



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**

**INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**MODELADO MATEMÁTICO DE LA ACUMULACIÓN DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) EN CULTIVOS  
MIXTOS DURANTE EL TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN INGENIERÍA**

INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A:

**LILIANA MONTAÑO HERRERA**



**INSTITUTO  
DE INGENIERÍA  
UNAM**

TUTOR:  
**DR. ALEJANDRO VARGAS CASILLAS**

2011

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dr. Jorge Luis de Victorica Almeida

SECRETARIO: Dra. Mónica Meraz Rodríguez

VOCAL: Dr. Alejandro Vargas Casillas

1ER. SUPLENTE: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

2DO. SUPLENTE: Dr. Daniel Genaro Segura González

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas en la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México

**DIRECTOR DE TESIS:**

---

DR. ALEJANDRO VARGAS CASILLAS



**INSTITUTO  
DE INGENIERÍA  
UNAM**

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el marco del proyecto “Mecanismos de Producción de Polímeros Biodegradables a partir de Aguas Residuales”.

Asimismo, el autor este trabajo recibió una beca de posgrado de CONACyT y del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

---

# Agradecimientos

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas por su asesoría durante la realización de mi proyecto de investigación. Así como por el tiempo dedicado, el interés mostrado en mi formación académica y el apoyo constante.

A mi Comité Tutoral compuesto por la Dra. Mónica Meraz Rodríguez y el Dr. Jorge Luis de Victorica Almeida, por los aportes que ayudaron a elevar la calidad de este proyecto.

Al Dr. Daniel Segura González y al Dr. Víctor Luna Pabello, por formar parte del Jurado de revisión de tesis, por las acertadas observaciones que enriquecieron este documento.

Al M. en B. Jaime Pérez Trevilla y a la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez por valiosa ayuda durante la realización de mi trabajo experimental y asesoría técnica.

A los investigadores del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Ingeniería y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mis compañeros en la Unidad Académica Juriquilla y de la Maestría en Ingeniería Ambiental.

## CONTENIDO

I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
II. ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
III. ABREVIATURAS.....	x
IV. NOMENCLATURA.....	xii
Resumen.....	1
Summary.....	2
Capítulo 1 Introducción.....	3
Capítulo 2 Objetivos.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
Capítulo 3 Antecedentes.....	6
3.1. Propiedades fisicoquímicas de los polihidroxialcanoatos.....	6
3.2. Relevancia industrial y ambiental de los PHA.....	8
3.3. Producción de PHA por cultivos mixtos.....	11
3.3.1. Sistemas de producción.....	11
3.3.2. Alimentación dinámica aerobia.....	12
3.3.3. Mecanismos de síntesis y degradación.....	13
3.3.4. Modelo metabólico.....	14
3.3.5. Parámetros y estrategias de operación.....	15
3.4. Modelado matemático de cultivos mixtos.....	17
3.4.1. Generalidades.....	17
3.4.2. Modelos propuestos para cultivos mixtos.....	19
Capítulo 4 Desarrollo experimental.....	21
4.1. Estrategia experimental.....	21
4.2. Sistema de producción de PHA.....	23
4.2.1. Inóculo.....	24

4.2.2.	Agua residual modelo .....	24
4.2.3.	Reactor de enriquecimiento selectivo (RES) .....	25
4.2.3.1.	Descripción .....	25
4.2.3.2.	Operación del reactor de enriquecimiento selectivo.....	26
4.2.4.	Reactor de producción de PHA (RP).....	27
4.2.4.1.	Descripción del reactor de producción .....	27
4.2.4.2.	Operación del reactor de producción .....	28
4.2.4.3.	Estrategia de alimentación .....	29
4.3.	Métodos analíticos.....	32
4.3.1.	Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos.....	32
4.3.2.	Nitrógeno amoniacal .....	32
4.3.3.	Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	32
4.3.4.	Determinación de polihidroxialcanoatos (PHA) por cromatografía de gases .....	33
4.3.5.	Tinciones .....	33
4.4.	Cálculos.....	34
4.5.	Propuesta del modelo matemático de acumulación de PHA .....	36
4.5.1.	Suposiciones del modelo .....	37
4.5.2.	Obtención de datos experimentales para caracterizar el comportamiento del sistema de producción de PHA .....	39
4.5.3.	Cálculo de parámetros cinéticos y rendimientos experimentales .....	41
Capítulo 5	Resultados y Discusión.....	43
5.1.	Obtención de un cultivo mixto bacteriano con alta capacidad de almacenar PHA .....	43
5.1.1.	Desempeño del Reactor de Enriquecimiento Selectivo (RES).....	43
5.1.2.	Estudios de ciclo en el reactor de enriquecimiento selectivo .....	47
5.1.3.	Estrategia de alimentación por pulsos controlando el oxígeno disuelto en el reactor de producción de PHA.....	51
5.1.4.	Influencia de la concentración de oxígeno disuelto de referencia.....	54
5.1.5.	Influencia de la concentración de AGVs en los pulsos de alimentación.....	56
5.1.6.	Influencia de la concentración inicial de nitrógeno.....	58
5.1.7.	Observaciones generales .....	62

5.2. Postulación del modelo matemático de la acumulación de PHA en cultivos mixtos.....	63
5.2.1. Modelo metabólico .....	64
5.2.2. Ecuaciones de balance de masa en un cultivo en lote alimentado para la producción de PHA.....	65
5.2.3. Expresiones cinéticas .....	66
5.2.4. Sensibilidad de parámetros.....	73
5.2.5. Simulación y estimación de parámetros cinéticos y de rendimiento.....	74
5.2.6. Validación del modelo .....	77
5.2.7. Análisis del desempeño del modelo .....	79
Capítulo 6. Conclusiones .....	82
Capítulo 7. Recomendaciones .....	84
Capítulo 8. Referencias.....	85
Productos de Investigación .....	90

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1 Estructura general de los polihidroxialcanoatos .....	6
Figura 3. 2 Ruta metabólica involucrada en la síntesis y degradación de poli(3-hidroxibutirato) en <i>Ralstonia eutropha</i> (Adaptado de Lee, 1996 y Beun <i>et al.</i> , 2002).....	14
Figura 4. 1 Estrategia experimental .....	22
Figura 4. 2 Sistema de dos biorreactores para la producción de PHA .....	23
Figura 4. 3 Reactor SBR de enriquecimiento selectivo. (1) PC, (2) transmisor de OD, (3) Sensor de OD, (4) bombas de llenado y vaciado, (5) control de temperatura, (6) biorreactor, (7) tanque de alimentación. ....	26
Figura 4. 4 Reactor de producción de PHA. (1) Bomba de alimentación, (2) controlador de flujo de masa, (3) sensor de OD (4) transmisor de OD (5) bioreactor. ....	28
Figura 4. 5 Perfil típico de oxígeno disuelto durante la producción de PHA .....	30
Figura 4. 6 Diagrama de flujo del controlador automático de alimentación de pulsos de sustrato usando la señal de flujo de aire .....	31
Figura 4. 7 Pasos para el desarrollo del modelo matemático .....	37
Figura 5. 1 Vistas al microscopio del inóculo (a) y del cultivo en el reactor de enriquecimiento selectivo a los 90 días de operación (b) 200X.....	43

Figura 5. 2 Perfil de sólidos suspendidos volátiles y fracción de PHA durante la fase de abundancia en el reactor de enriquecimiento selectivo .....	44
Figura 5. 3 Bacterias filamentosas acumuladoras de PHA (1000X), 20 días de operación SBR.....	45
Figura 5. 4 Imágenes de bacterias filamentosas y formadoras de flóculos capaces de acumular PHA, después de un pulso de AGV, t=1h (1000X), 2 meses de operación SBR.....	47
Figura 5. 5 Perfiles típicos de AGV, PHA, OD y pH durante un ciclo en el reactor SBR operado bajo la estrategia ADF. Fase II .....	49
Figura 5. 6 Cromatograma de una muestra del reactor de enriquecimiento a los 60 min después del pulso de AGV.....	51
Figura 5. 7 Monitoreo de oxígeno disuelto y flujo de aire durante la adición de pulsos para la producción de PHA para los doce primeros pulsos a (a) 5.5 mg/L, (b) 3.0 mg/L y (c) 0.5 mg/L (las líneas verticales indican la adición de pulsos) .....	53
Figura 5. 8 Acumulación de PHA para diferentes niveles de oxígeno disuelto .....	55
Figura 5. 9 Acumulación de PHA a diferentes concentraciones de ácidos grasos volátiles .....	57
Figura 5. 10 Consumo de nitrógeno (NH <sub>3</sub> ) durante las cinéticas de acumulación de PHA a 3.0 mg/L de OD y pulsos de AGV de 100 mgDQO/L (Experimentos 1 y 5, tabla 5.4) usando diferentes concentraciones de nitrógeno inicial .....	59
Figura 5. 11 Influencia del nitrógeno en la acumulación de PHA .....	60
Figura 5. 12 Las siete reacciones metabólicas modelo para el almacenamiento, crecimiento y energía a partir de ácidos grasos volátiles .....	65
Figura 5. 13 Representación gráfica de los parámetros de la Ley de Haldane para la función $h(O)$ .....	71
Figura 5. 14 Simulador del proceso de acumulación de PHA a partir de cultivos mixtos Matlab <sup>TM</sup> (Ver. 7.5.0, 2007) .....	75
Figura 5. 15 Módulo de la dinámica de acumulación de PHA .....	76
Figura 5. 16 Módulo de la cinética de acumulación de PHA .....	76
Figura 5. 17 Resultados de validación para el experimento 5. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (100 mgDQO/L, 3.0 mgO <sub>2</sub> /L y 40 mgN/L) .....	78
Figura 5. 18 Resultados de validación para el experimento 7. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (500 mgDQO/L, 3.0 mgO <sub>2</sub> /L y 20 mgN/L) .....	79
Figura 5. 19 Resultados de simulación para el experimento 6. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (33 mgDQO/L, 3.0 mgO <sub>2</sub> /L y 20 mgN/L) .....	81

## II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3. 1 Modelo metabólico para la producción de PHB por cultivos mixtos microbianos (adaptado de Dias <i>et al.</i> , 2006) .....	15
Tabla 4. 1 Medio mineral estándar.....	24
Tabla 4. 2 Características del SBR de enriquecimiento selectivo .....	25
Tabla 4. 3 Condiciones de operación del SBR de enriquecimiento selectivo.....	27
Tabla 4. 4 Programación de los ciclos en el SBR .....	27
Tabla 4. 5 Características del reactor de producción.....	28
Tabla 4. 6 Condiciones de operación del reactor de producción de PHA .....	29
Tabla 4. 7 Acumulación de PHA con diferente concentración de oxígeno disuelto de referencia...	39
Tabla 4. 8 Experimentos de acumulación de PHA a diferente concentración inicial de nitrógeno..	40
Tabla 4. 9 Experimentos de acumulación de PHA con diferente concentración de AGV en los pulsos de alimentación.....	40
Tabla 5. 1 C/N durante las dos fases de la etapa de enriquecimiento selectivo.....	46
Tabla 5. 2 Parámetros de operación durante la operación del SBR .....	46
Tabla 5. 3 Valores promedio de los parámetros medidos durante los ciclos en el SBR .....	50
Tabla 5. 4 Parámetros cinéticos y estequiométricos para los experimentos con diferente concentración de ácidos grasos volátiles, amonio, y oxígeno disuelto de referencia.....	61
Tabla 5. 5 Contenido máximo de PHA obtenido en cultivos mixtos.....	62
Tabla 5. 6 Resultados de la estimación de parámetros .....	77

### III. ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
μL	Microlitro
3HB	Ácido R-3-hidroxi-butírico
3HV	Ácido R-3-hidroxi-valérico
A	Área
AcCoA	Acetil Coenzima A
ADF	Alimentación dinámica aerobia (del inglés: aerobic dynamic feeding)
ADP	Adenosín difosfato
AGV	Ácidos grasos volátiles
AMP	Adenosín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BC	Área bajo la curva
C	Carbono
C:N	Relación carbono : nitrógeno
Cmmol	Milimoles de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
d	Día
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQO	Demanda química de oxígeno
F:M	Relación alimentación : microorganismo (food : microorganism)
Fa	Flujo de aire
h	Hora
H:D	Relación altura : diámetro (height : diameter)
H <sub>2</sub> O	Agua
HA	Hidroxiacil
HAc	Acetato
HCl	Ácido clorhídrico
IVL	Índice volumétrico de lodos
L	Litro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Nitrógeno

NAD <sup>+</sup> /NADH	Coenzima nicotinamida adenina dinucleótido NAH <sup>+</sup> es la forma oxidada y NADH es la forma reducida
NH <sub>3</sub>	Amonio
OD	Oxígeno disuelto
P	Fósforo
pH	Potencial de hidrógeno
PHA	Polihidroxicanoatos
PHB	Polihidroxiacetato
PHV	Polihidroxiacetato
PPi	Pirofosfato
psi	Unidad de presión en Sistema Inglés (lb/in <sup>2</sup> )
RES	Reactor de enriquecimiento selectivo
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tiempo de retención
s	Segundo
SBR	Reactor discontinuo secuencial (del inglés: sequencing batch reactor)
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulica
TRS	Tiempo de retención de sólidos
U	Incertidumbre
v/v	Volumen/volumen
w/v	Peso/volumen
θ <sub>c</sub>	Tiempo de retención celular
σ	Desviación estándar de la muestra

#### IV. NOMENCLATURA

$\alpha$	Constante de saturación en la producción de PHA
$q_m$	Tasa de consumo de AGV para mantenimiento celular
$q_P$	Tasa específica de acumulación de PHA
$q_S$	Tasa de consumo de fuente de carbono ( S )
$q_S^*$	Tasa máxima de consumo de sustrato S
$q_S^{min}$	Tasa mínima de consumo de sustrato S
$q_X$	Tasa de formación de biomasa
$k_S$	Constante de afinidad de la biomasa por S
$k_O$	Constante de afinidad de la biomasa por O
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimiento de almacenamiento de PHA respecto a la fuente de carbono
$\beta_S$	Parámetro de la función tipo Haldane para inhibición por AGV
$\beta_O$	Parámetro de la función tipo Haldane para inhibición por oxígeno disuelto
$f_P^*$	Fracción de PHA intracelular a partir de cual se produce inhibición por producto
$f_P$	Fracción intracelular de PHA
$m_S$	Coefficiente de mantenimiento celular en AGV
$m_{PHB}$	Coefficiente de mantenimiento celular en PHB
$\mu_S$	Tasa específica de crecimiento con respecto al acetato
$\mu_{PHB}$	Tasa específica de crecimiento a partir del consumo de PHB
$n$	Número de pulsos
$\eta$	Eficiencia de remoción de AGV
$O$	Concentración de oxígeno disuelto
$O^*$	Concentración de oxígeno disuelto óptima
$P$	Concentración de PHA
$\Delta P$	Cantidad de PHA acumulado en 1 pulso de alimentación
$\Delta P_f$	PHA total formado
$P_0$	Concentración inicial de PHA al inicio del pulso
$P_f$	Concentración de PHA al final del pulso
$P_M$	Peso molecular

$q_s^X$	Tasa específica de consumo de sustrato para el crecimiento celular
$q_s^{PHB}$	Tasa específica de consumo de sustrato para la formación de PHB
$r_m$	Tasa de consumo de sustrato para mantenimiento celular
$r_p$	Tasa de producción de PHA
$\Delta S$	Fuente de carbono total (AGV) consumida
$\Delta S_m$	Cantidad de AGV consumido para funciones de mantenimiento
$\Delta S_{n+1}$	Fuente de carbono consumida al pulso n=i
$S_0$	Concentración inicial de AGV en el pulso de alimentación
$S_f$	Concentración final de AGV en el pulso de alimentación
$S^*$	Concentración de ácidos grasos volátiles a partir de la cual se produce inhibición por sustrato
$T$	Duración de un pulso de alimentación
$X$	Concentración de biomasa residual activa
$Y_{NIX}$	Rendimiento de biomasa con respecto al nitrógeno
$Y_{PHAI X}$	Rendimiento de biomasa con respecto al consumo de PHB

## Resumen

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros sintetizados por bacterias que podrían ser un sustituto de los plásticos de origen petroquímico por sus propiedades similares, pero con la ventaja de ser biodegradables. Aunque ya se encuentran disponibles comercialmente, su producción es limitada por su costo elevado. La producción de PHA por cultivos mixtos se está convirtiendo en una alternativa muy atractiva a los procesos industriales establecidos. Con el uso de lodos activados de plantas de tratamiento de agua residual y residuos orgánicos como sustrato, bajo la estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF), el contenido de PHA en las células puede alcanzar más del 65%. El aumento en el contenido intracelular de PHA y la tasa específica de almacenamiento intracelular son factores importantes en la disminución de costos de producción y recuperación de PHA que abren nuevas perspectivas en la producción de PHA a partir de cultivos mixtos.

El principal objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un modelo matemático de la acumulación de PHA en cultivos mixtos. A través de la conjunción de observaciones experimentales y otros modelos propuestos en la literatura, se desarrolló un modelo matemático relativamente simple que permitió identificar los parámetros cinéticos y de rendimiento más importantes. Durante la caracterización experimental del sistema de producción de PHA se probó con éxito una nueva estrategia de control automático para el suministro de pulsos de alimentación, en la cual la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo en un valor de referencia. Los experimentos se llevaron a cabo bajo distintas condiciones de operación y se estudió la influencia del nivel de oxígeno, la concentración de fuente de carbono y la limitación de nitrógeno. El modelo final mostró tener un alto grado de precisión para describir el estado del proceso y es apto para la realización de estudios de optimización a futuro.

## Summary

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers synthesized by bacteria that could be a substitute for petrochemical-based plastics for their similar properties, but with the advantage of being biodegradable. Although PHA are commercially available, their production is limited due to their high cost. PHA production by mixed cultures is becoming an attractive alternative to established industrial processes. Using activated sludge from a wastewater treatment plant, organic waste as substrate, and under an aerobic dynamic feeding strategy (ADF), the PHA content in the cells can reach over 65%. Increasing the intracellular PHA content and the specific rate of intracellular storage are important factors in lowering production and recovery costs which open new perspectives in the production of PHA from mixed cultures.

The main objective of this work was to develop a mathematical model of the accumulation of PHA in mixed cultures. Through a combination of experimental observations and other models proposed in the literature, a relatively simple mathematical model that identified the most important kinetic and yield parameters was developed. During the experimental characterization of the PHA production system, a new automatic control strategy for the supply of feeding pulses in which the dissolved oxygen remained at a set point concentration was successfully tested. The experiments were carried out under different operating conditions, and we studied the influence of the oxygen level, the concentration of carbon source and nitrogen limitation. The final model showed a high degree of accuracy to describe the state of the process and is suitable for optimization studies in the future.

# Capítulo 1 Introducción

Recientemente, los problemas relacionados con el cambio climático global, el manejo de residuos sólidos, así como la dependencia de plásticos derivados del petróleo, han creado un gran interés en el desarrollo de plásticos biodegradables.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros sintetizados por bacterias que podrían ser un sustituto de los plásticos de origen petroquímico por sus propiedades termoplásticas y elastoméricas similares, pero con la ventaja de ser completamente biodegradables. La producción a gran escala de PHA puede proporcionar múltiples beneficios al medio ambiente, a la industria y al desarrollo sustentable de la sociedad en un futuro (Gurieff, 2007).

Sin embargo, una de las limitantes para el desarrollo de polímeros biodegradables como sustitutos de los plásticos convencionales es su alto precio, comparado con los plásticos derivados de petroquímicos, debido principalmente a la utilización de cultivos puros y sustratos refinados.

Lo anterior ha despertado el interés en la producción de PHA usando cultivos mixtos usando de nuevas estrategias de control. Los cultivos mixtos son una alternativa atractiva a los procesos industriales establecidos; por ejemplo, usando lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales y residuos orgánicos como sustrato, bajo la estrategia alimentación dinámica aerobia (corto tiempo de abundancia de sustrato seguido por largos periodos de ayuno), el contenido de PHA en las células puede ser mayor al 65% (Serafim et. al, 2004). Además se han llevado a cabo estudios de ciclo de vida que han demostrado que la producción de PHA por cultivos mixtos a partir de fuentes renovables es atractiva financiera y ambientalmente (Gurieff y Lant, 2007).

En particular, el grupo de investigación en el que se desarrolló este proyecto ha propuesto una alternativa de producción de PHA a bajo costo a partir de aguas residuales o lodos de desecho, usando cultivos mixtos en un sistema controlado automáticamente y se ha probado su viabilidad técnica (Arcos, 2008). Además se han establecido las condiciones de operación de un reactor SBR para seleccionar un cultivo mixto apto para la producción de PHA, así como la elección de la estrategia de fermentación para el reactor de producción (Ramírez, 2009). En esta estrategia se consideró el oxígeno disuelto como una variable de control y se utilizó con éxito para el control de la dosificación automática de pulsos de sustrato. En el presente trabajo, se siguió un plan de producción de PHA similar; sin embargo, en lugar de utilizar la señal de oxígeno disuelto para

determinar cuándo alimentar los pulsos de sustrato, se controló la concentración de oxígeno disuelto cerca de un valor fijo y se utilizó el flujo de aire como variable de control para la administración de pulsos.

Una herramienta para desarrollar nuevas estrategias de control para encontrar las condiciones de operación que optimicen la producción del biopolímero es la construcción de un modelo matemático que describa adecuadamente los procesos de acumulación de PHA en cultivos mixtos. El presente trabajo desarrolló dicho modelo basándose en la interpretación de las pruebas experimentales. El principal objetivo de este trabajo fue obtener datos para construir un modelo dinámico compuesto por ecuaciones diferenciales que permitan predecir la producción de PHA bajo condiciones fluctuantes. El sistema se considera como estructurado debido a que se estudian los cambios en la composición de las células durante el crecimiento bacteriano, ya que durante esta etapa acumulan PHA. El modelo matemático de los mecanismos de acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de aguas residuales, desarrollado en este trabajo, permitirá proponer mejores algoritmos de control automático para maximizar la producción de PHA en un futuro cercano.

## Capítulo 2 Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Desarrollar un modelo matemático del proceso de acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) en cultivos mixtos a partir del tratamiento de aguas residuales y lodos de desecho.

### 2.2. Objetivos específicos

- Operar un sistema de dos biorreactores para la producción de PHA a partir de un cultivo mixto bacteriano con alta capacidad de almacenamiento.
- Proponer y probar una nueva estrategia de control para la alimentación automática de sustrato en un reactor de producción de PHA.
- Caracterizar experimentalmente la dinámica de acumulación de PHA en cultivos mixtos para identificar los variables de proceso más importantes.

## Capítulo 3 Antecedentes

### 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia de homo- o hetero-poliésteres biológicos activos ópticamente que contienen monómeros de hidroxicanoatos (HA) (Sudesh *et al.*, 2000). Los PHA tienen la estructura general mostrada en la figura 3.1 (Lee, 1996); tienen el mismo esqueleto de tres átomos de carbono pero difieren en el grupo alquilo en la posición  $\beta$  (Lenz *et al.*, 2005).

Son sintetizados y acumulados por una gran variedad de bacterias a partir de distintas fuentes de carbono, como azúcares, lípidos, alcanos, alquenos y ácidos orgánicos (Philip *et al.*, 2007). Los pesos moleculares de estos polímeros se encuentran en un intervalo de  $2 \times 10^5$  hasta  $3 \times 10^6$  Daltons, en función de los microorganismos y las condiciones de crecimiento a las que se someten (Khanna y Srivastava, 2005).

