- Hao, J., Wang, H., & Wang, X. (2018). Selecting optimal feast-to-famine ratio for a new polyhydroxyalkanoate (PHA) production system fed by valerate-dominant sludge hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(7), 3133-3143.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8799-6>
- Hermida, E., & Díaz, G. (2003). *CAMBIO MICROESTRUCTURALES DURANTE LA CRISTALIZACIÓN DE POLIÉSTERES BIODEGRADABLES*.
- Huijberts, G. N., de Rijk, T. C., de Waard, P., & Eggink, G. (1994). <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis. *Journal of Bacteriology*, *176*(6), 1661-1666.
- Jayakrishnan, U., Deka, D., & Das, G. (2020). Influence of inoculum variation and nutrient availability on polyhydroxybutyrate production from activated sludge. *International Journal of Biological Macromolecules*, *163*, 2032-2047.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.061>
- Jayakrishnan, U., Deka, D., & Das, G. (2021). Waste as feedstock for polyhydroxyalkanoate production from activated sludge: Implications of aerobic dynamic feeding and

- acidogenic fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105550.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105550>
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., & Radecka, I. (2016a). Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., & Radecka, I. (2016b). Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/ijms17071157>
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & van Loosdrecht, M. C. M. (2011). Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. *The ISME journal*, 5(5), 896-907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.174>
- Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 147(2), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.02.003>
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., & Doi, Y. (2004). High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, 83(1), 79-86. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00227-1)
- Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E., & Singh, S. P. (2007). Compostability of bioplastic packaging materials: An overview. *Macromolecular bioscience*, 7(3), 255-277.
- Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., & Singh, G. D. (2021). Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis to commercial production-A review. *Journal of Microbiology, biotechnology and Food sciences*, 2021, 1098-1106.

- Kavitha, G., Kurinjimalar, C., Sivakumar, K., Kaarthik, M., Aravind, R., Palani, P., & Rengasamy, R. (2016). Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing waste water as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 534-542.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.019>
- Khatami, K., Perez-Zabaleta, M., Owusu-Agyeman, I., & Cetecioglu, Z. (2021). Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste Management*, *119*, 374-388.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, *43*(9), 892-898.  
<https://doi.org/10.1002/bit.260430908>
- Kim, S. W., Kim, P., Lee, H. S., & Kim, J. H. (1996). High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnology letters*, *18*, 25-30.
- Koller, M. (2018a). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation*, *4*(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Koller, M. (2018b). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. *Fermentation*, *4*(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation4020030>
- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Martinz, J., Neto, J., Pereira, L., & Varila, P. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, *6*(2), 561-565.

- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C., Hesse, P., & Braunegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, *99*(11), 4854-4863.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.049>
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*, *37*, 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Korkakaki, E., Mulders, M., Veeken, A., Rozendal, R., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2016a). PHA production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Overcoming the inhibitory matrix. *Water Research*, *96*, 74-83.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.033>
- Korkakaki, E., Mulders, M., Veeken, A., Rozendal, R., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2016b). PHA production from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Overcoming the inhibitory matrix. *Water Research*, *96*, 74-83.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.033>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, *4*(2), 55.
- Lee, S. Y., Lee, Y. K., & Chang, H. N. (1995). Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly (3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. *Journal of fermentation and bioengineering*, *79*(2), 177-180.
- Lee, S. Y., Wong, H. H., Choi, J., Lee, S. H., Lee, S. C., & Han, C. S. (2000). Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of

- Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(4), 466-470.
- Lee, W. S., Chua, A. S. M., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83-99. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.002>
- Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Nomura, C. T., & Sudesh, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology*, 99(15), 6844-6851. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.051>
- Lemos, P. C., Serafim, L. S., & Reis, M. A. M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122(2), 226-238. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.09.006>
- Liu, H.-Y., Hall, P. V., Darby, J. L., Coats, E. R., Green, P. G., Thompson, D. E., & Loge, F. J. (2008). Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater. *Water Environment Research*, 80(4), 367-372. <https://doi.org/10.2175/106143007X221535>
- Liu, K., Wu, T., Wang, X., Song, Z., Zong, C., Wei, N., & Li, D. (2019). Consistent transport of terrestrial microplastics to the ocean through atmosphere. *Environmental science & technology*, 53(18), 10612-10619.
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., & Suárez-Ojeda, M. E. (2019). Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource technology*, 282, 361-369.

- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(1), 1-9.
- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 142, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.031>
- Matos, M., Cruz, R. A. P., Cardoso, P., Silva, F., Freitas, E. B., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2021). Sludge retention time impacts on polyhydroxyalkanoate productivity in uncoupled storage/growth processes. *Science of The Total Environment*, 799, 149363. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149363>
- Metcalf & Eddy, I. (2003). *Wastewater engineering: Treatment and reuse*. Fourth edition / revised by George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel. Boston : McGraw-Hill, [2003] ©2003. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999935704402121>
- Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2006). The Kinetic Sub-model of SSF Bioreactor Models: General Considerations. En D. A. Mitchell, M. Berovič, & N. Krieger (Eds.), *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation* (pp. 191-206). Springer. [https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2\\_14](https://doi.org/10.1007/3-540-31286-2_14)
- Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Zanaroli, G., Majone, M., & Werker, A. (2019a). Acclimation process for enhancing polyhydroxyalkanoate accumulation in activated-sludge biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 1065-1082.
- Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Zanaroli, G., Majone, M., & Werker, A. (2019b). Acclimation process for enhancing polyhydroxyalkanoate accumulation in activated-sludge biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 10, 1065-1082.

- Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Zanaroli, G., Majone, M., & Werker, A. (2019c). Acclimation Process for Enhancing Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Activated-Sludge Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 10(4), 1065-1082. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0122-8>
- Morton-Jones, D. H. (2012). *Procesamiento de plásticos: Inyección, modelo, hule, pvc* (1a ed). Limusa.
- Mothes, G., Schnorpfeil, C., & Ackermann, J. -U. (2007). Production of PHB from Crude Glycerol. *Engineering in Life Sciences*, 7(5), 475-479. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620210>
- Munir, S., & Jamil, N. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *Journal of basic microbiology*, 58(3), 247-254.
- Navarro, A. A. (s. f.). *Micro-plásticos. Haciéndose camino en nuestro planeta*.
- Ortega, G., Otero, M. A., Bello Gil, D., Saura, G., & Martínez, J. (2006). Poli-hidroxitiratos: Generalidades, aislamiento y cuantificación. *Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros*, 595, 81-84.
- Oshiki, M., Satoh, H., & Mino, T. (2011). Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Science and Technology*, 64(3), 747-753. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.707>
- Ostle, A. G., & Holt, J. G. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), 238-241. <https://doi.org/10.1128/aem.44.1.238-241.1982>

- Ozdemir, S., Akman, D., Cirik, K., & Cinar, O. (2014). Effect of Cycle Time on Polyhydroxybutyrate (PHB) Production in Aerobic Mixed Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2390-2399. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0676-2>
- Pathak, S., Sneha, C. L. R., & Mathew, B. B. (2014). Bioplastics: Its timeline based scenario & challenges. *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem*, 2(4), 84-90.
- Pereira, T. F., Oliveira, M. F., Maia, I. A., Silva, J. V. L., Costa, M. F., & Thiré, R. M. S. M. (2012). 3D Printing of Poly(3-hydroxybutyrate) Porous Structures Using Selective Laser Sintering. *Macromolecular Symposia*, 319(1), 64-73. <https://doi.org/10.1002/masy.201100237>
- Pérez, J. P. G. (2014). *La industria del plástico en México y el mundo*. 4.
- Prasanna Kumar, D. J., Mishra, R. K., Chinnam, S., Binnal, P., & Dwivedi, N. (2024). A comprehensive study on anaerobic digestion of organic solid waste: A review on configurations, operating parameters, techno-economic analysis and current trends. *Biotechnology Notes*, 5, 33-49. <https://doi.org/10.1016/j.biotno.2024.02.001>
- Prieto, A. (2020). *Los bioplásticos, ¿qué son? ¿cuántos hay? ¿cómo se producen?* Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. [https://doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_ANC.2020.08.1](https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2020.08.1)
- Punrattanasin, W., Randall, A. A., & Randall, C. W. (2006). Aerobic production of activated sludge polyhydroxyalkanoates from nutrient deficient wastewaters. *Water science and technology*, 54(8), 1-8.
- Queirós, D., Fonseca, A., Rossetti, S., Serafim, L. S., & Lemos, P. C. (2017). Highly complex substrates lead to dynamic bacterial community for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(8), 1215-1224.

- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., & Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 1687-1696.
- Ramadas, N. V., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2013). Development of a novel solid-state fermentation strategy for the production of poly-3-hydroxybutyrate using polyurethane foams by *Bacillus sphaericus* NII 0838. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1265-1274. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0584-7>
- Ramos Gómez, M. C. (2019). *Enriquecimiento de bacterias psicrófilas fijadoras de nitrógeno en reactores biológicos secuenciales (SBR)*.
- Ravichandran, S., & R, V. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486.
- Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2003a). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, 25(6), 377-385.
- Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2003b). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25(6), 377-385. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0322-4>
- Reyes-Lara, S., & Reyes-Mazzoco, R. (2009). Efecto de las cargas hidráulica y orgánica sobre la remoción másica de un empaque estructurado en un filtro percolador. *Revista mexicana de ingeniería química*, 8(1), 101-109.
- Rueda, E., Gonzalez-Flo, E., Roca, L., Carretero, J., & García, J. (2022). Accumulation of polyhydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. isolated from wastewaters: Effect of salinity,

- light, and P content in the biomass. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107952. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107952>
- Ryu, H. W., Cho, K. S., Goodrich, P. R., & Park, C.-H. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD using swine wastewater: Effect of supplementing glucose, yeast extract, and inorganic salts. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(6), 651-658. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0072-x>
- Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K., & Chang, H. N. (1997). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(1), 28-32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970705\)55:1<28::AID-BIT4>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<28::AID-BIT4>3.0.CO;2-Z)
- Sabapathy, P. C., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zabed, H. M., & Qi, X. (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306, 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004a). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology advances*, 22(3), 261-279.
- Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004b). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology advances*, 22(3), 261-279.
- Sam, T., Le Roes-Hill, M., Hoosain, N., & Welz, P. J. (2022). Strategies for Controlling Filamentous Bulking in Activated Sludge Wastewater Treatment Plants: The Old and the New. *Water*, 14(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/w14203223>

- Sánchez Valencia, Á. I. (2016). *Producción de bioplástico polihidroxicanoatos (PHB) a partir de lixiviados de basura orgánica* (p. f7623c602) [Maestro en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa]. <https://doi.org/10.24275/uami.f7623c602>
- Sánchez Valencia, A. I., Rojas Zamora, U., Meraz Rodríguez, M., Álvarez Ramírez, J., Salazar Peláez, M. L., & Fajardo Ortiz, C. (2021). Effect of C/N ratio on the PHA accumulation capability of microbial mixed culture fed with leachates from the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101975. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.101975>
- SANTOS, M. de los Á. M., Rubio, F. M. A., GONZÁLEZ, F. C., & Martín, A. M. (2003). Un proceso biológico muy flexible para la depuración biológica de aguas residuales: El reactor SBR. *UNED Centro Asociado Córdoba Curso 2002/03*, 15.
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14(3), 361-372.
- Serafim, L. S. (2006). Biodegradable polymers produced by mixed cultures from renewable sources. *European Conference on Biorefinery Research–2006*. [http://ec.europa.eu/research/energy/pdf/gp/gp\\_events/biorefinery/bs2\\_04\\_serafim\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/research/energy/pdf/gp/gp_events/biorefinery/bs2_04_serafim_en.pdf) [Accessed: December, 2014].
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Albuquerque, M. G., & Reis, M. A. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology*, 81, 615-628.
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004a). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145-160. <https://doi.org/10.1002/bit.20085>

- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004b). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145-160.  
<https://doi.org/10.1002/bit.20085>
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2004c). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145-160.  
<https://doi.org/10.1002/bit.20085>
- Shen, M., Song, B., Zeng, G., Zhang, Y., Huang, W., Wen, X., & Tang, W. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*, 263, 114469.
- Sindhu, R., Pandey, A., & Binod, P. (2015). Solid-state fermentation for the production of poly (hydroxyalkanoates). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(2), 173-181.
- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *Int J Sci Nat*, 3(3), 480-486.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Sukumaran, N. P., & Gopi, S. (2021). Overview of biopolymers: Resources, demands, sustainability, and life cycle assessment modeling and simulation. En *Biopolymers and their industrial applications* (pp. 1-19). Elsevier.
- Taguchi, H., & Lama, B. (2016). Do Emigrant's Remittances Cause "Dutch Disease"? : The Case of Nepal and Bangladesh. *Research in Applied Economics*, 8(4), 1.  
<https://doi.org/10.5296/rae.v8i4.10044>