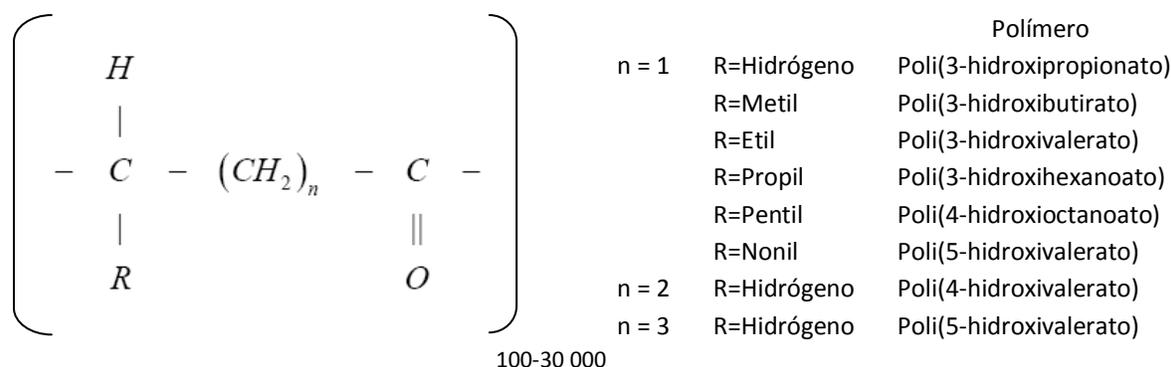


Figura 3. 1 Estructura general de los polihidroxicanoatos

Son sintetizados por más de 300 especies de microorganismos, que los utilizan como materiales de almacenamiento de energía y carbono (Mengmeng *et al.*, 2009). Los PHA se acumulan en las células en forma de gránulos insolubles en el citoplasma, cuyo número y tamaño puede variar dependiendo de la especie. Por ejemplo, en especies como *Ralstonia eutropha* (renombrada recientemente como *Cupriavidus necator*) puede haber de 8 a 13 gránulos por célula y su diámetro varía entre 0.2 y 0.5  $\mu\text{m}$  (Lee, 1996).

Los PHA son polímeros muy interesantes por sus propiedades físicas semejantes a las de los plásticos derivados del petróleo, siendo realmente biodegradables; además, son almacenados en grandes cantidades dentro de las células y pueden ser producidos en grandes cantidades a partir de fuentes renovables (Patnaik, 2005).

Los PHA son polímeros parcialmente cristalinos con un grado de cristalinidad en el intervalo de 60-80% (Khanna y Srivastava, 2005). Sus propiedades físicas y térmicas pueden ser reguladas variando su estructura molecular y su composición (Sudesh *et al.*, 2000). El tipo de PHA producido puede ser manipulado cambiando la composición de la fuente de carbono suministrada. Por ejemplo, con acetato y butirato se produce el homopolímero poli (3-hidroxibutirato), P(3HB), mientras que con una mezcla de acetato y propionato, y propionato y valerato, se obtienen terpolímeros de 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxivalerato (3HV) y 2-metil-3-hidroxivalerato (2M3HV). Todos estos PHA tienen un peso molecular entre  $2.0 \times 10^6$  y  $3.0 \times 10^6$  (Serafim *et al.*, 2008b).

El homopolímero P(3HB) (muchas veces abreviado también como PHB) es un material muy brillante y cristalino y tiene propiedades mecánicas muy similares a los plásticos convencionales como el polipropileno o el polietileno (Serafim *et al.*, 2008b) y puede ser moldeado, hilado en fibras, utilizado para hacer películas y para fabricar heteropolímeros con otros polímeros sintéticos (Philip *et al.*, 2007). Es un material relativamente quebradizo y frágil, lo que dificulta su utilización en aplicaciones que requieran más flexibilidad. No obstante, la incorporación de monómeros diferentes a 3HB en la cadena del polímero resulta en co-polímeros con propiedades mecánicas mejoradas en comparación con el P(3HB) (Serafim *et al.*, 2008b). Se ha observado que a medida que aumenta el porcentaje de 3HV en el co-polímero P(3HB-3HV), éste es más flexible y más resistente, mientras que el esfuerzo último a tensión disminuye y la elongación requerida para el quiebre aumenta; asimismo, tiene una menor temperatura de fusión y menor cristalinidad que el P(3HB) (Sudesh *et al.*, 2000).

A partir de co-polímeros o terpolímeros se pueden obtener productos con un amplio rango de valores de dureza y flexibilidad y con mejores propiedades para ser utilizados en sustitución de algunos plásticos de origen petroquímico (Sudesh *et al.*, 2000).

## 3.2. Relevancia industrial y ambiental de los PHA

### Biodegradabilidad

Una de las propiedades únicas de los PHA es su biodegradabilidad por microorganismos (incluidos bacterias y hongos) en diversos entornos naturales bajo condiciones aerobias y anaerobias. Pueden también ser degradados por métodos térmicos o por medio de hidrólisis enzimática. En un sistema biológico, los PHA son degradados mediante depolimerasas microbianas, así como por hidrólisis enzimática y no enzimática en los tejidos animales (Philip *et al.*, 2007).

Los PHA son polímeros sólidos con un alto peso molecular e incapaces de ser transportados a través de la pared celular para su degradación, por lo que diversos microorganismos degradadores secretan PHA depolimerasas extracelulares que hidrolizan a los PHA en oligómeros y monómeros solubles en agua; posteriormente estos productos pueden ser transportados y utilizados como nutrientes dentro de las células (Khanna y Srivastava, 2005).

Se ha constatado que la tasa de biodegradación es influida por una serie de factores ambientales, tales como la población microbiana en un entorno determinado, el suministro de nutrientes, la temperatura, el nivel de humedad, y el pH; también influyen las propiedades del material en sí: la composición, el peso molecular, la cristalinidad, los aditivos y el área superficial del material (Philip *et al.*, 2007).

### Aplicaciones

Los PHA tienen una amplia gama de aplicaciones debido a sus características novedosas. Inicialmente fueron utilizados en las películas de embalaje, principalmente en bolsas, contenedores de papel y revestimientos. Se pueden usar en aplicaciones similares a las de los plásticos convencionales, que incluyen la manufactura de artículos desechables, como maquinillas de afeitar, utensilios de cocina, pañales, productos de higiene femenina, contenedores cosméticos y tazas.

En la última década sus aplicaciones han aumentado en variedad y especialización. Además de su potencial como un material plástico en las aplicaciones industriales mencionadas, tienen relevancia en el área médica y agrícola.

Los PHA son útiles como precursores de compuestos que pueden servir para la síntesis química de compuestos activos ópticamente. Los PHA son utilizados como soportes de liberación controlada

de fármacos, medicamentos, hormonas, insecticidas y herbicidas. También se utilizan como materiales en la estimulación de crecimiento óseo debido a sus propiedades piezoeléctricas, en placas de hueso, suturas quirúrgicas y reemplazos de vasos sanguíneos (Khanna y Srivastava, 2005). El P(3HB) es un polímero biocompatible, es ópticamente puro y posee propiedades piezoeléctricas, lo cual es importante en el proceso de inducción de osteogénesis (Philip *et al.*, 2007).

### Producción comercial de PHA

En la actualidad la síntesis de PHA a escala industrial se basa en cultivos puros con sustratos bien definidos (Patnaik, 2005). A pesar que se conocen más de 150 diferentes ácidos orgánicos que son constituyentes de estos biopolímeros (Dias *et al.*, 2006), al momento sólo se producen industrialmente los siguientes polímeros: Biopol<sup>TM</sup> (co-polímero de 3-hidroxibutirato, 3HB y 3-hidroxivalerato, 3HV), Biomer<sup>TM</sup> (homopolímero de 3HB), Nodax<sup>TM</sup> (co-polímero de 3HB y 3-hidroxihexanoato, 3HHx) y Biocycle<sup>TM</sup> (homopolímero de 3HB, co-polímero de 3 HB y 3HV). Estos polímeros son producidos por cultivos puros, como *Alcaligenes latus* (Biomer<sup>TM</sup>) y *Burkholderia sacchari* (Biocycle<sup>TM</sup>), o por cepas modificadas genéticamente, tales como *Escherichia coli* recombinante (Biopol<sup>TM</sup>) o *Ralstonia eutropha* recombinante (Nodax<sup>TM</sup>) (Serafim *et al.*, 2008b). En este tipo de procesos, los cultivos pueden almacenar como PHA hasta un 90% de su peso seco celular (Lemos *et al.*, 2006).

La acumulación de PHA es observada a menudo en cultivos mixtos microbianos como en los lodos activados de las aguas residuales plantas de tratamiento. El almacenamiento de PHA por cultivos mixtos se produce en sistemas donde el donador y el aceptor de electrones están separados o cuando el sustrato está disponible intermitentemente a los microorganismos. El contenido de PHA en las células puede alcanzar más de un 65% bajo la estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF). En el proceso de ADF, conocido también como régimen de “abundancia y ayuno”, se produce la acumulación de PHA cuando un período de disponibilidad de sustrato es seguido por un período de limitación (Serafim *et al.*, 2004).

La producción de PHA por cultivos mixtos se está convirtiendo en una alternativa muy atractiva a los procesos industriales establecidos. Un ejemplo es la empresa sueca Anoxkaldnes, que se encuentra trabajando en diferentes aplicaciones de bioplásticos y está desarrollando procesos para la producción de PHA en plantas de tratamiento de aguas residuales con cultivos mixtos. Sus desarrollos están dirigidos hacia la maximización del rendimiento y el control de la calidad de PHA (<<http://www.anoxkaldnes.com>> 2008).

### Factores económicos

A pesar del atractivo de los PHA como sustitutos de polímeros derivados del petróleo, el principal obstáculo que enfrentan para su producción comercial y aplicación es el alto costo de la fermentación. En Inglaterra y Brasil producir comercialmente 1 kg de plásticos biodegradables cuesta entre 6 y 9 dólares, lo cual es muy caro, si se considera que el precio de un plástico convencional es menor a un dólar por kilogramo (Guzmán, 2008).

El costo de producción de PHA depende principalmente del precio de sustrato, el rendimiento de PHA respecto al sustrato y de la eficiencia de la extracción el polímero de las células (Lemos *et al.*, 2006). Los PHA bacterianos son entre 5 y 10 veces más caros que los polímeros derivados del petróleo, tales como el polipropileno y polietileno. El factor más importante en el costo producción de los PHA es el sustrato (principalmente la fuente de carbono) (Khanna y Srivastava, 2005); se calcula que alrededor del 30% del costo total de producción se atribuye a la fuente de carbono (Mengmeng, *et al.*, 2009).

Con el fin de reducir este costo, se han probado cepas recombinantes que utilizan una fuente barata de carbono y se han desarrollado diferentes estrategias en la fermentación. Sin embargo, en cepas silvestres se han obtenido las más altas concentraciones de polímero cuando se usan sustratos purificados. Por tanto, el desarrollo de estrategias de fermentación más eficientes es una necesidad para la producción de estos polímeros con fuentes de carbono baratas (Khanna y Srivastava, 2005).

La selección de microorganismos para la producción de PHA debe basarse en varios factores, entre ellos la capacidad de las células para utilizar una fuente de carbono barata, la tasa de crecimiento, la tasa de síntesis de polímeros, y la tasa máxima de acumulación de polímeros. La recuperación de PHA también debe ser considerada, ya que afecta de manera significativa la economía global del proceso. En vista de los factores mencionados, varias bacterias se describen más aptas para la producción de PHA (Khanna y Srivastava, 2005).

El uso de fuentes renovables de carbono sobre la base de desechos agrícolas o industriales y el desarrollo de procesos que requieren una menor inversión pueden contribuir a la reducción de los costos de producción (Dias *et al.*, 2006). En los sistemas de producción con cultivos mixtos no hay necesidad de condiciones de esterilidad, lo que minimiza los costos de energía y equipo. Gurieff y Lant (2007) realizaron una evaluación de ciclo de vida y un análisis financiero, de donde resultó que la producción de PHA por cultivos mixtos a partir de fuentes renovables es atractiva financiera y ambientalmente. Por otra parte, es una alternativa con menor impacto ambiental que los procesos con cultivos puros, pues se produce menos CO<sub>2</sub>.

Adicionalmente, en el mundo se produce una gran cantidad de lodos de desecho, donde el manejo, tratamiento y disposición final de los mismos abarca de un 40 a 60% de los costos totales de operación en plantas de tratamiento con lodos activados. Una estrategia para el manejo de estos lodos es reutilizarlos para la síntesis de PHA, lo que reduciría considerablemente los costos de producción, pues los lodos activados de pueden adaptar bien a sustratos complejos presentes en desechos agroindustriales (Mengmeng *et al.*, 2009).

### 3.3. Producción de PHA por cultivos mixtos

#### 3.3.1. Sistemas de producción

Los cultivos mixtos seleccionados para la producción de PHA pueden tener una alta capacidad de almacenamiento intracelular si se eligen las condiciones de operación adecuadas que limiten su metabolismo primario (Dias *et al.*, 2006). A continuación se mencionan algunos de los sistemas de producción de PHA en cultivos mixtos.

El almacenamiento de polímeros intracelulares por cultivos mixtos se ha observado en los sistemas de tratamiento de aguas residuales para eliminación biológica de fósforo que alternan condiciones anaerobias-aerobias. Los organismos acumuladores de fosfato (PAO) sintetizan PHA en condiciones anaerobias a partir de fuentes de carbono externas y el glucógeno interior; consumen el PHA en presencia de oxígeno o nitrato para el mantenimiento y división celular, y para la reposición de glucógeno. El fósforo se libera en condiciones anaerobias y se acumula en condiciones aerobias/anóxicas. Los organismos acumuladores de glucógeno (GAO), también presentes en estos sistemas, compiten por los sustratos de carbono con los PAO. Los GAO acumulan PHA y glucógeno de una manera similar a los PAO, pero no acumulan polifosfatos. Ambos grupos de organismos llegan a un contenido máximo de PHA de aproximadamente 0.2 gramos de PHA por gramo de células en peso seco (Dias *et al.*, 2006).

Se han utilizado diversos sistemas con SBR (biorreactores discontinuos secuenciales) para la producción de PHA con cultivos mixtos. Los SBR han sido operados con diferentes condiciones y etapas: microaerófilos/aerobios, anaerobio/aerobio y completamente aerobios (Arcos, 2008).

### 3.3.2. Alimentación dinámica aerobia

La acumulación de PHA en lodos activados representa un caso de gran relevancia. Si se les somete a un proceso denominado alimentación dinámica aerobia (ADF) o de “abundancia y ayuno”, el fenómeno de almacenamiento es dominante en relación al crecimiento (Serafim *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2006). Con esta estrategia se ha obtenido un contenido de de PHA en lodos activados de hasta 78.5% (en peso seco) (Serafim *et al.*, 2004), valor muy cercano al máximo reportado para cultivos puros. Esto apunta a que la producción de PHA usando cultivos mixtos podría reducir de manera importante los costos del proceso, ya que se evitaría la esterilización del reactor y se requerirían menos instrumentos de control.

Dionisi *et al.* (2004) propusieron un sistema integral para la producción de PHA utilizando la estrategia de alimentación dinámica aerobia y agua residual. En el sistema existe una combinación de tres etapas: una anaerobia (para la fermentación acidogénica) y dos aerobias (enriquecimiento selectivo de biomasa acumuladora de PHA y producción de PHA). En la etapa anaerobia los desechos biodegradables se convierten en una mezcla con alta concentración de acetato y otros ácidos carboxílicos (que son el mejor sustrato para producir PHA). En la etapa aerobia un sistema de lodos activados se opera con una carga orgánica media-alta utilizando una dinámica de suministro de sustrato alternando períodos de ayuno-abundancia de sustrato, para favorecer el crecimiento de las bacterias capaces de almacenar PHA. Esta etapa debe ser operada a la más alta tasa posible para mantener la presión selectiva sobre el cultivo. En el tercer paso, el exceso de biomasa producido en la segunda y que ya está enriquecido es sometido a un proceso en lote donde la carga orgánica es mucho más alta que en la segunda etapa. Esto se hace con la finalidad de llevar a la biomasa a su punto de saturación de PHA. Esta biomasa es al final usada en su totalidad para la extracción y cuantificación del polímero.

En presencia de un sustrato externo, los microorganismos tienen la opción de utilizar el sustrato para el crecimiento celular, o bien, para la acumulación de reservas intracelulares. Existen numerosos estudios bioquímicos y genéticos acerca de la síntesis de PHA en cultivos puros, que han demostrado que la acumulación se favorece cuando el crecimiento está limitado por factores externos tales como la falta de nutrientes (por ejemplo, el fósforo o el nitrógeno) pero en presencia de fuente de carbono. En cambio, para los cultivos mixtos sometidos al proceso de alimentación dinámica aerobia, los modelos conceptuales obtenidos a partir de información experimental indican que la acumulación se debe a factores internos, tales como una cantidad insuficiente de RNA o enzimas necesarias para el crecimiento. Durante el proceso de ADF existe un periodo prolongado de ayuno y la falta de sustrato puede causar una disminución en la cantidad de componentes intracelulares necesarios para el crecimiento, por lo que las funciones de almacenamiento de reservas se ven favorecidas. De esta manera, frente a un exceso posterior de

sustrato, algunos microorganismos son capaces de absorberlo rápidamente. Sin embargo, una importante fracción de sustrato es almacenado o usado para el mantenimiento celular, por lo que la tasa de crecimiento no aumenta en una tasa proporcional a la tasa de consumo de sustrato (Dias *et al.*, 2006).

La operación de un reactor bajo la dinámica de abundancia y ayuno enriquece selectivamente una población con alta capacidad de almacenamiento de PHA. Además, algunos estudios han demostrado que el almacenamiento de PHA por cultivos mixtos se produce sin necesidad de limitación externa de nitrógeno y fósforo (Dionisi *et al.*, 2004; Serafim *et al.*, 2004). Una vez que han sido seleccionadas las bacterias con capacidad de acumular PHA, pueden crecer y almacenar PHA simultáneamente. Esta habilidad se ha encontrado en cultivos puros como *Alcaligenes latus* y *Azotobacter vinelandii* (Dias *et al.*, 2006).

### 3.3.3. Mecanismos de síntesis y degradación

Existen diferentes rutas metabólicas para la síntesis de PHA. Para cultivos puros, el metabolismo para la síntesis y degradación de PHA está bien establecido, mientras que para cultivos mixtos existen muy pocos estudios. Se ha comprobado que el metabolismo de PHA en cultivos mixtos es comparable al reportado para cultivos puros si se utiliza la misma fuente de carbono (Serafim *et al.*, 2008). La alimentación para la producción de PHA es generalmente rica en ácidos orgánicos y/o azúcares. Los ácidos orgánicos son transportados a través de la membrana celular y son activados al correspondiente acil-Coenzima A (acil-CoA) o, en el caso de la glucosa, ésta se desdobla en la glicólisis hasta acetil-CoA. (Serafim *et al.*, 2008a). La ruta más sencilla para la producción de este polímero puede ser ejemplificada en *R. eutropha*, que es probablemente el microorganismo más utilizado para la producción de PHB, ya que tiene una alta tasa de crecimiento y puede acumular grandes cantidades del polímero (80-90% de peso seco celular) (Patnaik, 2008) a partir de diversas fuentes de carbono en especial ácidos grasos orgánicos (Yamane, 1993). Además esta vía metabólica cíclica representada en la fig. 3.2, se ha encontrado en una gran variedad de microorganismos (Beun *et al.*, 2002).

Uno de los principales compuestos intermediarios en la síntesis y la degradación de PHB es el acetil-CoA. El acetil-CoA puede utilizarse con dos propósitos: 1) puede ser utilizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para producir ATP y NADH<sub>2</sub>, y para la formación de biomasa; o 2) puede ser utilizado también para producir PHB. En la síntesis de PHB dos unidades de acetil-CoA se condensan para formar una molécula de acetoacetyl-CoA por la enzima β-cetotiolasa, una reductasa dependiente de NADPH reduce el acetoacetyl-CoA a D(-)-3-hidroxiacetyl-CoA (Lee,

1996), y finalmente la enzima PHB-sintasa cataliza la polimerización de las unidades de 3-hidroxi butiril-CoA en P(3HB) vía esterificación (Philip *et al.*, 2007).

Debido a que los PHA son compuestos de reserva, es natural que los microorganismos estén equipados con sistema de depolimerización para recuperar el carbono almacenado cuando hay condiciones de limitación de carbono externo. Sin embargo, la tasa de degradación intracelular es 10 veces más lenta que la síntesis cuando existen condiciones que favorecen la acumulación (Sudesh *et al.*, 2000).

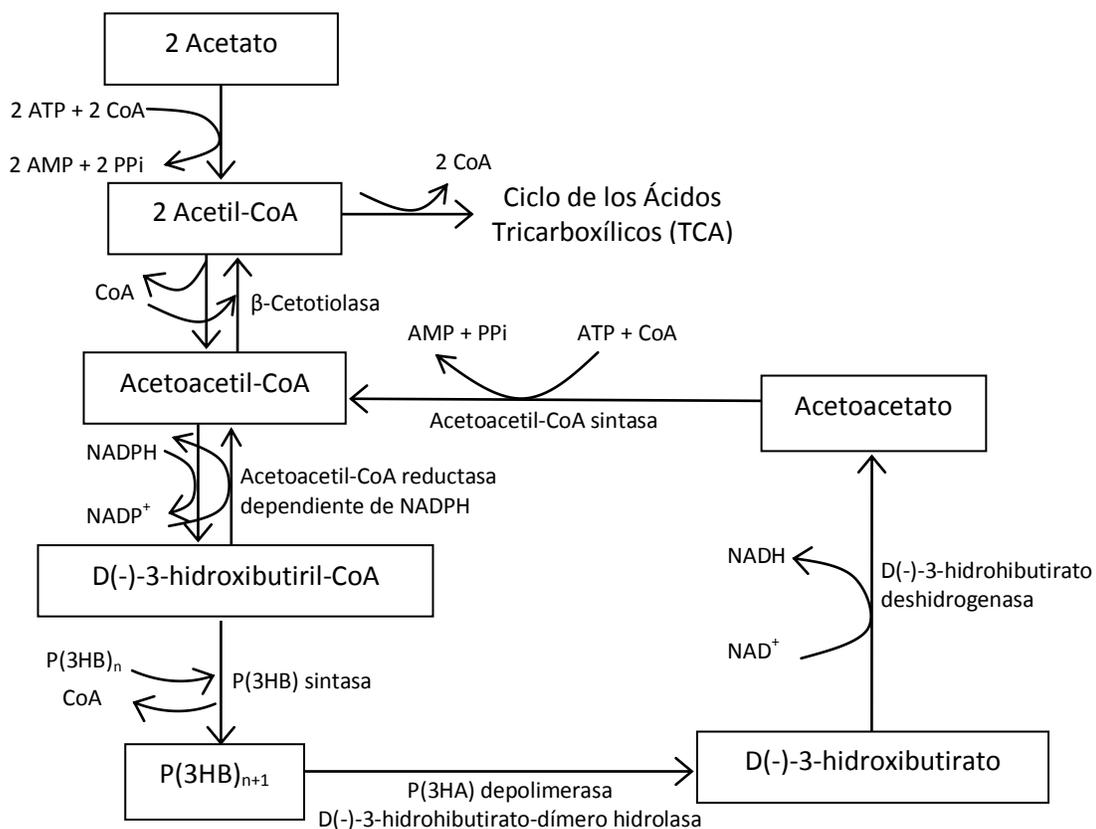


Figura 3. 2 Ruta metabólica involucrada en la síntesis y degradación de poli(3-hidroxibutirato) en *Ralstonia eutropha* (Adaptado de Lee, 1996 y Beun *et al.*, 2002).