- Tavera, W. (2021). *Producción de polihidroxicanoatos (PHA) por biomasa granular aerobia a partir de lixiviados de residuos orgánicos*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Third, K. A., Newland, M., & Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(2), 238-250.
- Tsuge, T., Taguchi, K., Seiichi, Taguchi, & Doi, Y. (2003). Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: Metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(4), 195-205.  
[https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00082-X)
- Una vida de plástico—Ciencia UNAM*. (s. f.). Recuperado 8 de diciembre de 2022, de <https://ciencia.unam.mx/leer/766/una-vida-de-plastico>
- Valdovinos Lepine, A. (2018). *Tiempo de residencia medio para diseño de digestores anaerobios de residuos orgánicos urbanos*.
- Valencia, J. A. R., Valencia, J. D., & Ibáñez, D. A. R. (2015). SISTEMA DE MONITOREO Y CONTROL BASADO EN EL SOFTWARE RTMC APLICADO AL PROCESO DE BIODIGESTIÓN ANAERÓBICA. *REVISTA COLOMBIANA DE TECNOLOGIAS DE AVANZADA (RCTA)*, 2(26), 1-8.
- Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., & Majone, M. (2019). Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Combined Treatment of Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Sewage Sludge. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(27), 12149-12158. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b01831>

- Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Campanari, S., Villano, M., Werker, A., & Majone, M. (2017). Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology*, 37, 9-23. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.007>
- Vásquez Vanegas, A. M. (2013). *Producción de xilanasas por aspergillus sp: En fermentación sumergida y fermentación en medio sólido*. Universidad Iberoamericana Ciudad de México. Departamento de Ingeniería y ....
- Vögeli, Y. (2014). *Anaerobic digestion of biowaste in developing countries: Practical information and case studies*. Eawag-Sandec.
- Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2006). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 53(6), 175-180. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.193>
- Zhang, D., Jiang, H., Chang, J., Sun, J., Tu, W., & Wang, H. (2019). Effect of thermal hydrolysis pretreatment on volatile fatty acids production in sludge acidification and subsequent polyhydroxyalkanoates production. *Bioresource Technology*, 279, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.077>
- Zhang, X., Lin, Y., Wu, Q., Wang, Y., & Chen, G.-Q. (2020a). Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 689-700. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.006>
- Zhang, X., Lin, Y., Wu, Q., Wang, Y., & Chen, G.-Q. (2020b). Synthetic Biology and Genome-Editing Tools for Improving PHA Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 689-700. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.10.006>

- Zhang, Y., Kang, S., Allen, S., Allen, D., Gao, T., & Sillanpää, M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*, *203*, 103118. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103118>
- Zhila, N., & Shishatskaya, E. (2018). Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 1019-1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.130>

**Anexos**

Ecuaciones de la recta y coeficientes de variación de las técnicas analíticas.

**Demanda Química Orgánica (DQO)**

La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones conocidas de glucosa 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g/L y su respectivo blanco. En cada tubo Hach se colocaron 2 mL de muestra, se añadió 1 mL de solución digestora y 2 mL de solución catalizadora. Se mezclan lentamente y se colocaron en el digestor a una temperatura de 150 °C por dos horas. Posteriormente se deja enfriar y se mide la absorbancia a 620 nm. Finalmente se graficaron las concentraciones obtenidas y se realizó la curva de calibración, empleando el método de mínimos cuadrados, con ello se realizó una regresión lineal obteniendo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.

<b>Ecuación</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
$x=(y-0.0005)/0.0004$	0.9961
$x=(y+0.0057)/0.0004$	0.9972
$x=(y+0.0038)/0.0004$	0.9931
$x= (y-0.0021)/0.0004$	0.9980
$x= (y-0.0006)/0.0004$	0.9984
$x= (y-0.0069)/0.0004$	0.9991
$x= (y+0.0016)/0.0004$	0.9985

**Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

Se realizó una curva de calibración en la cual se ocupan tubos de hach y se les coloco 5 mL de una solución de una concentración conocida (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L) y un blanco. Se le agrego 200 µL de Fenol, 200 µL de Nitroprusiato y posteriormente se le adicionan µL de solución oxidante fresca. Se tapaban y las muestras se metían a la oscuridad por 2 h, transcurrido el tiempo se leían a 640 en el espectrofotómetro. Las absorbancias arrojadas se graficaron para obtener la curva de calibración.