### 3.3.4. Modelo metabólico

El conocimiento de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de PHA permite anticipar la composición del polímero, la cual se relaciona con la estructura, propiedades

mecánicas y por tanto las posibles aplicaciones del polímero. El modelo metabólico de la acumulación y consumo de PHA se basa en siete reacciones (fig. 3.2): absorción de acetato, respiración, fosforilación oxidativa, síntesis de precursores de biomasa, polimerización de precursores de biomasa, formación aerobia de PHB y degradación aerobia de PHB (Beun *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2006). En la tabla 3.1 se compila la información del modelo metabólico completo de almacenamiento y degradación aerobia de PHB con la fórmula de composición general de biomasa  $CH_{1.4}N_{0.2}O_{0.4}$  (Beun *et al.*, 2002).

**Tabla 3. 1 Modelo metabólico para la producción de PHB por cultivos mixtos microbianos (adaptado de Dias *et al.*, 2006)**

Descripción del proceso	Reacción
1. Absorción de sustrato	$0.5 \text{ HAc} + 0.5 \text{ CoA} + 1 \text{ ATP} \rightarrow 0.5 \text{ AcCoA} + 0.5 \text{ H}_2\text{O}$
2. Síntesis de precursores de biomasa	$0.6335 \text{ AcCoA} + 0.2 \text{ NH}_3 + 0.66 \text{ ATP} + 0.301 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 1 \text{ CH}_{1.4}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.4} + 0.267 \text{ CO}_2 + 0.534 \text{ NADH}_2$
3. Polimerización de precursores de biomasa	$1 \text{ CH}_{1.4}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.4} + (1.5 + {}^m\text{ATP}/\mu) \text{ ATP} \rightarrow 1/n (\text{CH}_{1.4}\text{N}_{0.2}\text{O}_{0.4})_n$
4. Respiración	$0.25 \text{ AcCoA} + 0.75 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 0.5 \text{ CO}_2 + 1 \text{ NADH}_2$
5. Fosforilación oxidativa	$1 \text{ NADH}_2 + 0.5 \text{ O}_2 \rightarrow 1 \text{ H}_2\text{O} + \delta \text{ ATP}$
6. Almacenamiento aerobio de PHB	$0.5 \text{ AcCoA} + 0.25 \text{ NADH}_2 \rightarrow 1 \text{ CH}_{1.5}\text{O}_{0.5}$
7. Consumo aerobio de PHB	$1 \text{ CH}_{1.5}\text{O}_{0.5} + 0.25 \text{ ATP} \rightarrow 0.5 \text{ AcCoA} + 0.25 \text{ NADH}_2$

<sup>m</sup>ATP, coeficiente de mantenimiento con base en ATP (mol/mol·h); *n*, orden de reacción para la degradación de PHB para mantenimiento (adimensional);  $\delta$ , eficiencia de la fosforilación oxidativa (mol ATP/mol NADH<sub>2</sub>)

### 3.3.5. Parámetros y estrategias de operación

Las bacterias que actualmente se utilizan para la producción de PHA pueden ser divididas en dos grupos con base en las condiciones de cultivo necesarias para la síntesis del polímero. El primer grupo de bacterias requiere la limitación de un nutriente esencial como nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre para la síntesis de PHA y de un exceso de fuente de carbono. Las bacterias incluidas en este grupo son *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens*, y *Protomonas oleovorans*. El segundo grupo de bacterias, que incluye especies como *Alcaligenes latus*, una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*, y *Escherichia coli* recombinante, no requieren de limitación de nutrientes ya que pueden sintetizar y acumular polímeros durante el crecimiento (Khanna y Srivastava, 2005).

Es posible obtener una alta productividad de PHA operando el reactor por lote alimentado, o de manera continua. Para las bacterias pertenecientes al primer grupo de productores de PHA, el

cultivo en lote alimentado es una de las estrategias más empleadas. En la primera etapa se obtiene una concentración alta de biomasa sin la limitación de nutrientes. En la segunda fase, se limita la concentración de un nutriente esencial para permitir la síntesis eficiente de PHA. Durante la limitación de nutrientes (segunda etapa), la concentración residual de células (definido como la concentración de células menos la concentración de PHA) sigue siendo casi constante y la concentración celular aumenta sólo debido a la acumulación intracelular de PHA. En *Ralstonia eutropha* se acumula una gran cantidad de polímero (hasta el 80% de peso seco de células) cuando el nitrógeno, o el fósforo, son completamente agotados. Sin embargo, las otras bacterias pertenecientes a este grupo producen PHA de manera más eficiente cuando un nutriente es limitado pero no completamente agotado (Khanna y Srivastava, 2005).

Para el cultivo en lote alimentado de bacterias pertenecientes al segundo grupo, es importante una estrategia de alimentación de nutrientes para obtener un alto rendimiento de PHA. Es posible el uso de fuentes de nitrógeno complejas tales como licor de maíz, extracto de levadura, o peptona, que pueden incorporarse para mejorar el crecimiento celular, así como la acumulación de polímeros. Sin embargo, es necesario un equilibrio entre el crecimiento celular y la acumulación de PHA para evitar la acumulación incompleta de PHA o la culminación prematura de la fermentación debida a la baja concentración celular (Khanna y Srivastava, 2005).

En la estrategia de alimentación dinámica aerobia se han identificado los parámetros de operación más importantes: la concentración de sustrato, la carga orgánica, la relación carbono/nitrógeno (C/N), el tiempo de retención de lodos (TRS), el pH, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura (Serafim *et al.*, 2008a).

En esta estrategia la relación de tiempo entre la fase de abundancia y ayuno es también un parámetro muy importante. A una alta carga orgánica o a un corto periodo de ayuno, se reducen tanto el rendimiento de almacenamiento como la tasa específica de consumo de sustrato (Dias *et al.*, 2006).

Otros parámetros importantes son la disponibilidad de nitrógeno y el pH, donde el pH debe mantenerse alcalino (pH= 8-9) o no ser controlado (Serafim *et al.*, 2004). La disponibilidad de nitrógeno incrementa el rendimiento de biomasa, lo cual puede aumentar la producción de polímero si la biomasa se encuentra casi saturada de polímero, pero también disminuye el rendimiento de polímero con respecto al sustrato (Serafim *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2005).

En cuanto al efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de PHA, se ha visto que se obtienen mejores rendimientos de PHA (con respecto al sustrato consumido) cuando se tienen condiciones con limitación de oxígeno que cuando se alimenta en exceso (Dias *et al.*, 2006).

El efecto de la temperatura es importante, pues el rendimiento de biomasa decrece cuando la temperatura lo hace también. Esto representa una ventaja, ya que las bajas temperaturas (entre 15 y 20°C), al mismo tiempo que favorecen la productividad volumétrica de PHA, permiten disminuir los costos de energía para el proceso.

### 3.4. Modelado matemático de cultivos mixtos

#### 3.4.1. Generalidades

Un modelo puede ser definido como una representación o una descripción (a menudo simplificada) de un sistema de interés, sin ser un reflejo exacto de la realidad. En este sentido, los modelos son usados para describir una parte de la realidad que es importante entender y manejar.

Los modelos son esenciales para proporcionar estimaciones de parámetros importantes de proceso o fisiológicos, que de otro modo serían inaccesibles, pero también son útiles para apoyar el diseño de las estrategias de control. Las ventajas más importantes del uso de modelos en el tratamiento de aguas residuales son (Henze et al., 2008):

- Tener una visión del desempeño de la planta;
- Evaluar los posibles escenarios para la realización de mejoras ;
- Evaluar diseños de nuevas plantas;
- Justificar decisiones de gestión;
- Desarrollar nuevos esquemas de control.

Los parámetros y el nivel de ellos que necesitan ser incluidos en el modelo matemático dependen en gran parte en los objetivos que se deseen alcanzar. En el modelado matemático de sistemas de tratamiento de aguas, existen dos tipos diferentes de modelos que se pueden desarrollar:

- Modelos en estado estacionario. Los modelos en estado estacionario o estable tienen flujos y cargas constantes y por tanto tienden a ser relativamente simples. Esta simplicidad los hace adecuados para el diseño inicial, ya que no se requieren las descripciones completas de los parámetros del sistema.
- Modelos dinámicos. En los modelos dinámicos existe variación en el flujo y/o en la concentración y en consecuencia incluyen al tiempo como variable.

Los modelos dinámicos son más complejos que los de estado estacionario y resultan más adecuados en la predicción de la respuesta del sistema conforme al tiempo. Los modelos dinámicos ayudan a identificar los parámetros de diseño que tienen mayor influencia en la respuesta del sistema. Debido a su gran complejidad, en este tipo de modelos sólo aquellas variables que demuestran ser de importancia son consideradas.

Los modelos matemáticos son un conjunto de relaciones entre las variables del sistema a estudiar, y generalmente pueden predecir las variables de salida a partir de las variables de entrada. Estas relaciones normalmente se expresan en la forma de ecuaciones matemáticas (pero pueden ser también expresiones lógicas) que son usadas en la operación del proceso. Las variables de entrada incluyen cualquier propiedad de importancia para el proceso; por ejemplo, la velocidad de agitación y de alimentación al biorreactor, el pH y la temperatura del medio, así como la concentración de sustrato en la alimentación. Las variables de salida son la concentración de sustratos, de productos metabólicos y de biomasa en el biorreactor, además del estado de la biomasa (representado por el conjunto de componentes intracelulares como son los PHA). Una forma usual para proponer modelos matemáticos en biorreactores es hacer un balance de masas. Para ello es necesario especificar un volumen de control y después definir el conjunto de ecuaciones de balance para las variables de interés. Estas ecuaciones de balance describen cómo la materia fluye dentro y fuera del volumen de control y cómo el material es convertido dentro de este volumen. La conversión de material dentro del volumen de control se especifica en ecuaciones de velocidad o expresiones cinéticas (Nielsen *et al.*, 2003).

La combinación de balances de masa, incluyendo ecuaciones cinéticas de reacción y los modelos del reactor hacen una descripción matemática completa del proceso de fermentación, y este modelo puede ser usado para realizar simulaciones de la dependencia de las variables de salida respecto a un conjunto de variables de entrada (Nielsen *et al.*, 2003). De esta manera, un método para apoyar la propuesta de nuevos sistemas de control para la producción de PHA es el desarrollo de un modelo matemático que pueda describir su dinámica adecuadamente. Luego, utilizando las predicciones del modelo y con un programa de optimización apropiado es posible encontrar los valores óptimos de los parámetros clave de operación.

En el modelado de procesos fermentativos existen diferentes perspectivas y grados de complejidad. El grado de realismo y complejidad de un modelo depende del objetivo, pero se debe elegir el modelo más simple capaz de representar en forma adecuada al sistema de interés.

Los modelos estructurados consideran las reacciones que ocurren dentro de las células como individuales o grupos de reacciones. En este tipo de modelos la biomasa es dividida en distintos componentes: RNA, DNA, proteínas, hidratos de carbono, etc.

En los modelos no estructurados, todos los componentes celulares son agrupados como un solo componente representado por la concentración total de biomasa ( $X$ ) y se considera que la población es completamente homogénea. Muchos de los modelos no estructurados son similares a los modelos mecanísticos basados en cinéticas enzimáticas; algunos ejemplos de éstos son los modelos de Monod, Haldane, Tessier y Moser (Nielsen *et al.*, 2003).

En los modelos no estructurados las cinéticas que describen la tasa específica de producción de biomasa, absorción de sustrato y formación de productos metabólicos se expresan como función de las variables del sistema (Nielsen *et al.*, 2003).

La representación matemática más simple que puede aplicarse tanto al crecimiento celular, al consumo de sustrato (por ejemplo el oxígeno) y a la velocidad de formación de productos es el llamado modelo de la “caja negra”, en el cual todas las reacciones bioquímicas se agrupan en una sola reacción global. Para ciertos sistemas biológicos los coeficientes de rendimiento pueden considerarse como constantes, lo que contribuye a la simplicidad del modelo.

Los modelos mecanísticos se construyen con base en aproximaciones de cinéticas químicas basadas en un mecanismo postulado y una cinética de acción de masas para cada paso.

### 3.4.2. Modelos propuestos para cultivos mixtos

La elección de la estrategia de operación óptima para producción de PHA puede ser encontrada de manera más eficaz con el desarrollo de un modelo. Se han propuesto varios modelos matemáticos que intentan describir los mecanismos de almacenamiento y degradación de PHA bajo condiciones aerobias en cultivos mixtos: co-cultivos (Patnaik, 2008; Tohyama *et al.*, 2002), lodos activados sujetos a periodos de abundancia y ayuno (Beun *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2005). Sin embargo hacen falta más modelos que puedan ser aplicados en estudios de optimización.

El Modelo para Lodos Activados No. 3 (ASM3) de la *International Water Association* (IWA) se basa en evidencia experimental, donde el almacenamiento de sustrato bajo condiciones aerobias se integra a un modelo mecanístico. Este modelo describe la conversión total de sustrato biodegradable en polímeros de reserva (Gujer *et al.*, 1999). Sin embargo, ya que este modelo se basa en una cinética tipo de Monod, la cual se desarrolló para el crecimiento en sustratos solubles, probablemente no proporcione una descripción tan adecuada de la conversión de sustrato intracelular particulado como es el PHA. Además, el ASM3 no permite el crecimiento sobre sustratos externos y de acuerdo con este modelo el crecimiento de biomasa ocurre únicamente a partir de los polímeros de reserva (Beun *et al.*, 2002).

El modelo propuesto por Beun *et al.* (2002) es un modelo metabólico complejo que se basa en siete reacciones donde se midió la acumulación de PHB bajo condiciones sin limitación de crecimiento. Los datos obtenidos se usaron para derivar ecuaciones generales para la producción y consumo de PHB en sistemas de lodos activados alimentados dinámicamente. Se obtuvieron análisis estequiométricos y energéticos detallados que permitieron el cálculo de los coeficientes teóricos de rendimiento y mantenimiento.

Un trabajo interesante es el reportado por Dias, *et al.* (2005), donde se desarrolló un modelo matemático muy sencillo para la producción de PHB pero con la suficiente exactitud para llevar a cabo estudios de optimización. En particular se evaluaron las estrategias óptimas de alimentación de acetato y amonio que maximizaran el contenido intracelular de PHB así como la productividad volumétrica. Los experimentos se realizaron con y sin limitación de amonio para el análisis de la formación de PHB independientemente del crecimiento celular. Este modelo supone que el cultivo celular es homogéneo; es decir, que los microorganismos tienen un metabolismo promedio que no cambia significativamente con el tiempo. El modelo propuesto por Dias, *et al.* (2005) describe la dinámica de acumulación del polímero PHB (polihidroxibutirato) a partir de acetato como fuente de carbono. A continuación se presentan las expresiones dinámicas propuestas en este modelo para un cultivo operado en lote:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_s + \mu_{PHB}) \cdot X$$

$$\frac{dN}{dt} = -Y_{N/X} \cdot (\mu_s + \mu_{PHB}) \cdot X$$

$$\frac{dS}{dt} = -(q_s^X + q_s^{PHB} + m_s) \cdot X$$

$$\frac{df_{PHA} X}{dt} = (Y_{PHB/S} q_s^{PHB} - Y_{PHB/X} \cdot \mu_{PHB} - m_{PHB}) \cdot X$$

Los balances de materia para la operación en lote asumen mezclado perfecto y sin formación de agregados celulares. El PHB que se forma dentro de las células se define como la relación entre el PHB intracelular y la biomasa activa ( $f_{PHA} = PHB/X$ ). Dado que este modelo se empleó como base para la propuesta de modelo matemático que se hace en este trabajo de investigación, la explicación del significado de cada uno de sus parámetros se posterga para el capítulo 5.

## Capítulo 4 Desarrollo experimental

### 4.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental que se siguió en la realización de este trabajo de investigación se compone de dos partes. La primera fue el montaje y caracterización del sistema experimental de producción de PHA y la segunda fue la construcción del modelo matemático de la dinámica de acumulación de este polímero (fig. 4.1).

La primera parte de la estrategia experimental consistió en realizar el montaje de un sistema de dos reactores para la producción de PHA. En el primer biorreactor se obtuvo un consorcio microbiano con alta capacidad de almacenamiento de PHA para inocular el reactor de producción de PHA. Durante esta etapa también se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica para proponer un modelo conceptual de la acumulación de PHA y diseñar los experimentos en el reactor de producción. Asimismo, en el reactor de producción se probó una estrategia de alimentación automática por pulsos, con la que posteriormente se realizaron los experimentos para la obtención del modelo matemático de acumulación de PHA.

Durante la segunda etapa, se postuló el modelo matemático de acumulación de PHA por cultivos mixtos a partir de aguas residuales. Para este fin se estudiaron diversos modelos propuestos en la literatura especializada para obtener una propuesta preliminar de la estructura del modelo matemático que explicara la dinámica particular del caso de estudio. Posteriormente, se realizaron las modificaciones y simplificaciones necesarias de acuerdo a los resultados experimentales. Para la validación y determinación de los parámetros del modelo se construyó un simulador en MATLAB™.

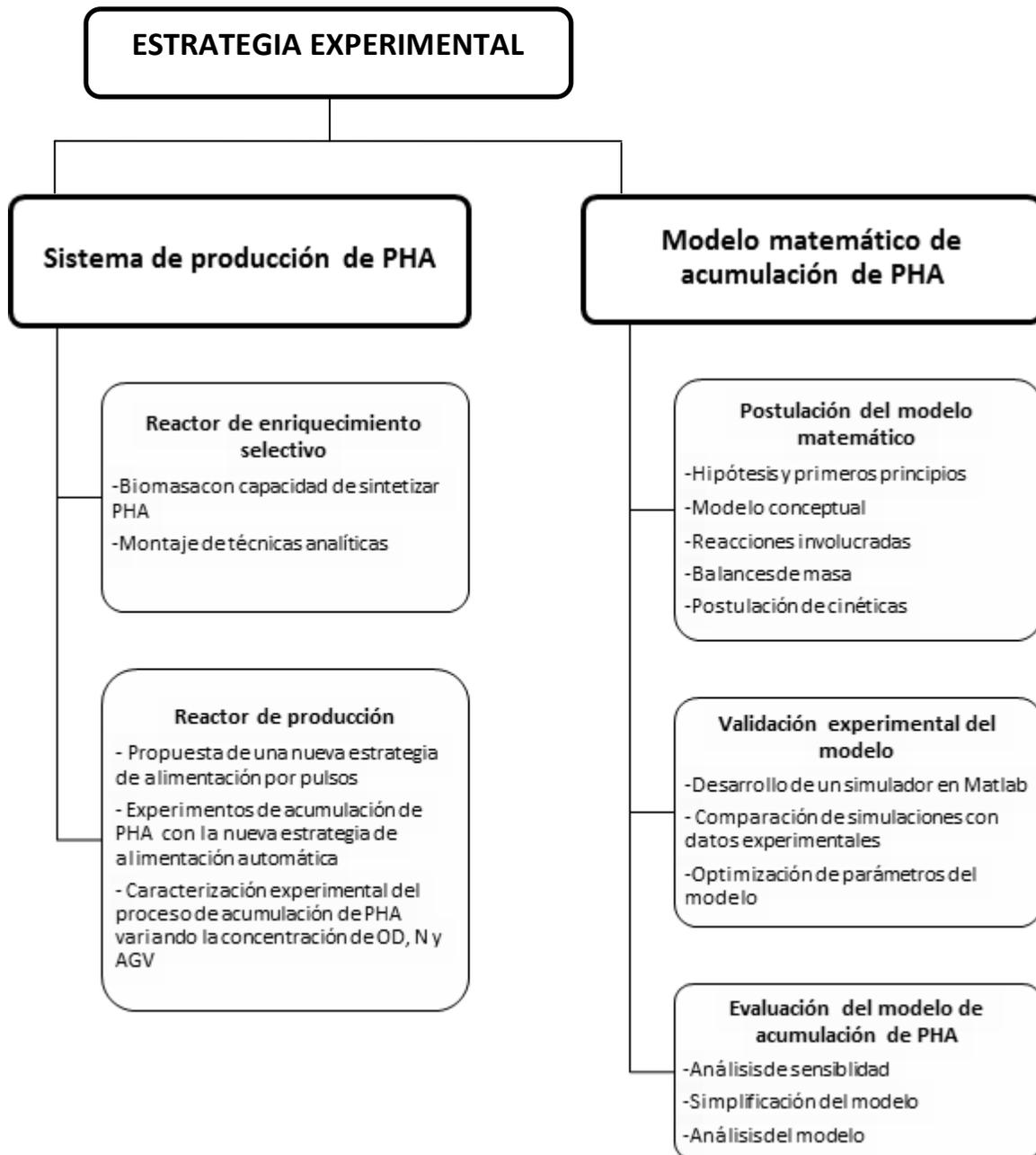
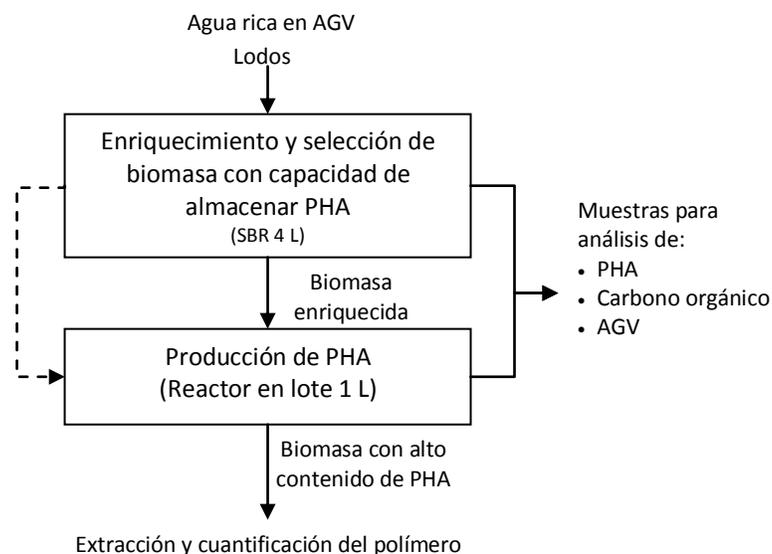


Figura 4. 1 Estrategia experimental

## 4.2. Sistema de producción de PHA

El sistema de producción de PHA por cultivos mixtos a partir de aguas residuales consta de dos biorreactores en serie (fig 4.2). En el primer reactor se realizó la selección de biomasa capaz de sintetizar y almacenar PHA bajo condiciones intermitentes de aporte de sustrato en un reactor SBR. Este biorreactor de enriquecimiento selectivo se inoculó con lodos de una planta de tratamiento de agua residual y se empleó agua sintética rica en ácidos grasos volátiles (AGV). Posteriormente, una vez aclimatada la biomasa, cada cierto ciclo, se retira una cantidad de licor mezclado del reactor de enriquecimiento selectivo para inocular el biorreactor de producción de PHA. En este segundo reactor, la biomasa con alta capacidad de almacenar PHA se alimentó continuamente con AGV en alta concentración para fomentar la saturación intracelular de PHA. El reactor de producción de PHA fue alimentado por pulsos de sustrato, sin etapa de sedimentación y retirando todo el licor mezclado al final de la reacción cuando los microorganismos productores de PHA habían alcanzado la fracción intracelular máxima del polímero. Ambos reactores están instrumentados con sensores de temperatura, oxígeno disuelto, y volumen acoplados a una computadora personal para el monitoreo y control del proceso. Los experimentos encaminados a la caracterización de la dinámica de acumulación de PHA y que posteriormente sirvieron para la obtención del modelo matemático se llevaron a cabo en el reactor de producción, en donde también se probó una nueva estrategia de alimentación por pulsos, manteniendo constante la concentración de oxígeno disuelto y usando el flujo de aire como variable de control.



4. 2 Sistema de dos biorreactores para la producción de PHA

### 4.2.1. Inóculo

El reactor de enriquecimiento selectivo (RES) fue inoculado con lodos del tanque de aireación de una planta de tratamiento de agua residual de lodos activados con una capacidad de 12 L/s ubicada en la terminal de autobuses de la ciudad de Santiago de Querétaro. La concentración de biomasa inicial se fijó en 5000 mg SSV/L.

### 4.2.2. Agua residual modelo

En un sistema completo de producción de PHA se debería alimentar estos lodos con desechos orgánicos que han pasado por un fermentador acidogénico para la generación de ácidos grasos volátiles. Sin embargo, para la generación del modelo matemático de acumulación de PHA se empleó agua residual sintética preparada de acuerdo a técnicas estándar (APHA & AWWA & WPCF, 2005), a la que se adicionaron ácidos grasos volátiles como única fuente de carbono. Los reactores de enriquecimiento y producción se alimentaron con una mezcla de ácido acético y ácido propiónico en proporción 70:30 expresada como DQO. La concentración de AGV alimentada difiere en los dos reactores como se indica en las secciones 4.2.4.2 y 4.2.3.2. Mientras que la composición del medio mineral usada en ambos reactores se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4. 1 Medio mineral estándar

Compuesto	Nombre	Concentración en el reactor (mg/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato monobásico de potasio	255
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Fosfato dibásico de potasio	326.25
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dibásico de sodio heptahidratado	754.56
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloruro de amonio	75-380
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	104.04
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado	54.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro férrico hexahidratado	1.75
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de manganeso tetrahidratado	0.2471
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Ácido bórico	0.4004
$\text{ZnCl}_2$	Cloruro de zinc	0.1421
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Molibdato de amonio	0.2429
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético	0.3885
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro férrico hexahidratado	0.378

\*El pH final de la solución es de 8.0

### 4.2.3. Reactor de enriquecimiento selectivo (RES)

#### 4.2.3.1. Descripción

Una parte muy importante en este trabajo es la obtención de una población estable capaz de acumular PHA, para lo cual se realizó el montaje del biorreactor SBR a nivel piloto de laboratorio (fig 4.3). En la tabla 4.2 se enumeran las características de dicho reactor.

Tabla 4. 2 Características del SBR de enriquecimiento selectivo

Parámetro	Descripción
Volumen nominal	8 L
Volumen de operación	6 L
Relación H:D	3:1
Sistema de agitación	Neumático
Control de temperatura	Chaqueta convencional
Material	Acrílico

EL reactor de enriquecimiento selectivo es una columna de burbujeo con doble pared de acrílico, operado en modo SBR con tiempos de reacción constantes. El reactor cuenta con tres bombas peristálticas: dos de alimentación (Cole-Parmer *Masterflex* mod. 7523-60) y una de vaciado (Cole-Parmer *Masterflex* mod. 7553-70). Se encuentra equipado con un sensor óptico de oxígeno disuelto (Endress+Hauser mod. WCOS61 acoplado a un transmisor LIQUISYS-M mod. COM223) y con un controlador de flujo másico (Aalborg mod. GFC17) para regular el flujo de aire para burbujeo.

El proceso se controla de manera automática a través de una computadora personal, la cual controla las válvulas, instrumentos y equipos. Se reciben las señales por medio de una tarjeta de adquisición de datos de bajo costo (National Instruments USB6009).

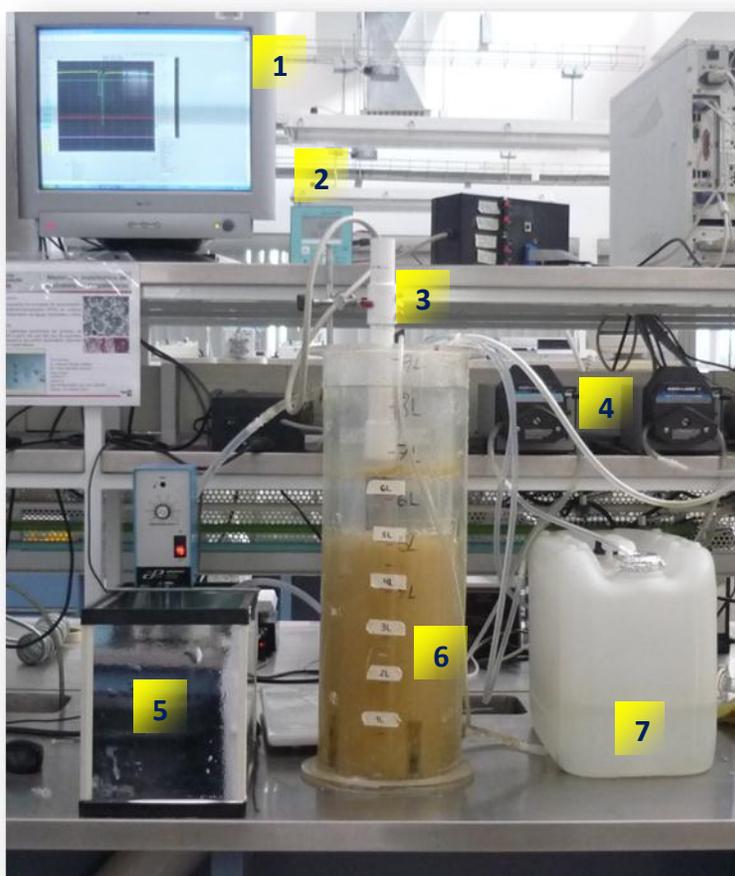


Figura 4. 3 Reactor SBR de enriquecimiento selectivo. (1) PC, (2) transmisor de OD, (3) Sensor de OD, (4) bombas de llenado y vaciado, (5) control de temperatura, (6) biorreactor, (7) tanque de alimentación.

#### 4.2.3.2. Operación del reactor de enriquecimiento selectivo

El reactor fue alimentado con una mezcla de dos ácidos grasos volátiles (AGV como se indica en la sección 4.2.2), con una concentración en el reactor de 375 mgDQO/L. Además se preparó un medio mineral con los compuestos y concentraciones indicados en la tabla 4.1, al que además se le agregó tiourea (20 mg/L) para inhibir la nitrificación, evitando así la formación de nitratos y nitritos. Para simular el agua residual que provendría de un fermentador acidogénico, durante la alimentación al reactor el medio mineral y la mezcla de AGV se agregaron por separado accionando dos bombas peristálticas en paralelo (para evitar la degradación de los AGV en presencia de medio mineral durante su almacenamiento). El volumen de intercambio fue de 1.5 L de licor mezclado y este mismo volumen fue el que se suministró durante la fase de abundancia.

Para la obtención de un cultivo mixto enriquecido selectivamente con microorganismos con alta capacidad de producción de PHA, se aplicó la estrategia de alimentación dinámica aerobia (ADF) (Serafim *et al.*, 2004), en la cual se generan condiciones de estrés alternando fases breves de abundancia de sustrato y de ayuno prolongado.

En la tabla 4.3 se indican las condiciones de operación del reactor SBR de enriquecimiento selectivo.

**Tabla 4. 3 Condiciones de operación del SBR de enriquecimiento selectivo**

Parámetro	Valor
Volumen de operación	6 L
Volumen de intercambio	1.5 L
TRH	2 d
Flujo de aire	2 L/min
Temperatura	25°C
pH	6.5-8.0
Duración del ciclo	12 h
Concentración de SSV	2000 mgSSV/L
$\theta_c$	10 d

La duración de las distintas etapas de operación del SBR durante las dos fases de operación del reactor se muestra en la tabla 4.4.

**Tabla 4. 4 Programación de los ciclos en el SBR**

Etapa	Duración (min)	
	Fase I (0-69 d)	Fase II (70-348 d)
Llenado	5	2
Reacción	320	708
Sedimentación	30	5
Vaciado	5	5
Total	6 h	12 h

#### 4.2.4. Reactor de producción de PHA (RP)

##### 4.2.4.1. Descripción del reactor de producción

Después de obtener el cultivo mixto seleccionado para la acumulación de PHA, es necesario el montaje del reactor de producción para la realización de los experimentos orientados a la obtención del modelo matemático. En la tabla 4.5 se muestran las características de este reactor:

Tabla 4. 5 Características del reactor de producción

Parámetro	Descripción
Volumen nominal	2 L
Volumen de operación	1.2 L
Relación H:D	1:1
Sistema de agitación	Neumático
Control de temperatura	Chaqueta convencional
Material	Vidrio



Figura 4. 4 Reactor de producción de PHA. (1) Bomba de alimentación, (2) controlador de flujo de masa, (3) sensor de OD (4) transmisor de OD (5) bioreactor.

#### 4.2.4.2. Operación del reactor de producción

Una vez obtenido el cultivo enriquecido se retira una fracción de licor mezclado del reactor de enriquecimiento para inocular el siguiente reactor del sistema. En el reactor de producción, el cultivo purgado del reactor de enriquecimiento se somete a un régimen de alimentación controlado para

lograr la máxima acumulación posible de PHA y e inhibir su degradación. Al final de esta etapa, cuando los microorganismos están saturados de PHA, se retira todo el volumen de trabajo para proceder a la extracción y cuantificación del polímero.

Las condiciones de operación del reactor de producción de PHA se muestran en la tabla 4.6:

**Tabla 4. 6 Condiciones de operación del reactor de producción de PHA**

Parámetro	Valor
Volumen de operación	1.2 L
Flujo de aire	Variable
Oxígeno disuelto	Constante
Temperatura	22°C
pH*	6.5-8.0
Duración del ciclo	20 h
Concentración de SSV	1500 mgSSV/L
$\theta_c$	20 h

\*El pH se mantuvo entre 6.8 y 8.2

El RP fue alimentado automáticamente con una mezcla de ácido acético y propiónico en la misma proporción que en el reactor de enriquecimiento (70:30 como DQO), se suministraron los pulsos necesarios para saturar a las células de polímero. El volumen de los pulsos dependió de la concentración final deseada en cada uno, se alimentaron pulsos de 1 a 10 mL y se probaron cuatro concentraciones de pulsos de fuente de carbono para lograr concentraciones en el RP después del pulso de 33, 100, 500 y 1000 mgDQO/L, respectivamente. Con base en las mediciones del oxígeno disuelto (OD), se determinó cuando las células estaban saturadas de PHA y ya no había consumo de fuente de carbono externa. Entonces se retiraba todo el licor mezclado saturado de PHA para la extracción y cuantificación de PHA, así como para la determinación de biomasa y nitrógeno.

#### 4.2.4.3. Estrategia de alimentación

El reactor de producción de PHA se alimentó constantemente con pulsos de sustrato cada vez que éste se agotaba en el medio de cultivo y se adicionaron los pulsos necesarios para lograr la saturación de PHA intracelular. Con el fin de detectar cuándo alimentar un nuevo pulso de sustrato se usó una nueva estrategia de alimentación automática programada en LabVIEW 7.1 (National Instruments) usando el flujo de aire como variable de control (fig. 4.5). La concentración de oxígeno disuelto (OD) se midió en línea y se mantuvo en un nivel de referencia manipulando el flujo de aire ( $F_a$ ) con la ayuda de un controlador PID (Proporcional Integral Derivativo). La estrategia de control consistió de seis pasos, donde  $F_{a_{max}}$ ,  $DO_{ref}$ ,  $\alpha$ ,  $t_{inicio}$  y  $t_{espera}$  son parámetros

que establece el usuario. Mientras que  $F_a$  y DO son el flujo de aire y el oxígeno disuelto registrados a lo largo del proceso.

1. Se fija la concentración de OD en  $DO_{ref}$ .
2. Se alimenta un pulso de sustrato (AGV), se reinicia  $F_{a_{max}}$ .
3. Inicia la reacción de los microorganismos y, durante este tiempo, la estrategia de control no puede suministrar un nuevo pulso. En este paso se registra un aumento en  $F_a$  para compensar la tasa de respiración de los microorganismos y mantener el OD en el nivel establecido.
4. Después de transcurrido  $t_{inicio}$ , se sigue llevando a cabo la reacción de consumo de sustrato. El programa de control verifica constantemente si se cumple:  $F_a \leq \alpha * F_{a_{max}}$  y  $DO > DO_{ref}$ . (generalmente  $\alpha$  se fija a 0.1, es decir, la condición se cumple cuando  $F_a$  es menor o igual al 10% de  $F_{a_{max}}$ ). Ambas condiciones son indicativas de que se ha agotado el sustrato, pues cuando esto sucede la actividad respirométrica de los microorganismos disminuye y el controlador PID establece que el  $F_a$  debe disminuir también, pero por la naturaleza del controlador, la acción no tiene efecto inmediato y el DO tiende a subir por un momento al no ser consumido.
5. Cuando se cumplen ambas condiciones:  $F_a \leq \alpha * F_{a_{max}}$  y  $DO > DO_{ref}$ , el sistema se prepara para un nuevo pulso y espera durante  $t_{espera}$ . Durante el periodo de espera, no se adiciona ningún pulso. En caso que durante este tiempo cambien los valores de  $F_a$  ó DO y se dejen de cumplir los criterios  $F_a \leq \alpha * F_{a_{max}}$  y  $DO > DO_{ref}$ , el sistema volverá al paso 4.
6. Cuando se cumple  $F_a \leq \alpha * F_{a_{max}}$  y  $DO > DO_{ref}$  y ha transcurrido  $t_{espera}$ ,  $F_a$  se encuentra en un nivel bajo. El controlador retorna al paso 2 y establece un nuevo valor inicial de  $F_{a_{max}}$  para el nuevo pulso.

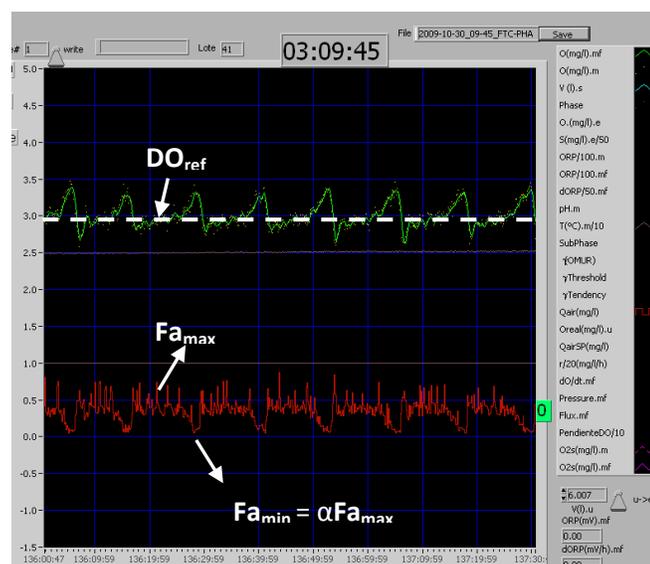


Figura 4. 5 Perfil típico de oxígeno disuelto durante la producción de PHA

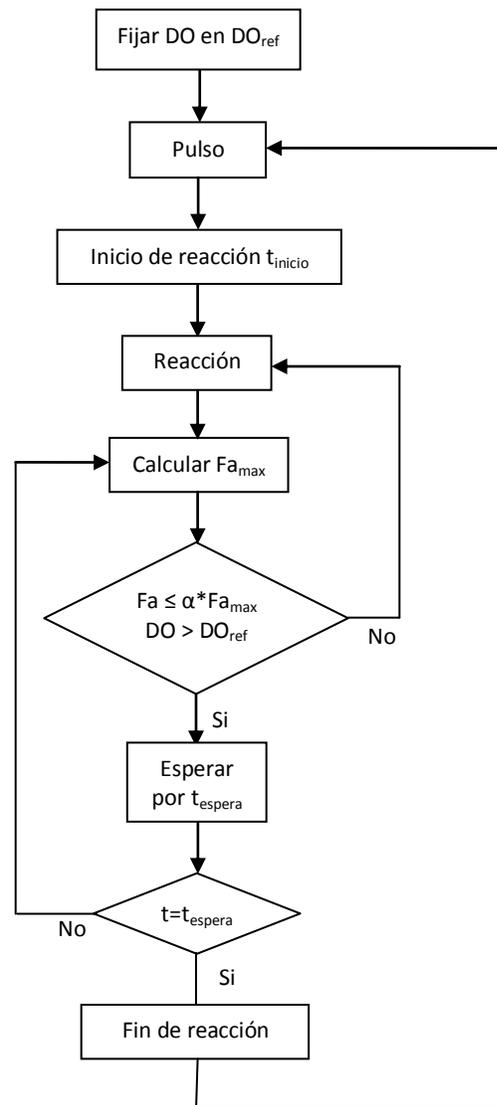


Figura 4. 6 Diagrama de flujo del controlador automático de alimentación de pulsos de sustrato usando la señal de flujo de aire

- DO<sub>ref</sub> Oxígeno disuelto de referencia
- Fa Flujo de aire registrado
- Fa<sub>max</sub> Flujo de aire máximo registrado durante el pulso de alimentación
- α Fracción de Fa<sub>max</sub>
- t<sub>inicio</sub> Tiempo de inicio de la reacción en donde no se adiciona alimentación
- t<sub>espera</sub> Tiempo de espera antes de suministrar un nuevo pulso una vez que se han cumplido las condiciones  $Fa \leq \alpha * Fa_{max}$   $DO > DO_{ref}$

### 4.3. Métodos analíticos

#### 4.3.1. Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

La determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se realizó por métodos gravimétricos, como se describe en el anexo.

#### 4.3.2. Nitrógeno amoniacal

La determinación de nitrógeno residual en el medio de cultivo se realizó con un kit de HACH® capaz de cuantificar el nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) con intervalo de 0 a 50.0 mg/L usando el método del salicilato.

#### 4.3.3. Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV)

Para este análisis, se tomó 1 mL de muestra centrifugada y filtrada y se colocó en un tubo de 1.5 mL con un gota de HCl 1:1 para su conservación; posteriormente las muestras fueron refrigeradas a 4°C.

Para la determinación cuantitativa de los AGV (ácido acético y ácido propiónico), se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian 3300) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar de sílice Zebram ZB-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 (m) de largo y 1 ( $\mu\text{m}$ ) de espesor de película. Las temperaturas del inyector y detector fueron 190°C y 210°C respectivamente; la temperatura inicial de horno fue de 45°C, la cual se mantiene por 1.5 min incrementando hasta 135 °C a una tasa de 8 °C/min. Como gas portador se usó nitrógeno con una presión de 40 psi.

Se inyectan 2  $\mu\text{L}$  de muestra que se volatilizaron en el horno, antes de entrar a la columna del cromatógrafo de gases. De acuerdo con el tiempo de retención (RT) fueron identificados los AGV de la muestra (ácido acético: 5.9 min y ácido propiónico: 6.9 min). La cuantificación se realizó por medio de una curva de calibración con las siguientes concentraciones estándar: 3.5, 14, 35, 140 y 350 mg/L. Las áreas arrojadas por el sistema se compararon con las curvas de calibración a partir de las cuales se calculó la concentración de los AGV.

#### 4.3.4. Determinación de polihidroxialcanoatos (PHA) por cromatografía de gases

La cuantificación de PHA se realizó por la técnica propuesta por Braunegg *et al.* (1979) con las modificaciones propuestas por Oehmen *et al.* (2004) y por Gurieff (2007). Se toma una muestra de 10 mL del reactor y se le agregan 5 gotas de formaldehído al 7% v/v para inhibir inmediatamente cualquier actividad de degradación de PHA; se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm y se retira el sobrenadante. La muestra se deja secar una noche en el horno a 120°C para evaporar toda el agua (Gurieff, 2007). Cuando se seca, se deja enfriar y se agregan 2 mL de metanol acidificado y 2 mL de cloroformo por muestra. Las muestras se digieren a 100°C durante 20 horas. El metanol acidificado se prepara con 3% de ácido sulfúrico y una concentración de 100 mg/L de benzoato de sodio como estándar interno, para evitar errores de inyección (Comeau *et al.*, 1988). Al terminar la digestión, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y se le agrega 1 mL de agua destilada para lograr la separación de fases y se agitan en vórtex durante 1 min cada una. Las muestras se dejan sedimentar por una hora y se toma la fase orgánica de la muestra, que se encuentra en la parte baja del vial. Esto último se hace con pipetas Pasteur de vidrio para evitar que el cloroformo arrastre polímero de pipetas de plástico e interfiera con el resultado. Se toman 2 µL de la muestra y se analiza por cromatografía de gases con una columna de las mismas características para la determinación de AGV, usando nitrógeno como gas acarreador a 40 psi. La unidad de detección de ionización con flama (FID) fue operada a 270°C con una temperatura del puerto de inyección de 250°C. La temperatura inicial del horno fue de 60°C durante 1 min, se incrementó a razón de 10°C/min hasta llegar a 120°C, y después hasta 250°C a razón de 45°C/min, donde al final se mantiene por 3 minutos. Se realizó una curva de calibración con los siguientes estándares: 2, 4, 8, 20, 50 y 100 mg. Se utilizó un co-polímero de ácido R-3-hidroxitúterico (3HB) y ácido R-3-hidroxitúterico (3HV) en proporción 8:2 (Sigma Aldrich).

#### 4.3.5. Tinciones

Se realizaron pruebas cualitativas para observar la presencia de PHA por medio de la tinción de Negro de Sudán.

Se toma una muestra del reactor y se fija sobre un cubreobjetos; encima de esta preparación se colocan unas cuantas gotas de la solución negro de Sudán (0.3% w/v en etanol al 70% v/v) y se deja reposar durante 10 min. Se enjuaga con etanol durante 1 s y se enjuaga abundantemente con agua. Una vez seca la preparación se coloca la solución de safranina (0.5% w/v en agua), el cual es el colorante de contraste, después de 10 s se enjuaga con agua. Cuando el cubre objetos está completamente seco se le coloca encima una gota de aceite de inmersión y se observa al

microscopio de contraste de fases (Nikkon Eclipse 400 equipado con una cámara fotográfica a color) con el objetivo de inmersión 100X. La presencia de PHA se observa como gránulos oscuros en el interior de las células, mientras que la pared y el citoplasma celular se tiñen de color rojo.

#### 4.4. Cálculos

- Concentración inicial de sustrato  $S_0$  (mgDQO/L)

La concentración inicial de fuente de carbono en cada pulso se midió solo al inicio de ciertos pulsos de alimentación midiendo la concentración de ácidos grasos volátiles (acetato y propionato) por medio de la técnica de cromatografía de gases. Las concentraciones teóricas difieren aproximadamente en un 5% con respecto a las mediciones reales. La mezcla alimentada se compone de acetato y ácido propiónico en una proporción 70:30 en DQO.