<b>Ecuación</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
$x=(y-0.007)/1.4596$	0.9972
$x=(y-0.0634)/1.0482$	0.9762
$x=(y-0.0151)/1.2748$	0.9951
$x=(y-0.0007)/1.4226$	0.9971
$x=(y-0.0171)/1.3338$	0.9965
$x=(y-0.0018)/1.1896$	0.9953
$x=(y-0.201)/1.0823$	0.9798

### Ácidos Grasos Volátiles (AGV)

La determinación de AGV's, se realizó para el influente y efluente del reactor, se cuantificaron ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido isovalérico y ácido valérico.

Para el análisis de los AGV's se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A, Shanghai, con una columna Agilent J&W DB-FFAP, utilizando nitrógeno como gas portador, con un detector de de ionización de flama (FID). Las condiciones de análisis fueron las siguientes:

Temperatura del detector: 200 °C

Temperatura del inyector: 200 °C

Temperatura de horno: 80- 200 °C, (25°C/min)

Tiempo de análisis: 7 minutos

Volumen de inyección: 0.5 µL

<b>Ecuación</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
$x=(y+58.4207)/0.7394$	0.9873
$x=(y+130.9413)/1.7864$	0.9948
$x=(y+186.7528)/2.2185$	0.9952
$x=(y+194.4901)/2.2541$	0.9965

### Parámetros cinéticos de $qrDOs$ y $qrNH_4^+$

Para evaluar la eficiencia del tratamiento de las tasas de remoción específica para la DQOs y el  $NH_4^+$ , se calcularon mediante la ecuación obtenida a partir del gráfico de concentración en función con el tiempo. Se utiliza la siguiente expresión derivada del gráfico:

#### 1. Tas de remoción específica de DQO

$$qrDQOs = -\frac{\Delta DQO}{\Delta t} \cdot \frac{1}{X}$$

Donde:

$$qrDQOs = 0.0115 \text{ g DQO/L}\cdot\text{min}$$

Este valor lo estuvimos reportando en días

$$qrDQOs = 16.56 \text{ g DQO/L}\cdot\text{día}$$

#### 2. Tasa de remoción específica de amonio

$$qrNH_4^+ = -\frac{\Delta NH_4^+}{\Delta t} \cdot \frac{1}{X}$$

Donde:

$$qrNH_4^+ = 1.217 \text{ mg DQO/L}\cdot\text{min}$$

Este valor lo estuvimos reportando en días

$$qrNH_4^+ = 1742.4 \text{ mg DQO/L}\cdot\text{día}$$

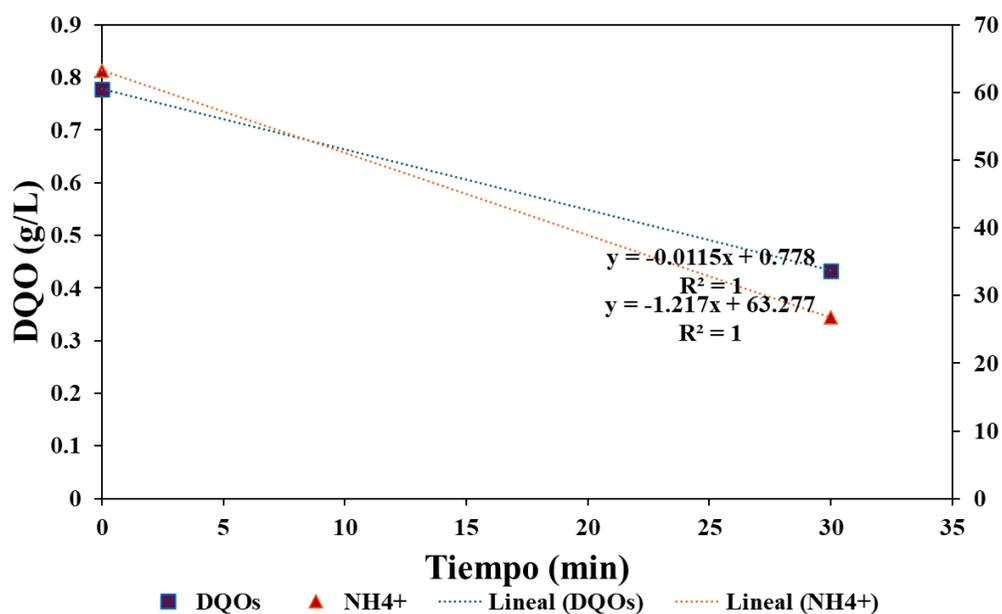


Figura 29. Parámetros cinéticos de  $qrDOs$  y  $qrNH_4^+$

### Cálculo de la relación S/A

Ejemplo:

Se determino en función del rápido aumento de la concentración de OD que nos indica el final de la fase de saciedad. La cinética que se presenta en la figura 29, duro 360 minutos y corresponde a la etapa 1 que operó con ciclos de 12 h. La distribución del ciclo fue el siguiente: 5 minutos de ADA, 680 minutos de reacción, 30 minutos de sedimentación y 5 minutos de drenado.

Una vez finalizada la fase de alimentación el OD comienza a consumir toda la materia orgánica fácilmente biodegradable, en ese momento comienza la fase de saciedad y termina una vez que el OD vuelve a incrementar. Se calculo a través de la siguiente expresión:

$$S/A = \frac{t_{Saciedad}}{t_{Reaccion}}$$

Sustituyendo:

$$t_{Saciedad} = 68$$

$$t_{Reaccion} = 680$$

$$S/A = 0.10$$

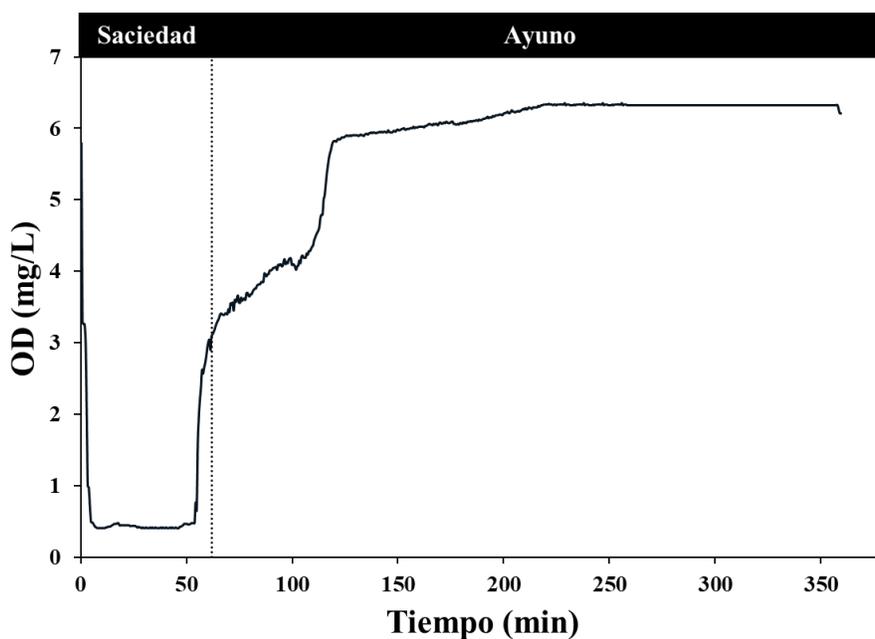


Figura 30. Cinética de consumo de OD



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00115  
Matrícula: 2213801106

EFFECTO DE LA RELACIÓN  
SACIEDAD AYUNO EN EL  
ENRIQUECIMIENTO DE BIOMASA  
ACUMULADORA DE  
POLIHIDROXIBUTIRATO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ULISES DURAN HINOJOSA  
DR. ULISES ROJAS ZAMORA  
DRA. DENISSE SERRANO PALACIOS



DIANA GABRIELA CARREON BECERRIL

ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE)

DE: DIANA GABRIELA CARREON BECERRIL

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. ROMAN LINARES ROMERO

PRESIDENTE

DR. ULISES DURAN HINOJOSA

VOCAL

DR. ULISES ROJAS ZAMORA

SECRETARIA

DRA. DENISSE SERRANO PALACIOS