- Concentración inicial de sustrato  $S_0$  (Cmmol/L)

Para el cálculo de ciertos coeficientes de rendimiento fue necesario expresar la concentración inicial de sustrato en moles de carbono.

$$S_0(\text{Cmmol/L}) = \left( 0.7 \cdot \left| \frac{S_0 \text{ mgDQO}}{L} \right| \frac{2 \text{ Cmmol}}{2 \text{ mmolO}_2} + 0.3 \cdot \left| \frac{S_0 \text{ mgDQO}}{L} \right| \frac{3 \text{ Cmmol}}{3.5 \text{ mmolO}_2} \right) \cdot \left| \frac{1 \text{ mmolO}_2}{32 \text{ mgDQO}} \right|$$

- Concentración de PHA (mg/L)

El co-polímero obtenido se compone de dos subunidades: HB (hidroxibutirato) y HV (hidroxivalerato). La concentración total de PHA es la suma de estos dos monómeros:

$$PHA(\text{mg/L}) = HB + HV$$

- Concentración de PHA (Cmmol/L)

Para el cálculo de la concentración de PHA en moles de carbono, se tomó como base de cálculo el peso molecular de la fórmula empírica de cada monómero.

$$HB(Cmmol/L) = \left| \frac{HB \text{ mg}}{L} \right| \left| \frac{Cmmol}{21.52mg} \right| \quad CH_{1.5}O_{0.5}$$

$$HV(Cmmol/L) = \left| \frac{HV \text{ mg}}{L} \right| \left| \frac{Cmmol}{20.02mg} \right| \quad CH_{1.6}O_{0.4}$$

- Concentración de PHA (mgDQO/L)

La formación de PHA expresada en miligramos de oxígeno fue obtenida convirtiendo los resultados analíticos en unidades de DQO (Demanda Química de Oxígeno) usando los siguientes coeficientes estequiométricos de oxidación (Dionisi *et al.* 2004):

$$\frac{1.38mgDQO}{mg HB}$$

$$\frac{1.63mgDQO}{mg HV}$$

- Biomasa residual (mg/L)

Los PHA son metabolitos intracelulares. La biomasa residual activa es la diferencia entre los sólidos suspendidos volátiles y la concentración de PHA total.

$$X(mg/L) = SSV(mg/L) - PHA(mg/L)$$

- Biomasa residual (Cmmol/L)

Para el cálculo de algunos parámetros cinéticos y de rendimiento experimentales, fue necesario expresar  $X$  en términos de moles de carbono, de la siguiente manera:

Fórmula empírica de biomasa residual:  $CH_{1.4}O_{0.4}N_{0.2}$

1 Cmmol = 22.623 mg

$$X(Cmmol/L) = \left| \frac{(SSV - PHA)mg}{L} \right| \left| \frac{Cmmol}{22.623mg} \right|$$

- Fracción de PHA

La fracción de PHA intracelular se calculó en relación molar (mol/mol) y en peso seco celular (mg/mg), como se muestra a continuación.

$$f_p \quad (C_{mmol} / C_{mmol})$$

$$f_p = \frac{PHA}{X} = \frac{\% PHA}{100 - \% PHA} \cdot \frac{P_M(X)}{P_M(P)}$$

$$f_p \quad (mgPHA / mgSSV)$$

$$f_p = \frac{PHA}{X + PHA} = \% PHA = \frac{PHA(mg / L)}{SSV(mg / L)}$$

#### 4.5. Propuesta del modelo matemático de acumulación de PHA

Para la obtención de la estructura del modelo matemático, se examinaron diferentes expresiones cinéticas de la literatura que describen el comportamiento de las variables de salida seleccionadas: la desaparición de sustrato, la aparición del producto y la generación de nuevas células.

Se realizaron experimentos encaminados a la determinación de los parámetros del modelo propuesto, a través de la obtención de datos manipulando algunas variables como son: la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de nitrógeno y la composición de la alimentación.

Una vez establecidas las cinéticas, se estimaron los parámetros (cinéticos y de rendimiento) del modelo que mejor se ajustaran con los datos experimentales y se minimizó el error a través de métodos estadísticos. Los coeficientes estequiométricos elementales fueron obtenidos de la literatura, mientras que otros fueron calculados experimentalmente.

Para la estimación de los parámetros cinéticos y la validación del modelo se desarrolló un programa en MATLAB™. Antes de incorporar el modelo en el programa de optimización es necesario comprobar la validez del modelo; es decir, saber la precisión con la cual se traducen los fenómenos. Para este fin se realizaron simulaciones con ayuda del modelo para predecir las variables más importantes del proceso y se evaluó la desviación entre los valores experimentales y los valores proporcionados por el modelo. Si la correlación entre las simulaciones con el modelo y los datos experimentales es alta, el modelo es aceptado; pero si el ajuste es pobre resulta necesario revisar el modelo cinético e ir a través del ciclo de modelado otra vez (fig. 4.7).

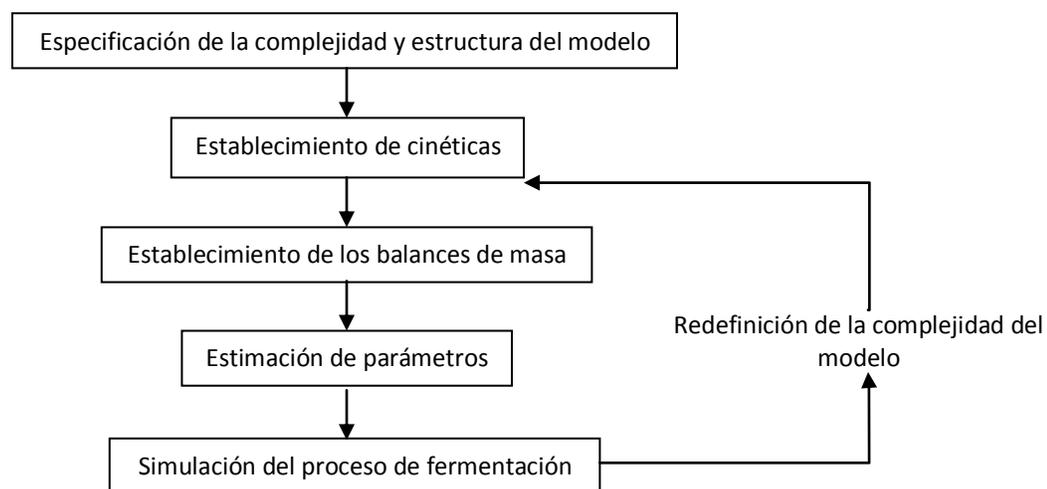


Figura 4. 7 Pasos para el desarrollo del modelo matemático

#### 4.5.1. Suposiciones del modelo

El objetivo de este trabajo es obtener un modelo matemático que en un futuro permita optimizar la producción de PHA en cultivos mixtos. En esta primera fase se postuló la complejidad del modelo matemático. Para ello se definió el número de reacciones involucradas y la estequiometría de las mismas.

Los modelos matemáticos para cultivos mixtos (ASM1, ASM2, y ASM3), se caracterizan por modelos cinéticos complejos debido a la existencia de diferentes tipos de microorganismos que compiten por los nutrientes en el medio de cultivo. Sin embargo, en este trabajo se consideraron algunas hipótesis con el fin de simplificar el modelo celular a sólo dos componentes.

- Sólo se consideraron organismos heterótrofos. A pesar de que hay varios tipos de microorganismos en el inóculo, los ciclos de abundancia y ayuno seleccionan organismos heterótrofos (Dias, *et al.*, 2005).
- Cultivo celular homogéneo. Se asume que los organismos heterótrofos presentan un metabolismo promedio que no cambia significativamente en el tiempo (Serafim *et al.*, 2004). En el sistema experimental empleado, el reactor de enriquecimiento selectivo (SBR) había sido operado durante casi un año y se observó que la capacidad de almacenamiento de PHA se mantiene estable. En estas circunstancias el cultivo mixto puede ser tratado como un cultivo homogéneo.
- Medio sintético. Todos los nutrientes se encuentran en exceso a excepción del nitrógeno y la fuente de carbono, los cuales son variables de proceso.
- La biomasa se constituye por dos fracciones: PHA y la biomasa residual (proteínas, ácidos nucleicos, membrana celular, etc.).
- La acumulación de polímero puede inhibir su propia producción cuando llega a cierta concentración dentro de las células (Riascos y Pinto, 2004).
- El oxígeno es un factor muy importante en la producción de PHA. Concentraciones extremadamente bajas de oxígeno disuelto son limitantes en la generación de biomasa y síntesis de PHA, mientras que altas concentraciones de oxígeno disuelto (cerca de la saturación) son inhibitorias en la producción de polímero (Riascos y Pinto, 2004; Serafim *et al.*, 2004). Se ha demostrado que el rendimiento de PHA (g PHA/g sustrato) es mayor a baja concentración de oxígeno disuelto, pero sin llegar a ser limitante. Los modelos metabólicos indican que cuando el oxígeno se encuentra en exceso, una fracción mayor de sustrato se dirige hacia el crecimiento celular (Dias *et al.*, 2006).
- El nitrógeno es un sustrato limitante en la generación de biomasa, porque toma parte en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Riascos y Pinto, 2004). La limitación de amonio causa un decremento en la velocidad de crecimiento e incrementa el rendimiento de acumulación de sustrato y su productividad (Riascos y Pinto, 2004; Serafim *et al.*, 2004; Dionisi *et al.*, 2005).
- Los AGV son sustratos limitantes (a bajas concentraciones) e inhibidores (a concentraciones altas) en la producción de PHA y biomasa (Riascos y Pinto, 2004; Serafim *et al.*, 2004).

#### 4.5.2. Obtención de datos experimentales para caracterizar el comportamiento del sistema de producción de PHA

El modelo de acumulación de PHA propuesto en este trabajo considera el efecto de diferentes condiciones de operación en el reactor de producción. Se determinó la dependencia de las variables de salida con respecto a las de entrada, aislando o reduciendo el efecto de éstas últimas y observando su influencia en el sistema. Para este fin fue necesaria la realización de experimentos modificando los parámetros de operación.

El modelo propuesto fue validado con datos experimentales obtenidos en un reactor que alimenta automáticamente pulsos de acetato y propionato de acuerdo a los cambios en el flujo de aire medido. Los experimentos se realizaron en tres bloques de experimentos manipulando la concentración del influente empleado como fuente de carbono, la concentración de oxígeno disuelto y la concentración de nitrógeno.

- **Concentración de oxígeno disuelto de referencia.** Se controló la concentración de oxígeno disuelto cerca de un valor de referencia para crear diferentes condiciones de oxígeno disponible: 0.5 mg/L, 3.0 mg/L y 5.5 mg/L. Estos experimentos tuvieron el objetivo de determinar la existencia de algún efecto del oxígeno disuelto en la tasa de almacenamiento de PHA bajo condiciones de limitación (Exp. 3) o exceso (Exp. 2).

**Tabla 4. 7 Acumulación de PHA con diferente concentración de oxígeno disuelto de referencia**

Experimento	S (mg DQO/L)	OD (mg/L)	N (mg/L)
2	100	<b>5.5</b>	20
1	100	<b>3.0</b>	20
3	100	<b>0.5</b>	20

\*Los bloques de experimentos se realizaron por triplicado de manera aleatoria

- **Concentración inicial de nitrógeno.** Se llevaron a cabo experimentos a diferente concentración inicial de nitrógeno (tabla 4.8), los reactores se alimentaron con nitrógeno una sola vez al inicio de cada experimento: 0 mgN/L, 20 mgN/L y 40 mgN/L. En el experimento 4, sin suministro de amonio, tenía como propósito identificar el flujo de AGV hacia la formación de PHA. En el experimento 5, con presencia de amonio, se pretendió identificar el flujo de AGV hacia acumulación de PHA, o bien, hacia crecimiento de biomasa activa.

**Tabla 4. 8 Experimentos de acumulación de PHA a diferente concentración inicial de nitrógeno**

Experimento	S (mg DQO/L)	OD (mg/L)	N (mg/L)
4	100	3.0	<b>0</b>
1	100	3.0	<b>20</b>
5	100	3.0	<b>40</b>

\*Los bloques de experimentos se realizaron por triplicado de manera aleatoria

- **Concentración inicial de ácidos grasos volátiles.** Se realizaron experimentos de acumulación de PHA alimentando AGV en pulsos del mismo tamaño usando cuatro diferentes concentraciones iniciales después de la aplicación de cada pulso de sustrato: 33 mg DQO/L, 100 mg DQO/L, 500 mg DQO/L y 1000 mg DQO/L. El objetivo de estos experimentos fue averiguar si existe una concentración de sustrato óptima para maximizar la tasa de consumo de fuente de carbono y la tasa de síntesis de PHA. En el experimento 6, se alimentaron pulsos pequeños de sustrato para observar la influencia en la tasa de acumulación de PHA en comparación con pulsos de mayor tamaño del experimento 1. En el experimento 8, se alimentaron pulsos de AGV en concentraciones altas para identificar si existe inhibición en la acumulación de PHA.

**Tabla 4. 9 Experimentos de acumulación de PHA con diferente concentración de AGV en los pulsos de alimentación**

Experimento	S (mg DQO/L)	OD (mg/L)	N (mg/L)
6	<b>33</b>	3.0	20
1	<b>100</b>	3.0	20
7	<b>500</b>	3.0	20
8	<b>1000</b>	3.0	20

\*Los bloques de experimentos se realizaron por triplicado de manera aleatoria

Los experimentos 5 y 7 fueron usados para validar el modelo. Es importante resaltar que en todos los ensayos se alimentaron los pulsos necesarios para saturar las células de PHA. Esto permitió identificar la inhibición que tiene la acumulación de PHA sobre su propia tasa de síntesis, así como sobre la tasa de consumo de AGV. Al final de los experimentos se calculó la tasa de mantenimiento a partir de acetato, ya que en este punto no existe acumulación de PHA ni crecimiento de biomasa.

### 4.5.3. Cálculo de parámetros cinéticos y rendimientos experimentales

- Tasa máxima de consumo de fuente de carbono. Se calculó al final de los primeros pulsos de alimentación de fuente de carbono

$$q_s^* = \frac{\Delta S_{n=1}}{X \cdot \Delta t_{n=1}} \quad (\text{Cmmol} / \text{Cmmol} \cdot \text{h})$$

- Rendimiento de PHA con respecto a la fuente de carbono. La tasa de rendimiento de PHA respecto a la fuente de carbono se calculó aproximadamente a las 10 horas después de haber iniciado la cinética, que es cuando se alcanza la máxima acumulación de PHA.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta PHA_f}{\Delta S - \Delta S_m}$$

$$\Delta PHA_f = PHA_{f(10h)} - PHA_0$$

$$\Delta S = n \cdot S_o$$

$$\Delta S_m = m_s \cdot X \cdot \Delta t$$

donde  $n$  es el número de pulsos suministrados,  $S_o$  es la concentración de sustrato en el reactor después de suministrar cada pulso,  $\Delta t$  es el tiempo que duró la acumulación y  $\Delta S_m$  es la cantidad de sustrato total empleada para mantenimiento celular que se calcula a partir del coeficiente de mantenimiento celular,  $m_s$ , considerando que la biomasa residual,  $X$ , es constante.

- Coeficiente de mantenimiento en ácidos grasos volátiles. El coeficiente de mantenimiento celular a partir de ácidos grasos volátiles se asumió como constante. Se calculó durante los pulsos finales de algunos experimentos de acumulación de PHA, cuando ya no existe acumulación de PHA ni crecimiento de biomasa y el sustrato consumido sólo se utiliza para el mantenimiento celular. Para calcular este coeficiente se consideró la biomasa total (biomasa residual y fracción de PHA).

$$m_s = \frac{\Delta S - \Delta S_{n=i}}{(X + \Delta PHA_f) \cdot (t_f - t_{n=i})}$$

donde  $i$  corresponde al ciclo a partir del cual ya no existe acumulación de PHA y el subíndice  $n=i$  se emplea para indicar el cálculo de ese parámetro al final de este  $i$ -ésimo ciclo.

#### 4.5.4. Simulación del modelo

Para la evaluación, calibración y validación del modelo matemático propuesto se desarrolló un módulo de simulación en Matlab™ (Ver. 7.5.0), en el cual se implementó simultáneamente la estimación de parámetros y la minimización de la suma de errores cuadráticos (SEC).

El programa de simulación se alimentó con los datos de entrada:

- Una matriz de tiempo  $T$ . Indica el tiempo en el que se alimentó cada uno de los pulsos de sustrato a lo largo de toda una cinética de acumulación.
- Biomasa inicial  $X_0$ . Concentración de sólidos suspendidos volátiles con los cuales se inició el cultivo.
- Concentración de sustrato inicial  $S_0$ . Concentración de AGV inicial en cada uno de los pulsos de alimentación.

A partir de los datos de entrada anteriores, el simulador es capaz de predecir el consumo de sustrato, así como la concentración y fracción de PHA intracelular.

## Capítulo 5 Resultados y Discusión

### 5.1. Obtención de un cultivo mixto bacteriano con alta capacidad de almacenar PHA

#### 5.1.1. Desempeño del Reactor de Enriquecimiento Selectivo (RES)

El reactor de enriquecimiento selectivo de un cultivo con alta capacidad de acumular PHA fue inoculado con lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (ver apartado 4.2.1). Las observaciones al microscopio y el índice volumétrico de lodos indicaron que en el inóculo había bacterias formadoras de flóculos con buena sedimentabilidad con un IVL de 150 mL/mg. Durante la etapa de aclimatación se observó la formación de flóculos compactos (fig. 5.1).

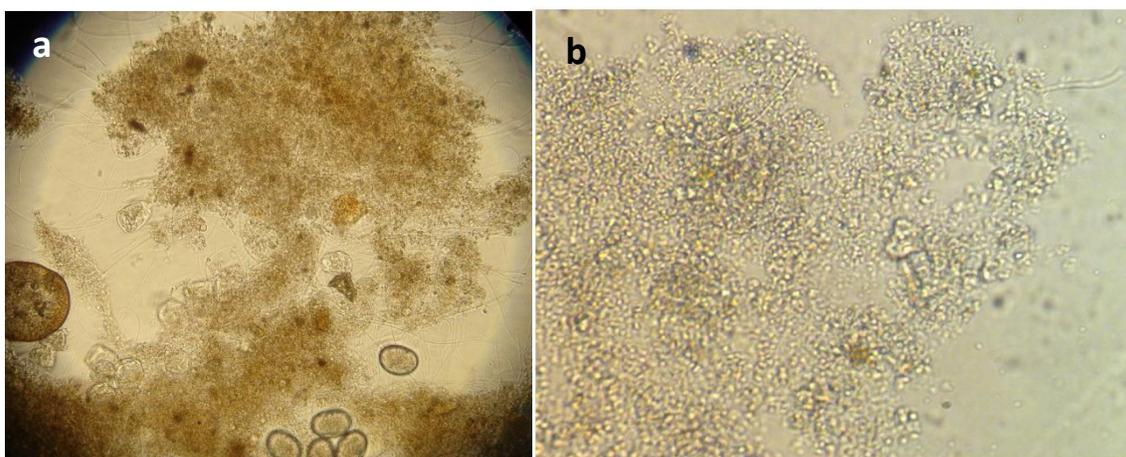


Figura 5. 1 Vistas al microscopio del inóculo (a) y del cultivo en el reactor de enriquecimiento selectivo a los 90 días de operación (b) 200X

El reactor de enriquecimiento selectivo fue operado ininterrumpidamente por más de 350 días desde mayo del 2009. En la figura 5.2 se muestra la evolución del desempeño de acumulación de

PHA durante el periodo de operación del SBR. La biomasa tomada del reactor de lodos activados y posteriormente inoculado en el sistema de Alimentación Dinámica Aerobia (ADF), mostró una rápida adaptación a las nuevas condiciones, resultando en una alta producción de PHA desde los primeros días, llegando hasta una acumulación de PHA del 22% en peso seco celular durante la estabilización del reactor. El aumento rápido de la fracción de PHA en el cultivo durante los primeros días de operación se debe a la disminución de biomasa que no fue capaz de adaptarse a las condiciones de alimentación de abundancia y ayuno y al enriquecimiento de biomasa acumuladora de PHA. Esta pérdida de biomasa también se puede deber a la baja concentración de oxígeno disuelto durante la fase de abundancia (hasta 0.5 mgO<sub>2</sub>/L), pues se ha reportado que concentraciones menores al 10% de saturación de oxígeno, resultan limitantes en la aclimatación de cultivos acumuladores de PHA (Serafim, *et al.*, 2004).

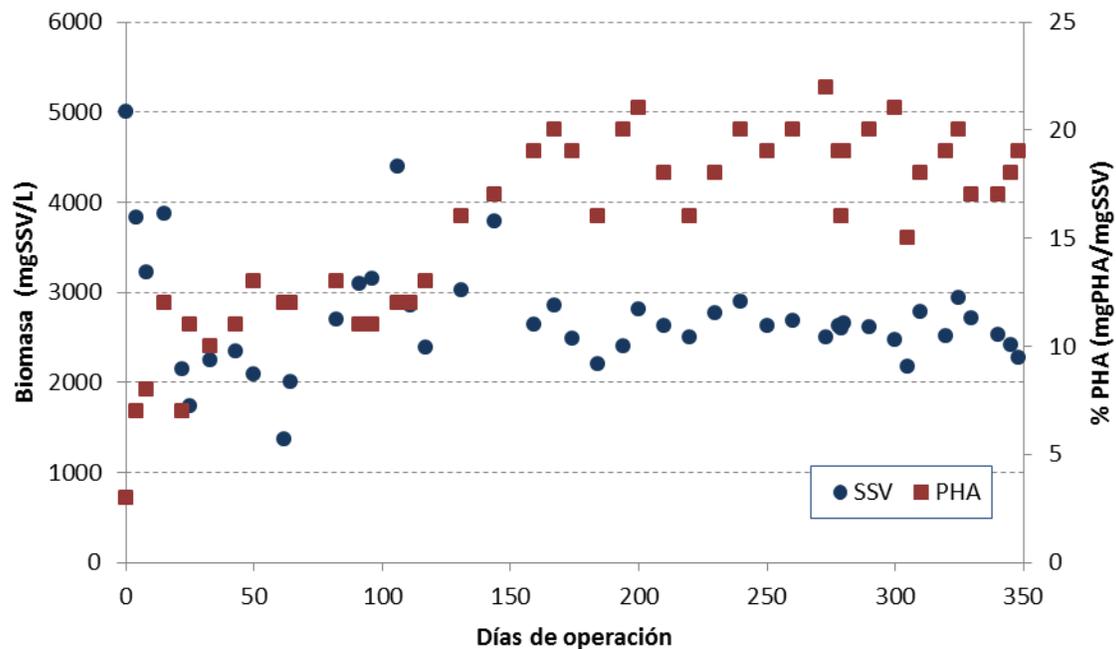


Figura 5. 2 Perfil de sólidos suspendidos volátiles y fracción de PHA durante la fase de abundancia en el reactor de enriquecimiento selectivo

A partir del día 30, se alcanzó una acumulación estable de PHA, sin embargo, la duración de la fase de abundancia y la concentración de sólidos suspendidos al final del lote eran variables entre un ciclo y otro. A pesar del buen desempeño en la acumulación de PHA, a partir del día 25 se detectó la presencia de microorganismos filamentosos, que causaron la inestabilidad del reactor (manifestada en una sedimentabilidad deficiente y formación de espumas). Como se aprecia en la fig. 5.3, existe un predominio de bacterias filamentosas, que aunque tienen gran capacidad de acumulación de PHA provocan un fenómeno conocido como “bulking”, donde hay una pérdida de

biomasa en el efluente debido a la baja sedimentabilidad del lodo. Este fenómeno ya se ha reportado para la producción de PHA por cultivos mixtos (Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M, 2004 y Pandolfi, et al., 2007) y es un problema común en plantas de tratamiento por lodos activados, para lo cual existen varias teorías, algunas de ellas contradictorias entre sí, pero sin ninguna solución en concreto.

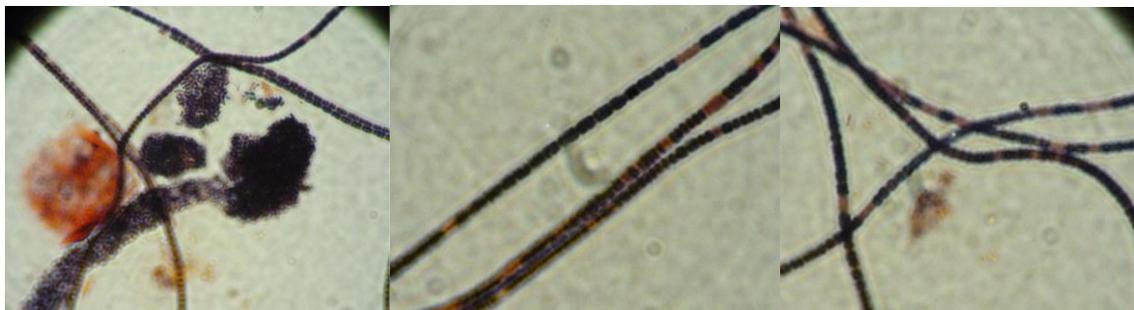


Figura 5. 3 Bacterias filamentosas acumuladoras de PHA (1000X), 20 días de operación SBR

Para evitar que la proliferación de organismos filamentosos provocara un lavado progresivo del reactor se realizaron ajustes en las condiciones de operación del reactor de acuerdo al trabajo de Yu y Qi-Shan (2005), donde se hacen recomendaciones específicas para evitarlo y se exponen las posibles causas del crecimiento filamentosos que incluyen los largos tiempos de retención celular, la baja concentración de sustrato, la deficiencia en la transferencia de oxígeno, la temperatura alta, el bajo pH y los regímenes de flujo.

A partir del día 30, se realizaron algunos cambios tratando de no perturbar demasiado el sistema. Se disminuyó el tiempo de sedimentación de 30 min a 10 min, así como el tiempo de retención celular de 30 a 10 días para desfavorecer el crecimiento filamentosos (el cual necesita un largo tiempo de retención celular,  $\theta_c$ ). Como se observa en la fig. 5.2, con esta medida hubo pérdida de biomasa hasta el día 60, pero se favoreció la población formadora de flóculos.

Durante la etapa de abundancia, se observó que la concentración de oxígeno disuelto llega a niveles por debajo de 1 mg/L, lo que representa un problema, ya que algunas bacterias filamentosas presentan una alta afinidad por el oxígeno a bajas concentraciones. Por esta razón se aumentó el flujo de aire de 1.5 L/min a 2 L/min a partir del día 30.

Por otra parte, la aclimatación se inició con una relación carbono-nitrógeno C/N muy baja (tabla 5.1) (Ramírez, 2009; Arcos, 2009). Esta razón, junto al bajo nivel de oxígeno disuelto durante la fase de abundancia y la limitación de sustrato durante la fase de ayuno, son los factores que favorecieron la proliferación de microorganismos filamentosos.

A partir del día 60, se realizó un cambio en la disponibilidad de nitrógeno con respecto a la fase I (tabla 5.1), se ajustó la relación de nutrientes C:N:P a 100:5:1, de acuerdo a lo que ampliamente se recomienda (Metcalf & Eddy, 2003).

Tabla 5. 1 C/N durante las dos fases de la etapa de enriquecimiento selectivo

Fase	DQO (mg/L)	N (mg/L)	DQO/N
I (1-69 d)	375	3.92	95
II (70-350 d)	375	18.75	20

En cuanto a la concentración de fuente de carbono, no se tomó ninguna medida al respecto, aunque se sabe que los microorganismos filamentosos presentan, en general, una mayor afinidad por el sustrato en condiciones de baja concentración, mientras que las floculantes presentan una mayor afinidad a altas concentraciones de sustrato. Aunque las bacterias filamentosas tienen una ventaja sobre las floculantes ante bajas concentraciones de sustrato (debido a que tienen mayor área específica), no se favorecen con largos periodos de inanición. Por esto, se decidió aumentar también la duración del ciclo.

Tabla 5. 2 Parámetros de operación durante la operación del SBR

Condición	Tiempo de sedimentación (min)	Duración de ciclo (h)	Fa (L/min)	SSV Efluente (mg/L)	IVL (mL/g)	$\Theta_c$ (d)	PHA (DQO/L)
I (1- 69 d)	30-50	6	1.5	64	259-400	31	230
II (70-350 d)	5-10	12	2.0	20	88	10	624

Los cambios realizados durante este periodo favorecieron a las bacterias formadoras de flóculos y los cambios fueron visibles desde los primeros días. Después de una semana y hasta el día 60 se observó el predominio de flóculos sobre los filamentos (fig. 5.4), aunque estos últimos siguieron presentes en el sistema pero se lograron mantener bajo control.

En la fig. 5.4 se muestra la evolución de la población del reactor SBR, donde es posible observar agregados celulares y filamentos con gránulos de PHA en su interior. En la tabla 5.2 se observan los parámetros de operación del reactor durante las dos fases de operación, en la fase II, el IVL

pasó de 400 g/L a 100 g/L, la concentración de sólidos en el efluente disminuyó, y la concentración de PHA aumentó.

Durante la operación del reactor, se detectó cualitativamente la presencia de PHA a través de tinciones con el colorante negro de Sudán, el cual tiñe específicamente cuerpos lipofílicos en el interior de las células, como son los gránulos de PHA. En la fig. 5.3, donde se realizó la tinción durante la etapa de abundancia, se observa gran cantidad de agregados celulares que contienen PHA y una presencia incipiente de bacterias filamentosas acumuladoras de PHA.

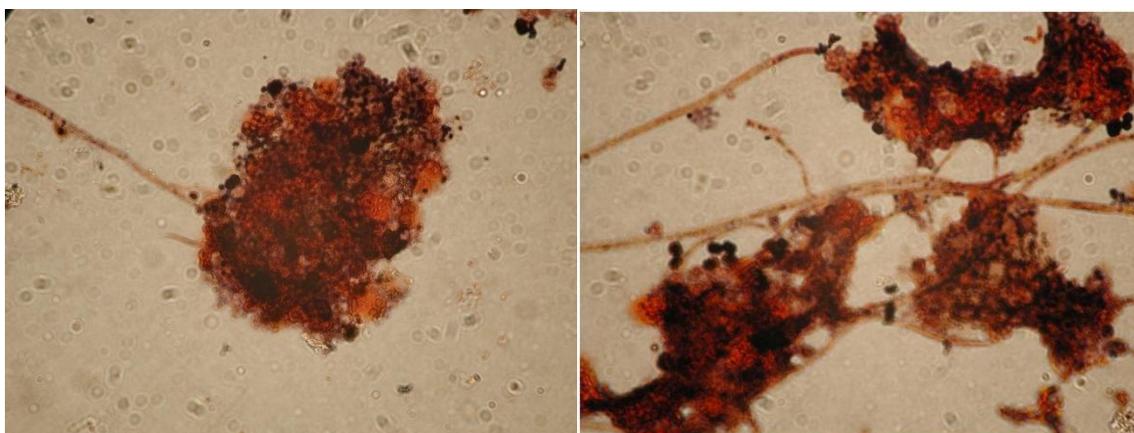


Figura 5. 4 Imágenes de bacterias filamentosas y formadoras de flóculos capaces de acumular PHA, después de un pulso de AGV,  $t=1h$  (1000X), 2 meses de operación SBR

Desde el día 159 hasta el final de la etapa experimental de este trabajo todos los parámetros medidos en el reactor de enriquecimiento se estabilizaron; es decir, se mantuvo casi constante la concentración de sólidos suspendidos al final del ciclo, así como la fracción de PHA y la duración de las fases de ayuno y abundancia, lo cual fue apreciable por los cambios en el oxígeno disuelto. Con referencia a este estado estable, en la siguiente sección se muestran los resultados de los estudios de ciclo realizados en el reactor de enriquecimiento selectivo.

### 5.1.2. Estudios de ciclo en el reactor de enriquecimiento selectivo

Para la obtención del modelo matemático es necesario que el cultivo mixto posea una producción estable de polímero, por lo que antes de los experimentos en el reactor de producción de PHA se realizaron estudios de ciclo en el reactor de enriquecimiento para caracterizar los perfiles de consumo de sustrato y de producción de PHA.

En la figura 5.5 se muestra un ciclo típico durante la fase II de operación del reactor SBR de enriquecimiento selectivo (duración total del ciclo de 12 h, 2 min de llenado, 11.5 h de reacción, 5 de sedimentación, 5 min de vaciado y 18 min de tiempo de espera). Como es posible observar, el agotamiento de la fuente de carbono en el medio de cultivo ocurre durante los 20 minutos posteriores al suministro de sustrato y sucede un aumento en el pH debido a la desaparición de los ácidos grasos volátiles. El final de la etapa de abundancia (agotamiento de sustrato externo) coincide con el incremento del oxígeno disuelto, el cual tiende rápidamente a la concentración anterior a la adición de fuente de carbono. La acumulación de PHA a partir de AGVs alcanza su máxima concentración después de una hora de haber iniciado el cultivo. En la etapa de ayuno, no hay sustrato externo disponible para las células, así que se hace uso de las reservas de carbono acumuladas en forma de PHA. En comparación con la tasa de acumulación de PHA, la tasa de consumo es muy baja durante el periodo de ayuno. Después de tres réplicas de la cinética en el reactor de enriquecimiento y al observar un comportamiento homogéneo, se determinó que ya se contaba con biomasa estabilizada para proseguir con los experimentos en el reactor de producción de PHA (160 días).

Durante la operación del reactor SBR hubo crecimiento de biomasa, alcanzando una tasa máxima de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  durante la fase de abundancia. El cultivo tiene la capacidad de crecer y almacenar PHA al mismo tiempo. Este fenómeno se ha observado en otros cultivos mixtos (Serafim, *et al.*, 2004) y en cultivos recombinantes de *Escherichia coli* (Sudesh *et al.*, 2000). Esto contrasta con el almacenamiento de PHA en cultivos puros (Lee, 1996), en donde es necesario limitar algún nutriente para conseguir que el sustrato sea acumulado. En los cultivos mixtos el sustrato consumido es utilizado para la acumulación de PHA, para el crecimiento celular y para los procesos de mantenimiento celular.

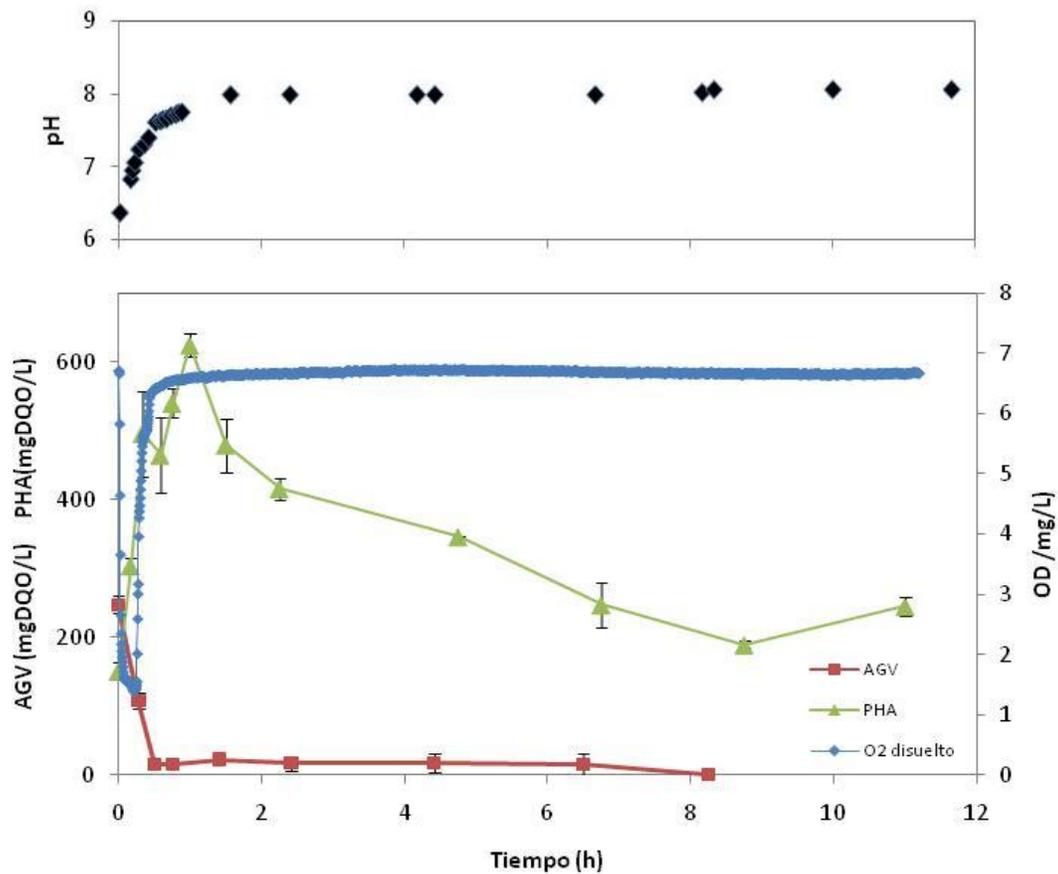


Figura 5. 5 Perfiles típicos de AGV, PHA, OD y pH durante un ciclo en el reactor SBR operado bajo la estrategia ADF. Fase II

Las bacterias dentro del reactor SBR están sometidas a un crecimiento no-equilibrado (Grau *et al.*, 1991), en donde una parte del sustrato que ha sido almacenado por los microorganismos (en forma de PHA) es usado para el mantenimiento celular debido a la falta de fuente de carbono y nitrógeno. Las bacterias floculantes presentan una mayor capacidad de almacenamiento de sustrato, en comparación con las filamentosas, especialmente tras ser sometidas a un largo periodo de inanición que regenera su capacidad de almacenamiento. La materia orgánica almacenada de esta forma favorece su supervivencia posterior en condiciones de baja concentración de sustrato. Alternando los ciclos de abundancia y ayuno se mantienen las condiciones dinámicas adecuadas para mantener un cultivo mixto con gran capacidad de sintetizar PHA.

En la estrategia de alimentación dinámica aerobia, el oxígeno disuelto es una variable de proceso muy importante, ya que si se encuentra a bajas concentraciones, la tasa de transferencia es

insuficiente para satisfacer la tasa de respiración de los microorganismos, lo que limitaría el consumo de AGV y la acumulación de PHA. En caso contrario, si la concentración de oxígeno es muy alta sería difícil monitorear cambios en la concentración de oxígeno disuelto e identificar el término de la fase de abundancia.

Como se aprecia en la tabla 5.3, durante la fase II de operación la etapa de abundancia es más corta, por lo que la tasa de consumo de AGV destinada a la acumulación de PHA también es mayor. Además se logra un mayor porcentaje de acumulación de PHA y una mayor tasa de acumulación.

Tabla 5. 3 Valores promedio de los parámetros medidos durante los ciclos en el SBR

	FASE I (1 - 69 d)		FASE II (70-350)	
	Fase de abundancia	Fase de ayuno	Fase de abundancia	Fase de ayuno
Duración de la fase (min)	50	250	20	640
Sustrato residual AGV (mgDQO/L)*	71	0	14	0
PHA total (mgDQO/L)*	239 (70.4)	140	624 (68)	244
Tasa de acumulación de PHA (mgDQO/L/h)	<b>287(84.8)</b>		<b>1636 (204)</b>	
Tasa de remoción de sustratos (mgDQO/L/h)				
Externo (AGV)	232		466	
Interno (PHA)		17.3		35
Biomasa (mgSSV/L)*		2712 (655.3)		2725 (338.5)
Contenido de PHA en el interior de las células (mgPHA/mgSSV) (%)*	9.6 (1.8)		18.7 (2.0)	

Nota: \*Los parámetros fueron medidos al final de las fases de abundancia o ayuno.

Los valores entre paréntesis representa el intervalo de confianza a un nivel de confianza del 95%

Aunque en este trabajo se reporta un largo periodo de operación estable del reactor de enriquecimiento, las acumulaciones logradas no son tan altas como en otros trabajos (53% en Johnson *et al.*, 2009; de 30 a 40% en Serafim *et al.*, 2004 y 50% en Beccari *et. al*, 1998). En este trabajo se obtuvieron acumulaciones de PHA de hasta 22% en peso celular, porque la concentración de AGV alimentados durante la fase de abundancia es menor en comparación con los trabajos anteriores. Se decidió bajar la relación F:M para que durante la fase de ayuno se consumiera la mayor cantidad posible de PHA y de este modo mantener la presión selectiva sobre el sistema.

Además, al final del ciclo en el SBR se tenía biomasa con muy poca cantidad de PHA intracelular, lo que es ventajoso para la realización de experimentos de acumulación en el reactor de producción. Como se explicará en las secciones siguientes, la acumulación de PHA se ve inhibida cuando el porcentaje de PHA llega a cierto valor.

En la figura 5.6 se observa un cromatograma correspondiente a una muestra del reactor de enriquecimiento durante la fase de abundancia. Los tiempos de retención corresponden a los obtenidos con los estándares, lo que indica la producción de PHA por el cultivo mixto. Se obtuvo el co-polímero PHB-PHV con un porcentaje de PHV del 60% en relación molar.

La biomasa proveniente del reactor SBR usada para los ensayos en el reactor de cultivo es desechada al término del experimento para no afectar el desempeño del reactor de enriquecimiento.

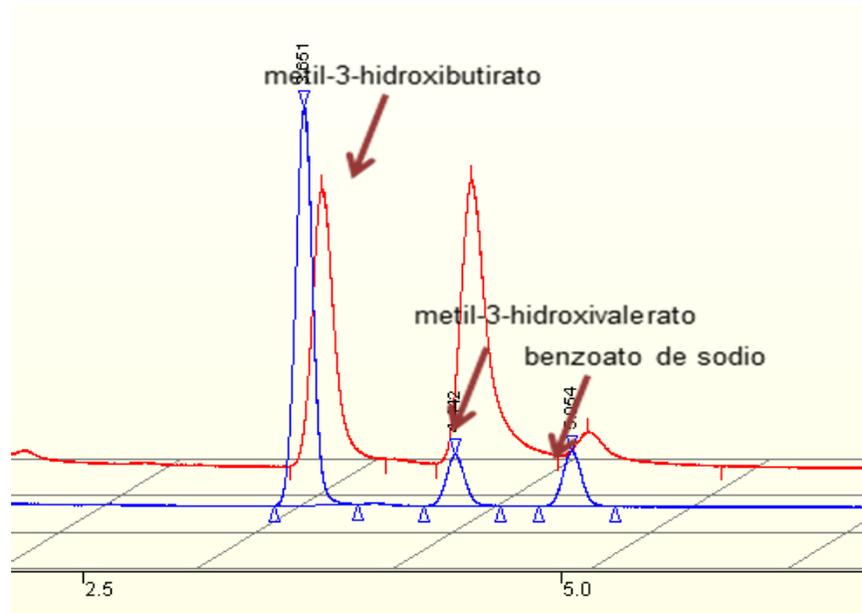


Figura 5. 6 Cromatograma de una muestra del reactor de enriquecimiento a los 60 min después del pulso de AGV

### 5.1.3. Estrategia de alimentación por pulsos controlando el oxígeno disuelto en el reactor de producción de PHA

Una estrategia que ha tenido gran éxito en la acumulación de PHA por cultivos mixtos a partir de aguas residuales es el uso de un sistema de alimentación automático que añade pulsos de sustrato en el reactor hasta saturar a las células de PHA (Tohyama *et al.*, 2000; Gurieff, 2007; Westerberg, 2007).

La operación estándar de los sistemas de producción de PHA utilizan la concentración de oxígeno disuelto como variable de control en el suministro de fuente de carbono (Serafim *et al.*, 2004; Gurieff, 2007). El modo de operación consiste en mantener un flujo de aire constante y monitorear el consumo de sustrato que se manifiesta como un rápido decremento en la concentración de oxígeno disuelto. Cuando el sustrato empieza a agotarse, la tasa de consumo de oxígeno disminuye y la concentración de oxígeno disuelto tiende a la concentración de saturación. El sistema alimenta un nuevo pulso de sustrato una vez que el OD aumenta hasta un valor de referencia.

Una de las desventajas de usar el oxígeno disuelto como la variable de control que indica cuándo alimentar los pulsos es la necesidad de establecer un suministro adecuado de oxígeno en el reactor para evitar que éste sea un factor limitante. Es necesario lograr que la transferencia de oxígeno al reactor sea mayor a la tasa de consumo de oxígeno de los microorganismos cuando están consumiendo el sustrato y sintetizando PHA. La mayoría de las veces la velocidad de aireación se establece de manera empírica y se mantiene constante. El problema de mantener la velocidad de aireación constante durante todo el proceso de acumulación de PHA, es que representa un gran gasto de energía eléctrica. Conforme las células se saturan de PHA, bajan su tasa de consumo de sustrato y su tasa de producción de PHA, y lo por tanto también disminuye su tasa de consumo de oxígeno.

Sin embargo, en este trabajo, en lugar de establecer un flujo de aire constante, la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo cerca de un nivel de referencia manipulando el flujo de aire a través de un controlador automático. Para este propósito se usó un controlador PID (proporcional integral derivativo). Cuando la concentración de oxígeno disuelto se controla en un valor fijo, las variaciones en la tasa de respiración de los microorganismos se manifiestan en la variable de control, es decir, en el flujo de aire que entra al reactor. La estrategia de control propuesta opera en comunicación con el reactor, es decir, se diseñó para detectar en tiempo real los cambios en el flujo de aire que indican el consumo de sustrato.

En la figura 5.7, se puede observar que el controlador PID es capaz de mantener la concentración de oxígeno disuelto en la concentración de referencia: cerca de la saturación (5.5 mg/L), a un nivel medio (3 mg/L) y a un nivel bajo de 0.5 mg/L. Aunque se esperan ciertas variaciones en la concentración de oxígeno disuelto con respecto a la concentración de referencia, sobre todo si se usa un controlador sencillo como el controlador PID, es posible detectar los cambios en la tasa de respiración a través de la señal de flujo de aire suministrado. A pesar de estas pequeñas variaciones, la ventaja de un controlador sencillo es su facilidad de aplicación práctica en escala real.

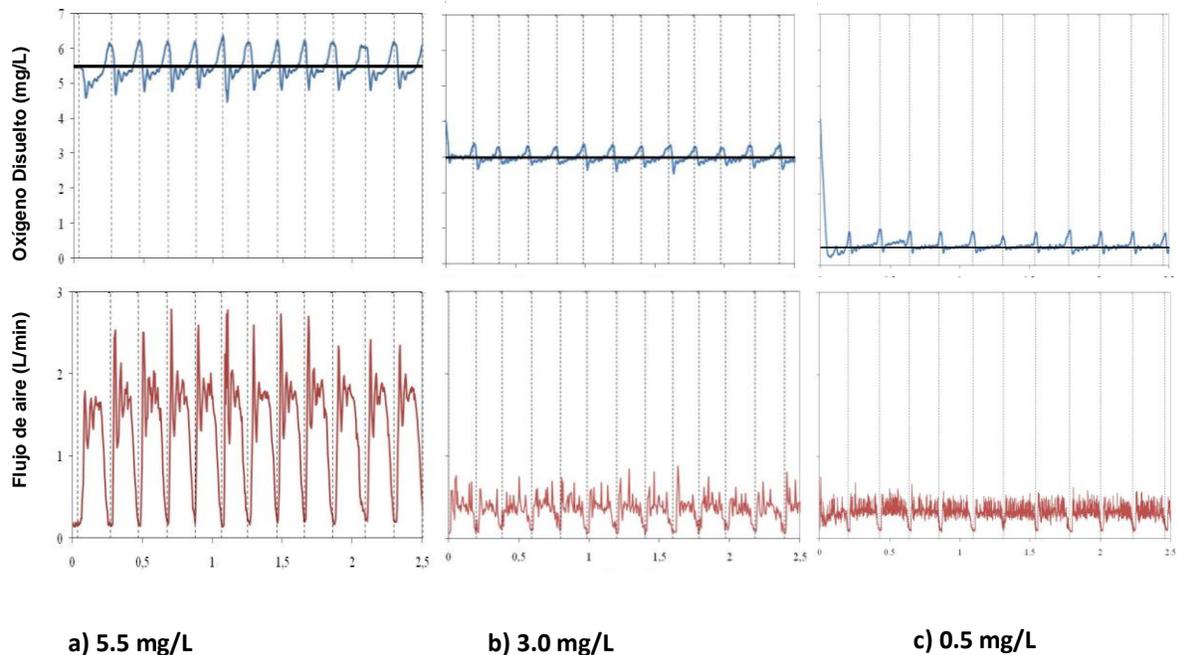


Figura 5.7 Monitoreo de oxígeno disuelto y flujo de aire durante la adición de pulsos para la producción de PHA para los doce primeros pulsos a (a) 5.5 mg/L, (b) 3.0 mg/L y (c) 0.5 mg/L (las líneas verticales indican la adición de pulsos)

Como también se muestra en la figura 5.7, el flujo de aire que entra al reactor es proporcional al nivel de oxígeno disuelto de referencia, es decir, para alcanzar un nivel de oxígeno de 5.5 mg/L es necesario suministrar un flujo de aire mucho mayor que para alcanzar una concentración de 0.5 mg/L. Además se observa que un aumento en el flujo de aire de entrada coincide con el incremento en la tasa de respiración de los microorganismos, pues su actividad es mayor cuando acumulan PHA y consumen los AGV presentes en el pulso de sustrato.

En esta estrategia de control, cuando se alimenta un pulso, el consumo de sustrato se manifiesta con un aumento repentino en el flujo de aire medido para compensar los requerimientos de los microorganismos y lograr mantener el nivel de oxígeno establecido. Tan pronto como se agota el sustrato externo, el flujo de aire disminuye ya que en este momento el oxígeno sólo es necesario para la respiración endógena, la cual es muy baja en este cultivo mixto. El algoritmo de control fue programado de tal manera que suministra el siguiente pulso de alimentación cuando el flujo de aire medido ha alcanzado el 10% del valor del flujo de aire máximo registrado durante el pulso anterior y cuando la concentración de oxígeno disuelto se encuentra por arriba del valor de referencia. Para los experimentos reportados en este trabajo los parámetros del controlador PID

son: una constante de proporcionalidad  $K_p = 0.7$ , tiempo integral  $T_i = 2$  min y un tiempo derivativo de  $T_d = 0.3$  min.

Durante los experimentos de acumulación de PHA se observó que cuando las células alcanzan saturación intracelular de PHA disminuyen su tasa de consumo de sustrato, por lo que los cambios en el flujo de aire son menos evidentes después de aproximadamente 15 horas. Se observó que al final de los cultivos en lote, los cuales se alimentaron hasta por 22 horas, el controlador mostró ciertos problemas para suministrar los pulsos. Sin embargo, a escala industrial los cultivos no se extenderían después de alcanzar la saturación de PHA, por lo que este controlador sería lo suficientemente simple, robusto y sensible para mantener la concentración de oxígeno disuelto cerca del valor preestablecido, así como para alimentar el sustrato en el momento adecuado a pesar de los cambios en la concentración y complejidad del efluente.

#### 5.1.4. Influencia de la concentración de oxígeno disuelto de referencia

El modelo conceptual de la acumulación de PHA a partir de cultivos mixtos considera la concentración de oxígeno disuelto como un factor de proceso muy importante. Con la nueva estrategia de alimentación por pulsos se realizaron pruebas a diferentes niveles fijos de oxígeno disuelto con el fin de determinar si la concentración de oxígeno disuelto tiene una influencia significativa en la producción de PHA.

Para establecer las condiciones en las cuales se maximiza la acumulación aerobia de PHA y el consumo de fuente de carbono, se realizaron experimentos con tres diferentes concentraciones de oxígeno disuelto de referencia (0.5, 3.0. y 5.5 mg/L). Se encontró que tanto la tasa de consumo de carbono como la fracción máxima de PHA son sensibles al nivel de oxígeno disuelto y que existe una concentración de OD en la cual se maximizan estos dos parámetros.

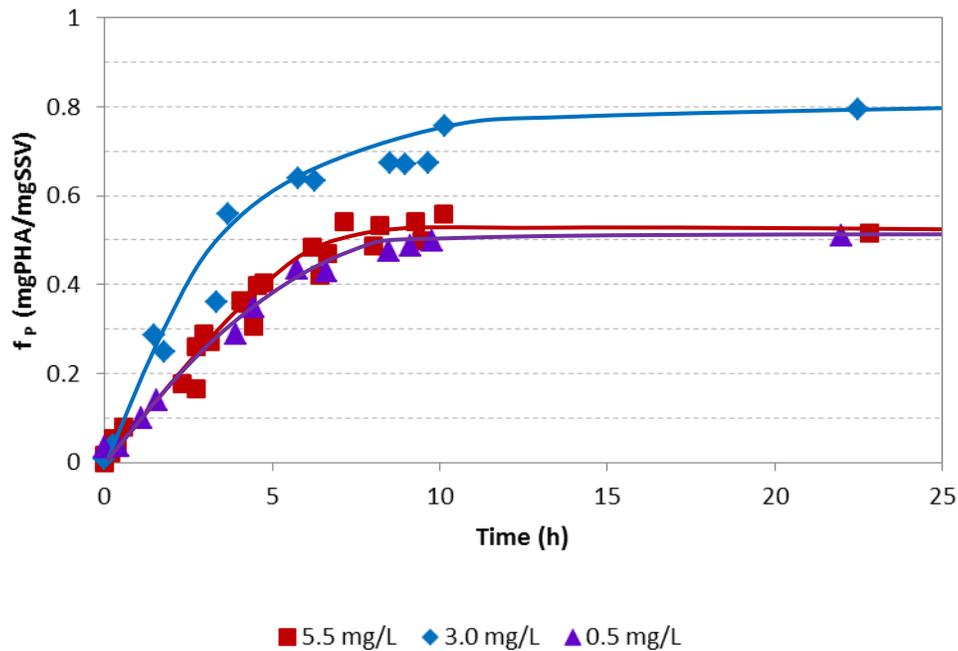


Figura 5. 8 Acumulación de PHA para diferentes niveles de oxígeno disuelto

Como se muestra en la fig. 5.7, con 3.0 mgO<sub>2</sub>/L, se alcanza una fracción de PHA del 79% (v/v), mientras que a concentraciones mayores (5.5 mgO<sub>2</sub>/L) y menores (0.5 mgO<sub>2</sub>/L) de OD se alcanza una fracción máxima de PHA de sólo 52 a 53%. Como se puede observar en la tabla 5.4, si el nivel de OD se mantiene en 3.0 mgO<sub>2</sub>/L, la tasa máxima de consumo de AGV ( $q_s^*$ ) es mayor que a 5.5 y 0.5 mgO<sub>2</sub>/L. También se observa que la proporción de AGV que entra a las células y es convertida a PHA es mayor a 3.0 mgO<sub>2</sub>/L ( $Y_{P/S}$  0.67 Cmmol/Cmmol) que a 5.5 mgO<sub>2</sub>/L ó 0.5 mgO<sub>2</sub>/L ( $Y_{P/S}$  0.55-0.56 Cmmol/Cmmol).

Los resultados experimentales usando ácidos grasos como fuente de carbono mostraron que el proceso aerobio de consumo de AGV, y por tanto la acumulación de PHA, es dependiente del nivel de oxígeno disuelto. En los trabajos de Third *et al.* (2003) y Kourmentza *et al.* (2009), se demostró que a menores velocidades de aireación se obtiene una mayor conversión de sustrato a PHA. Third *et al.* (2003) reporta un rendimiento de  $Y_{P/S}$  0.68 Cmmol/Cmmol bajo condiciones de limitación de oxígeno, mientras que cuando no se limita el oxígeno disuelto disponible se obtiene un rendimiento de  $Y_{P/S}$  0.48 Cmmol/Cmmol. En ese mismo trabajo, se encontró que la tasa de consumo de acetato depende de la velocidad de aireación: a mayor velocidad de suministro de oxígeno se produce una mayor tasa de consumo de sustrato. Cabe resaltar que en ambos reportes se utilizaron velocidades de aireación constantes, mientras en el presente trabajo, el flujo de aire

varió a lo largo del cultivo, aunque se manejaron diferentes niveles de flujo de aire máximo dependiendo de la concentración de oxígeno de referencia (fig. 5.7).

Hasta la fecha, no se han realizado experimentos previos usando cultivos mixtos para la producción de PHA a concentraciones de oxígeno disuelto constante. Sin embargo, simulaciones usando un modelo metabólico (Third *et al.* 2003; Dias *et al.* 2005) han mostrado que bajas concentraciones de OD favorecen la producción de PHA al preservar el poder reductor del medio de cultivo y minimizan el crecimiento celular. A bajas concentraciones de OD, se acumula NADH, lo que inhibe el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, limitando así la disponibilidad de adenosin trifosfato (ATP). La falta de ATP desfavorece significativamente el crecimiento de biomasa activa y la mayor parte de la fuente de carbono se utiliza para la producción del polímero. En contraste, altas velocidades de suministro de OD, proveen de una mayor cantidad de ATP, lo que favorece el crecimiento de biomasa y el decremento en el rendimiento de PHA. Los modelos metabólicos sugieren que las enzimas para síntesis de PHA son constitutivas, pero que su actividad es regulada a través de cambios en la concentración de otros metabolitos ( $\text{NADH} + \text{NAD}^+$ , acetil-CoA + CoA y ATP + ADP). La producción de PHA requiere acetil-CoA, y el poder reductor del NADH, mientras que la síntesis de otros componentes celulares requiere acetil-CoA y ATP en mayor medida.

Como se muestra en la fig. 5.8, se encontró que la acumulación de PHA se ve favorecida a bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Sin embargo, concentraciones de oxígeno extremadamente bajas pueden ser limitantes para la producción del polímero. Asimismo, a nivel industrial, el obtener una mayor producción de PHA usando un flujo de aireación bajo tiene dos ventajas: los costos de aireación se reducen y se incrementa el poder reductor del medio de cultivo, lo cual promueve la síntesis de PHA.

### 5.1.5. Influencia de la concentración de AGVs en los pulsos de alimentación

Como se ha reportado ampliamente en la literatura, el cultivo en lote alimentado es la mejor estrategia para evitar la inhibición por sustrato y alcanzar altas fracciones de PHA dentro de las células tanto en cultivos puros (Khana and Srivastava, 2006), como en cultivos mixtos (Westerberg, 2007; Serafim *et al.*, 2004; Gurieff, 2007).

Para estudiar el efecto de la concentración de ácidos grasos volátiles en la acumulación de PHA por cultivos mixtos, se realizaron 4 diferentes experimentos a 3.0 mgO<sub>2</sub>/L de OD de referencia, adicionando pulsos de diferentes concentraciones (33, 100, 500 y 1000 mgDQO/L). En este estudio

se observó que existe una fuerte dependencia de la concentración de AGV sobre la fracción final de PHA ( $f_P^{\max}$ ).

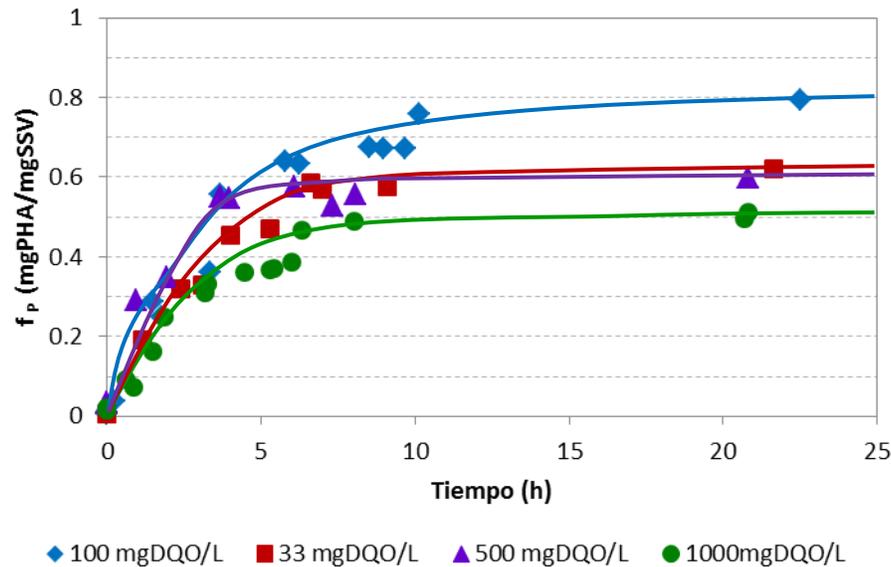


Figura 5. 9 Acumulación de PHA a diferentes concentraciones de ácidos grasos volátiles

En la fig. 5.9, se muestra que la fracción final de PHA es dependiente de la concentración de sustrato en los pulsos de alimentación. Se encontró que la concentración de AGV en la cual se obtiene la mayor fracción final de PHA es 100 mgDQO/L ( $f_P^{\max} = 0.79$ ) y la concentración a la cual se obtiene menor fracción es 1000 mgDQO/L ( $f_P^{\max} = 0.50$ ). A pesar de que a 500 y 1000 mgDQO/L, la tasa de consumo de AGV ( $q_S$ ) es mayor que a 100 mgDQO/L, el aumentar la concentración de sustrato en estas dos condiciones resultó en una menor fracción final de PHA. Probablemente la causa en el decremento en la tasa de almacenamiento de PHA es la inhibición por sustrato (Serafim *et al.*, 2004). Por otro lado, a 33 mgDQO/L, se obtiene una fracción menor debido a la disminución de  $q_S$  por la baja concentración de sustrato. Los resultados sugieren que la tasa de síntesis de PHA en cultivos mixtos sigue un comportamiento de tipo Haldane con respecto a la concentración de AGV, lo que indica que existe una concentración de AGV óptima que evita la inhibición o limitación de sustrato.

A lo largo de los experimentos de acumulación de PHA, se observó que existe una disminución en la tasa de consumo de fuente de carbono ( $q_S$ ) conforme aumenta la fracción de PHA intracelular ( $f_P$ ). Este fenómeno se puede deber a la disminución en la tasa de respiración, lo que se refleja

en la disminución del flujo de aire necesario para el consumo de un pulso de sustrato conforme las células se saturan de PHA. En las diferentes condiciones experimentales fue posible observar que después de aproximadamente 10 horas de cultivo, la fracción intracelular de PHA  $f_p$ , se aproxima a la fracción máxima  $f_p^{\max}$ , la cual se alcanza a las 22 horas del cultivo en lote. Esto indica que existe una fracción de PHA  $f_p^*$ , en la cual la tasa de acumulación de PHA empieza a ser más lenta, es decir, se presenta inhibición por producto. Se observó que el valor del parámetro  $f_p^*$  es aproximadamente igual en todas las condiciones de operación ( $f_p^* \approx 0.55$ ). Cabe mencionar que la fracción de PHA obtenida final del cultivo ( $f_p^{\max}$ ) varía según las condiciones de operación.

#### 5.1.6. Influencia de la concentración inicial de nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente muy importante en el tratamiento de aguas residuales, el cual es utilizado para mantenimiento celular y para la síntesis de componentes celulares (por ejemplo: proteínas, DNA y RNA) para la generación de biomasa activa.

En este bloque de experimentos se probaron tres diferentes condiciones de nitrógeno: con presencia (20 mgN/L y 40 mgN/L) y con ausencia de amonio, con el fin de estudiar el efecto de este nutriente en la tasa de crecimiento y la síntesis de PHA. La tasa específica de crecimiento responde a la relación C/N. En estos experimentos, esta relación cambió a lo largo del cultivo, pues el nitrógeno se alimentó sólo al principio de la reacción y se va consumiendo a lo largo de ésta. En cambio, la fuente de carbono siempre se encuentra disponible, pues cuando ésta se agota, se alimenta un nuevo pulso de sustrato.

En la figura 5.10, se observa el consumo de nitrógeno durante la producción de PHA. Ambos cultivos se operaron con un oxígeno de referencia de 3.0 mg/L y pulsos de AGV de 100 mgDQO/L. Como se puede observar, la fuente de nitrógeno es consumida rápidamente y ésta se agota aproximadamente después de 2.5 horas de haber iniciado el cultivo.

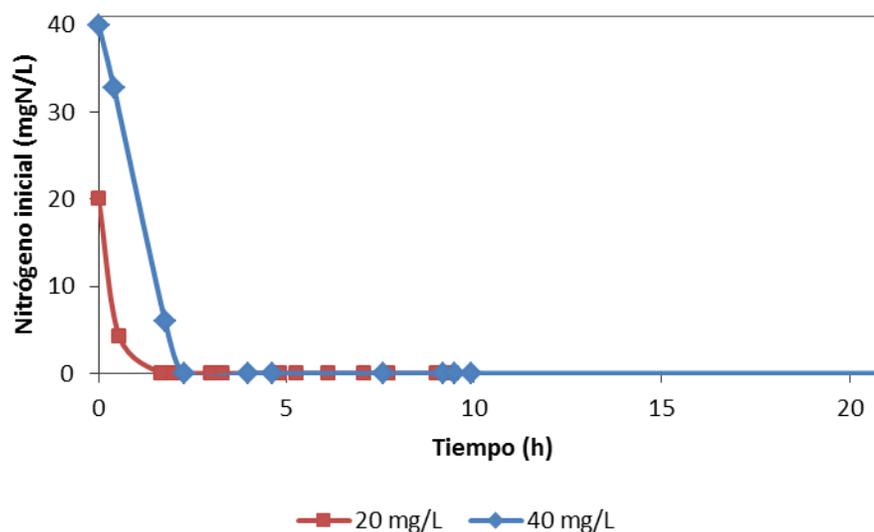


Figura 5. 10 Consumo de nitrógeno ( $\text{NH}_3$ ) durante las cinéticas de acumulación de PHA a 3.0 mg/L de OD y pulsos de AGV de 100 mgDQO/L (Experimentos 1 y 5, tabla 5.4) usando diferentes concentraciones de nitrógeno inicial

En trabajos anteriores se ha estudiado el efecto de este nutriente durante la acumulación de PHA. Por un lado, se ha obtenido una mayor acumulación de PHA bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Serafim *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010a; Third *et al.*, 2003). En presencia de amonio (en exceso), la fracción de PHA disminuye después de cierto tiempo. Aparentemente esto no ocurre por la degradación de PHA, pero sí por la disminución en la velocidad de producción de PHA y por el continuo crecimiento celular. La fracción de PHA se diluye por la nueva biomasa activa sintetizada.

A diferencia de los trabajos previos, en el presente trabajo se observó que la presencia o ausencia de nitrógeno no tiene un efecto aparente en la acumulación de PHA en cultivos mixtos abiertos (fig. 5.11). Por otro lado, en este trabajo no se observó un incremento significativo en la biomasa activa por lo que se asume que el nitrógeno consumido es utilizado para mantenimiento celular y para el recambio de componentes celulares. Durante la aclimatación de la biomasa en el reactor SBR existen condiciones de aporte de sustrato en donde existen largos periodos de inanición que provocan una disminución de componentes celulares necesarios para la multiplicación celular tales como DNA, RNA y proteínas (Dias *et al.*, 2006). Cuando la biomasa aclimatada se pasa al reactor de producción, no hay limitación de sustrato externo; sin embargo, el crecimiento celular es limitado debido a factores internos (falta de componentes celulares para el crecimiento, ver sección 5.1.4). De esta manera, los microorganismos utilizan el sustrato externo en exceso, en mayor proporción, para la acumulación de reservas intracelulares en forma de PHA.

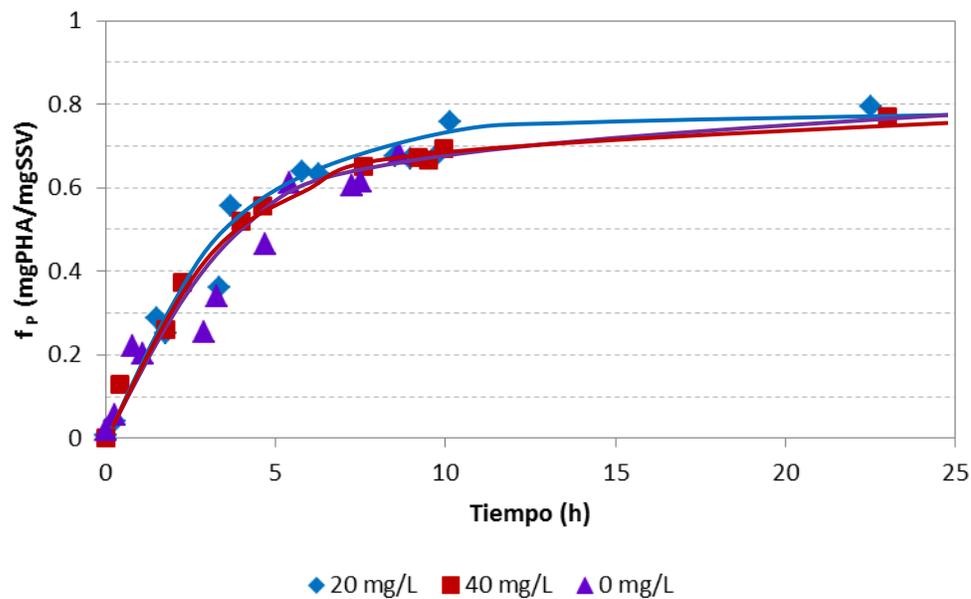


Figura 5. 11 Influencia del nitrógeno en la acumulación de PHA

En los trabajos anteriormente mencionados, la disminución en la producción de PHA causada por la presencia de nitrógeno depende del tiempo que el amonio está presente en el medio (Johnson *et al.*, 2010a y b). Sin embargo, en este trabajo, el amonio se alimentó sólo al principio de la cinética y éste se agota rápidamente. En el futuro sería interesante la realización de experimentos para verificar el efecto del nitrógeno en la acumulación de PHA y la producción de biomasa activa. Para esto se podrían diseñar otros experimentos manteniendo constante la relación C:N adicionando nitrógeno en cada pulso de alimentación o alternando la alimentación de N y C.

**Tabla 5. 4** Parámetros cinéticos y estequiométricos para los experimentos con diferente concentración de ácidos grasos volátiles, amonio, y oxígeno disuelto de referencia.

Exp.	OD mgO <sub>2</sub> /L	AGV mgDQO/L (Cmmol/L)	N mgN/L (Nmmol/L)	No. Pulsos	Y <sub>P/S</sub> Cmmol/ Cmmol	q <sub>S</sub> <sup>*</sup> Cmmol/ Cmmol*h	PHA final		Composición HB:HV Cmmol:Cmmol
							f <sub>P</sub> gPHA/gSSV	f <sub>P</sub> Cmmol/Cmmol	
1	3.0	100 (2.99)	20 (1.4)	98	0.67±0.05	0.41±0.08	79±4%	2.42±0.10	45:55
2	5.5	100 (2.99)	20 (1.4)	69	0.56±0.03	0.23±0.03	52±2%	1.14±0.08	43:57
3	0.5	100 (2.99)	20 (1.4)	88	0.55±0.06	0.35±0.03	53±2%	1.15±.15	47:53
4	3.0	100 (2.99)	0 (0.0)	55	0.64 ±0.4	0.49±0.02	79±5%	1.54±0.27	53:47
5	3.0	100 (2.99)	40 (2.8)	123	0.70±0.08	0.39±0.01	78±3%	2.36±0.05	48:52
6	3.0	33 (0.99)	20 (1.4)	377	0.65±0.05	0.34±0.1	63±2%	1.87±0.15	56:44
7	3.0	500 (14.96)	20 (1.4)	29	0.46±0.06	0.51±0.02	59±1%	1.58±0.04	46:54
8	3.0	1000 (29.91)	20 (1.4)	17	0.30±0.01	0.63±0.06	50±1%	1.11±0.04	49:51

\*Los experimentos se realizaron por triplicado con una duración de 22-24 h cada uno

Nota: La columna No. de pulsos se refiere al número de pulsos necesarios para saturar a las células de PHA

### 5.1.7. Observaciones generales

En la tabla 5.4 se muestra una compilación de los parámetros medidos durante las cinéticas en el reactor de producción de PHA. Como se puede observar, en todas las condiciones experimentales probadas se obtuvieron fracciones de PHA mayores al 50% al final de cultivo, las cuales son fracciones altas para cultivos mixtos. Se demostró que la acumulación de PHA es altamente sensible a la concentración de OD de referencia y a la concentración de los pulsos de alimentación, pero es insensible a la presencia de nitrógeno (para las concentraciones probadas en este trabajo).

Se halló que las mejores condiciones de cultivo para maximizar la producción de PHA fueron las de los experimentos 1, 4 y 5, donde se usó una concentración de 3.0 mg/L de OD, y pulsos de 100 mgDQO/L. En estos casos se alcanzó rápidamente el aumento en la fracción de PHA intracelular (hasta 79%, un valor muy cercano al máximo reportado para cultivos puros). Como se muestra en la tabla 5.5, con la estrategia de alimentación en pulsos controlando la concentración de oxígeno disuelto, utilizada en este trabajo, se obtienen mayores fracciones finales de PHA. Se encontró que para la conversión eficiente de sustrato en PHA, la moderación en el suministro de OD podría ser una excelente estrategia para maximizar la acumulación de PHA. En los trabajos de Serafim *et al.* (2004) y Westerberg (2007), no era posible moderar el suministro de OD ya que se debía mantener en un nivel alto para poder apreciar los cambios de éste dentro del reactor para la alimentación adecuada de pulsos.

En el trabajo de Ramírez (2009), se usaron las mismas condiciones de acumulación que en el presente trabajo (tabla 5.4, experimento 1), pero con diferente estrategia de producción como se observa en la tabla 5.5. Esto demuestra que la nueva estrategia de alimentación de pulsos usando el flujo de aire como variable, se obtiene una mayor fracción de PHA (0.79 gPHA/gSSV) en comparación con la estrategia usual (0.64 gPHA/gSSV).

Tabla 5. 5 Contenido máximo de PHA obtenido en cultivos mixtos

Referencia	Estrategia de producción	$f_p$ (gPHA/gSSV)
Dionisi <i>et al.</i> , 2004	Lote	0.50
Serafim <i>et al.</i> , 2004	Lote alimentado en pulsos $F_a$ constante, <b>OD</b> variable	0.68
Westerberg, 2007	Lote alimentado en pulsos $F_a$ constante, <b>OD</b> variable	0.75
Ramírez, 2009	Lote alimentado en pulsos $F_a$ constante, <b>OD</b> variable	0.64
Este trabajo	Lote alimentado en pulsos $F_a$ variable, <b>OD</b> constante	0.79

Es importante resaltar que en las diferentes condiciones experimentales, se observó que el polímero obtenido tiene una mayor proporción de la subunidad HV (hidroxivalerato), lo que le conferiría mejores propiedades mecánicas. En los experimentos 4 y 6 se obtiene una fracción ligeramente mayor de HB (hidroxibutirato); sin embargo, no se han identificado las causas.

En el futuro sería interesante la realización de estudios para identificar cómo manipular las propiedades mecánicas del polímero a través de la variación de la fuente de carbono utilizada, la proporción de ácidos grasos volátiles y diferentes estrategias de alimentación.

## 5.2. Postulación del modelo matemático de la acumulación de PHA en cultivos mixtos

La parte medular de este trabajo de investigación contempla la propuesta de un modelo matemático capaz de explicar el proceso de acumulación de PHA. El modelo describe los perfiles de consumo de AGVs, la acumulación de PHA, la producción de biomasa residual y se puede agregar el consumo de nitrógeno durante la operación del reactor de producción.

Para tal efecto, se construyó un modelo matemático mecanístico con algunas componentes empíricas. Este modelo se construyó a través de la conjunción de algunos modelos teóricos establecidos y otros componentes empíricos arrojados por la observación experimental. Se analizó y evaluó su respuesta frente a valores experimentales y se llegó a la conclusión que es un modelo que representa adecuadamente el proceso y que es apto para ser usado en futuros trabajos de optimización basados en modelo.

Los polihidroxialcanoatos son metabolitos que son producidos comúnmente en cultivos en lote alimentado. Este tipo de cultivos poseen la ventaja de obtener altas productividades en procesos microbiológicos, con lo cual se reducen los costos en gran medida. Normalmente sólo se alimenta el sustrato clave, mientras que los demás nutrientes son alimentados sólo una vez al principio del cultivo, y su concentración decrece subsecuentemente durante el proceso. Además del muestreo, no hay más material que salga del sistema, lo que hace difícil simular cultivos en lote alimentado.

La dinámica de un cultivo en lote, presentada en la sección 3.4.2 es difícil de aplicar en el reactor de producción alimentado automáticamente, debido a la complejidad que representa la integración de un conjunto de ecuaciones diferenciales en cada uno de los pequeños pulsos de alimentación. Cada uno de estos pulsos representa un cultivo en lote durante el proceso de

acumulación de PHA. Por ejemplo, cuando se alimentan pulsos de 33 mgDQO/L, se llegan a alimentar más de 300 pulsos para saturar las células de PHA.

Los modelos híbridos constan de un marco dinámico físico aumentado con sub-modelos empíricos que se derivan de los datos del proceso. De esta manera, es posible combinar el conocimiento previo y la información a partir de mediciones de una manera óptima. Estos modelos tienen buenas propiedades dinámicas y son adecuados para fines de optimización en un intervalo de operación determinado por el intervalo de las mediciones. La parte dinámica consiste en los balances de masa, de los componentes y de energía. En este contexto, los modelos híbridos tienen un comportamiento dinámico que corresponde bien con el proceso original, y su desempeño supera al de otro tipo de modelos. Además su ajuste con los datos del proceso asegura un buen comportamiento estático y el comportamiento dinámico se corrige con las suposiciones y simplificaciones en el modelo.

A continuación se postula el modelo matemático de la acumulación de polihidroxialcanoatos en cultivos mixtos a partir de aguas residuales. Primero se describe un esquema simplificado del modelo metabólico, después las expresiones dinámicas que explican las condiciones de un cultivo alimentado en pulsos, posteriormente las expresiones cinéticas de la acumulación de PHA en un cultivo en lote y por último un análisis del modelo obtenido.

### 5.2.1. Modelo metabólico

El modelo metabólico usado para la producción de PHA a partir de acetato como sustrato consta de siete reacciones (fig. 5.12) propuestas para un cultivo puro de *Paracoccus pantotrophus* por Van Aalst-van Leeuwen *et al.* (1997). Posteriormente fueron aplicadas por Beun *et al.* (2002) y Dias *et al.* (2005) para la producción de PHA por cultivos mixtos con muy buenos resultados. Estas reacciones están descritas en el apartado 3.3.4. El modelo describe el metabolismo de biomasa capaz de almacenar PHA, de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno y de usar acetato (en condiciones de abundancia) o PHA (solo durante condiciones de ayuno) como fuente de carbono y/o energía. Sin embargo, el modelo puede ser simplificado. Asumiendo que no existe acumulación neta de precursores de biomasa, las reacciones 2 y 3 se pueden combinar. De acuerdo a los resultados experimentales arrojados en este trabajo, bajo condiciones de exceso de fuente de carbono no hay crecimiento aparente de biomasa ni degradación neta de PHA. Por tanto, las reacciones 2, 3 y 7 se pueden omitir para el caso del reactor en lote alimentado en pulsos, donde los AGV siempre están presentes en exceso.

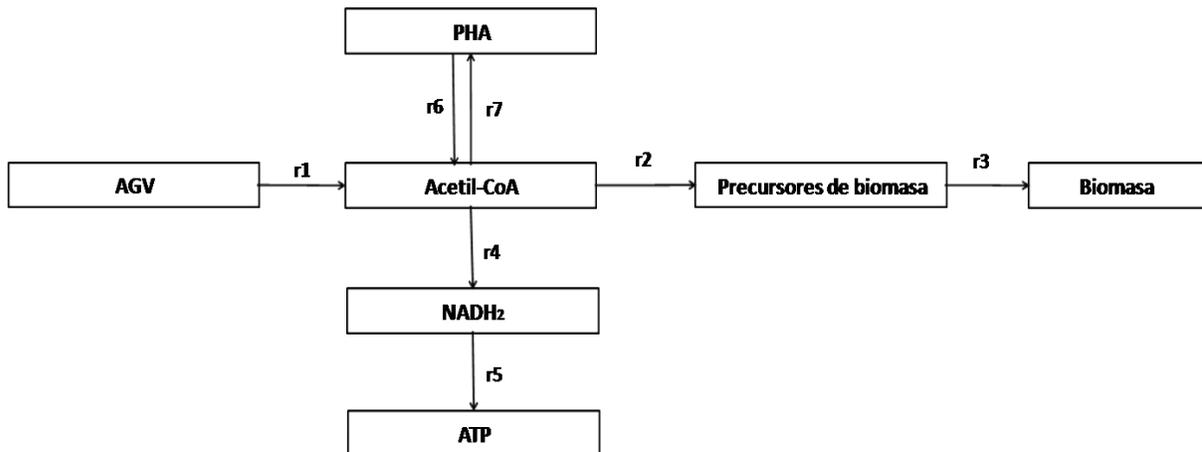


Figura 5. 12 Las siete reacciones metabólicas modelo para el almacenamiento, crecimiento y energía a partir de ácidos grasos volátiles

### 5.2.2. Ecuaciones de balance de masa en un cultivo en lote alimentado para la producción de PHA

A continuación se presentan los balances de materia para la acumulación de PHA a partir de cultivos mixtos en un reactor operado en lote alimentado.

Los balances de materia en el reactor en lote suponen un mezclado perfecto. El modelo es estructurado, ya que la biomasa total  $B$  se estructura en dos componentes:

- La biomasa activa catalíticamente  $X$ , es decir, proteínas, ácidos nucleicos, etc.
- La fracción inerte de las células  $P$  es el producto, es decir, los PHA intracelulares.

$$B = X + P \quad \text{Ecuación 1}$$

El modelo propuesto en este trabajo simula la dinámica de alimentación del reactor de producción de PHA. A lo largo del cultivo, el programa de alimentación automática suministra al reactor los pulsos de ácidos grasos necesarios para saturar a las células de PHA. El número de pulsos depende de la concentración inicial del pulso y de la tasa de síntesis de PHA. De esta manera, el proceso global de acumulación de PHA puede ser modelado como la suma de varios cultivos en lote, donde las condiciones finales al pulso  $i$ , son las condiciones iniciales del pulso  $i + 1$ .

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad X(0) = X_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X \quad S(0) = S_0 \quad q_s = q_p + q_x + q_m \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} q_p \quad P(0) = P_0 \quad \text{Ecuación 4}$$

Los balances anteriores se simplificaron de acuerdo a las condiciones del reactor de producción de PHA. Se consideró que no existe cambio en la biomasa residual con respecto al tiempo, ya que durante la acumulación de PHA se observó que existe muy poca producción de biomasa residual. En condiciones de exceso de fuente de carbono, el proceso de crecimiento de biomasa es despreciable frente al de almacenamiento de PHA. De esta manera, suponiendo que no hay crecimiento de biomasa activa ( $X(t) = X_0$ ), se consideran únicamente dos elementos: la dinámica de formación de PHA ( $P$ ) y la desaparición de fuente de carbono externa ( $S$ ). Por tanto, el consumo de fuente de carbono ( $S$ ) se debe a la formación de PHA ( $P$ ) y al mantenimiento celular ( $m$ ), el cual es proporcional a  $X$ .

### 5.2.3. Expresiones cinéticas

A continuación se presentan las expresiones cinéticas del modelo general de acumulación de PHA presentado en la sección anterior, modificado de acuerdo a los resultados experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo. Estas expresiones son semi-empíricas, ya que consideran el efecto de distintas condiciones de operación, dadas por:

- a. La concentración de oxígeno disuelto que se mantiene constante a lo largo de la acumulación de PHA
- b. La concentración inicial de fuente de carbono en cada pulso de alimentación
- c. La concentración inicial de nitrógeno en cada experimento de alimentación por pulsos

Las observaciones experimentales que el modelo hallado debe reproducir son:

1. En ningún experimento hay crecimiento significativo de biomasa residual.

2. El nitrógeno inicial no parece tener un efecto significativo, ni en la producción de PHA, ni en el crecimiento de biomasa (esto último dado que tampoco hay crecimiento de biomasa residual).
3. Cuando se sobrepasa cierta fracción intracelular de PHA,  $f_p$ , la tasa de acumulación de PHA,  $q_p$ , disminuye.
4. La concentración de oxígeno disuelto (OD) que se mantiene en el reactor durante el experimento (usando un controlador PID para regularlo) modifica tanto  $Y_{S/p}$  como  $f_p$ . Existe un valor óptimo en el que estos dos parámetros se maximizan.
5. La concentración inicial de sustrato,  $S_0$ , también modifica el valor aparente de  $f_p$ ; existe un valor óptimo de  $S_0$ ; sin embargo a altas concentraciones de  $S$ ,  $f_p$  disminuye.

Estas observaciones pueden ser modeladas si se considera lo siguiente:

1. La tasa de crecimiento de biomasa residual es cero. Entonces su concentración permanece constante en el valor  $X_0$ .
2. No existe limitación de sustrato externo  $S$ .
3. En las tasas de producción de PHA y de consumo de sustrato la concentración de nitrógeno no interviene, ni siquiera como factor limitante.
4. El efecto del OD se puede modelar con dos posibilidades:
  - a) Directamente, los coeficientes de rendimiento y la fracción máxima alcanzable de PHA dependen del OD
  - b) Indirectamente, considerando que el destino del sustrato en el medio depende del OD, ya sea favoreciendo en mayor o menor medida el consumo de sustrato para producción de PHA, o bien para otros propósitos como el mantenimiento celular.
5. El efecto de  $S_0$  admite los dos tipos de modelado anterior, pero sería preferible considerar la segunda opción. Cuando hay un exceso de sustrato externo, se prefiere una vía

metabólica que lo mineraliza (sin crecimiento significativo) en vez de usarlo para producción de PHA.

Lo anterior implica que habrá sólo dos reacciones:

1. Consumo de sustrato para producción de PHA, dado por  $q_p$ ;
2. Consumo de sustrato para mantenimiento o mineralización, dado por  $q_m$ .

Durante la acumulación de PHA, los ácidos grasos volátiles son consumidos rápidamente en el medio de cultivo. Los experimentos realizados mostraron que su consumo sigue una cinética de orden cero cuando  $S$  está disponible en exceso. Además se comprobó también experimentalmente que la tasa de consumo es insensible a la concentración de amonio. Sin embargo, se considera que la tasa de consumo de sustrato sólo está limitada por el sustrato mismo y por el oxígeno disuelto, tal que está dada por:

$$q_s = q_s^* \underbrace{\left( \frac{S}{k_s + S} \right)}_{\mu(S; k_s)} \underbrace{\left( \frac{O}{k_o + O} \right)}_{\mu(O; k_o)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Esta tasa está formada en realidad por la suma de tres tasas: (1), la de producción de PHA; (2) la de generación de biomasa; y (3), la de mantenimiento:

$$q_s = q_p + q_x + q_m \quad \text{Ecuación 6}$$

Sin embargo, para las condiciones específicas de la acumulación de PHA a partir de cultivos mixtos, se ha observado que la tasa de crecimiento de biomasa  $q_x$  es muy pequeña en comparación con la tasa de consumo de sustrato para acumulación de PHA  $q_p$  (Serafim *et al.*, 2005, Dionisi *et al.*, 2004). A diferencia del trabajo citado anteriormente, la forma de operación convencional del reactor es en lote, lo que provoca que en cierto momento de la fermentación exista limitación de sustrato  $S$ . En este caso el sustrato está siempre disponible y no se detectó crecimiento de biomasa residual, por lo que la tasa de consumo de fuente de carbono global, se puede limitar a dos tasas:

$$q_S = q_P + q_m = q_S^* \left( \frac{S}{k_S + S} \right) \left( \frac{O}{k_O + O} \right) (r_P + r_m) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$r_P + r_m = 1, \quad \text{Ecuación 8}$$

$$0 \leq r_P \leq 1 \quad \text{Ecuación 9}$$

Los términos  $r_P$  y  $r_m$  representan las fracciones de la tasa de consumo de sustrato que se destinan a producción de PHA o a mantenimiento celular, respectivamente. En este trabajo, se ha encontrado que la tasa de formación de PHA es insensible a la presencia o ausencia de fuente de nitrógeno, mientras que la concentración de  $S$  sí es limitante. Como se discutió en la sección de la caracterización experimental del sistema de producción de PHA, el oxígeno disuelto es un factor muy importante en la fracción máxima de PHA que se puede alcanzar en un cultivo mixto.

$$q_P = q_S^* \left( \frac{S}{k_S + S} \right) \left( \frac{O}{k_O + O} \right) r_P \quad \text{Ecuación 10}$$

Una concentración baja de  $S$  es limitante en la formación de PHA, pero como se ha demostrado en la parte experimental de esta investigación, así como en lo reportado por Serafim *et al.* (2004), una alta concentración de ácidos grasos volátiles ( $S$ ), puede llegar a ser inhibitoria para el sistema microbiano, y por tanto disminuye la tasa de consumo de  $S$ , así como la tasa de producción de PHA. Es importante resaltar que no hay trabajos relacionados con el modelado del almacenamiento en cultivos mixtos que consideren la inhibición por  $S$ .

Por otro lado, el aumento de la fracción intracelular de PHA inhibe su propia tasa de producción. Por ejemplo, en este estudio se obtuvo una fracción máxima de PHA del 80% en peso seco celular. De esta manera, la fracción de la tasa consumo de sustrato destinada específicamente a la formación de PHA se puede modelar de la siguiente manera:

$$r_P = \underbrace{\left( \frac{1}{1 + (S/k_I)^{\alpha_I}} \right)}_{i(S; k_I; \alpha_I)} \underbrace{\left( \frac{1}{1 + (O/k_C)^{\alpha_C}} \right)}_{i(O; k_C; \alpha_C)} \underbrace{\left( \frac{1}{1 + \left[ \left( \frac{f_P (1 - f_P^*)}{f_P^* (1 - f_P)} \right)^2 \right]^{\alpha_P}} \right)}_{v(f_P; f_P^*; \alpha_P)} \quad \text{Ecuación 11}$$

- El primer término,  $i(S)$ , es un término de inhibición debido al sustrato; si el valor de  $S$  es menor al parámetro  $k_I$ , este término toma un valor cercano a 1, si  $S > k_I$ , entonces tiende a cero, siendo igual a 0.5 cuando  $S = k_I$ . El parámetro  $\alpha_I$  permite ajustar qué tan abrupto es el cambio alrededor de  $S = k_I$ .
- El segundo término representa el hecho de que conforme aumenta la concentración de oxígeno disuelto, se inhibe la producción de PHA;  $k_C$  corresponde al valor de OD con el cual se inhibe a la mitad.
- El tercer factor  $v(f_p)$ , representa la inhibición debida a la acumulación de PHA. Esta función es igual a 1 si (no hay inhibición) y es cero si  $f_p = 1$  (total inhibición). Cuando  $f_p = f_p^*$  el factor toma el valor de 0.5; es decir, la inhibición es tal que la tasa de acumulación de PHA se reduce a la mitad. El parámetro  $\alpha_p \geq 1$  sirve para ajustar qué tan radical es la inhibición (con  $\alpha_p$  muy grande, prácticamente no hay inhibición si  $f_p < f_p^*$  y hay total inhibición si  $f_p > f_p^*$ ). Un valor de  $\alpha_p = 1$  sería recomendable.

Entonces la tasa de consumo de sustrato para producción de PHA está dada por:

$$q_P = q_S^* \underbrace{\mu(S) \cdot i(S)}_{h(S; k_S; k_I)} \cdot \underbrace{\mu(O) \cdot i(O)}_{h(O; k_O; k_C)} \cdot v(f_p) \quad \text{Ecuación 12}$$

Los productos  $\mu(S) \cdot i(S)$  y  $\mu(O) \cdot i(O)$  pueden aproximarse por funciones de tipo Haldane (cuando  $\alpha_I$  o  $\alpha_C$  son unitarias, la aproximación es exacta). Así los términos  $h(S)$  y  $h(O)$  se pueden modelar con base en dos parámetros:  $\beta_S$  y  $S^*$ , o  $\beta_O$  y  $O^*$ , respectivamente. En ambos casos se considera que el máximo de estas funciones es 1 y ocurre cuando  $S = S^*$  ó  $O = O^*$ . Los parámetros  $\beta_S$  y  $\beta_O$  definen la forma de la curva.

$$h(S) = \frac{SS^*}{SS^* + \beta_S (S - S^*)^2}, \quad \beta_S = \frac{S^*}{\gamma k_I + 2S^*} = \frac{1}{1 + \gamma \sqrt{\frac{k_I}{k_S}}} \quad \text{Ecuación 13}$$

En la figura 5.13 se muestra el efecto de los dos parámetros ( $O^*$  y  $\beta_O$ ) para  $h(O)$ .

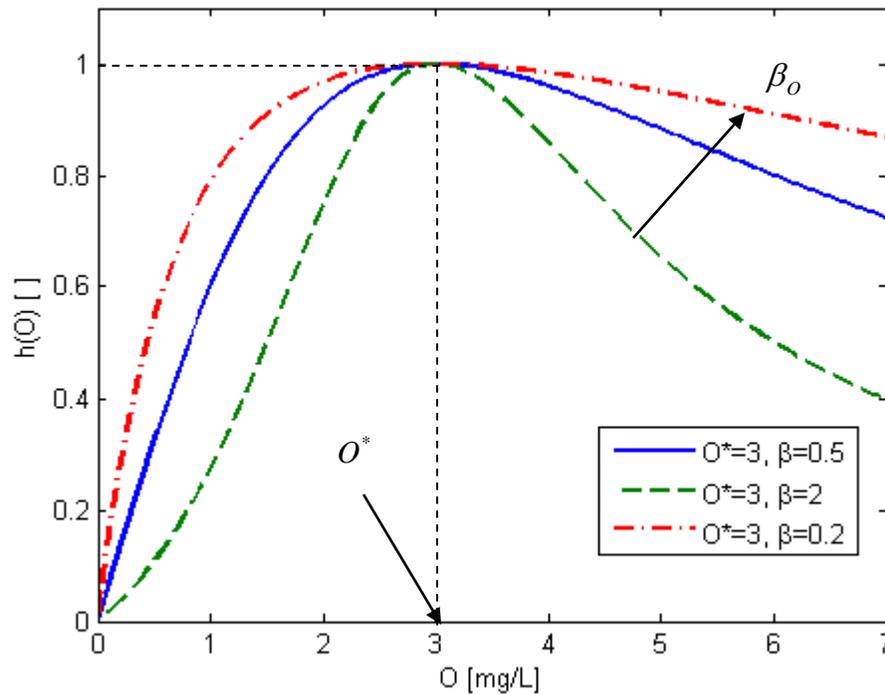


Figura 5. 13 Representación gráfica de los parámetros de la Ley de Haldane para la función  $h(O)$

Entonces es posible modelar la tasa de consumo de sustrato para producción de PHA por:

$$q_P = q_S^* \underbrace{\left( \frac{S}{S + \beta_S (S - S^*)^2} \right)}_{h(S; S^*; \beta_S)} \underbrace{\left( \frac{O}{O + \beta_O (O - O^*)^2} \right)}_{h(O; O^*; \beta_O)} \underbrace{\left( \frac{1}{1 + \left[ \left( \frac{f_P (1 - f_P^*)}{f_P^* (1 - f_P)} \right)^2 \right]^{\alpha_P}} \right)}_{v(f_P; f_P^*; \alpha_P)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Lo anterior implica que  $r_P = h(S) \cdot h(O) \cdot v(f_P)$  y que la ecuación que define la acumulación de PHA está dada por:

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot h(S; S^*, \beta_S) \cdot h(O; O^*, \beta_O) \cdot v(f_P) \quad \text{Ecuación 15}$$

con

Ecuación 16

$$q_P = Y_{P/S} \cdot q_S^*$$

En este trabajo se consideró que siempre existe consumo de sustrato basal usado para funciones de mantenimiento celular, aunque se presente inhibición en la producción de PHA debido a la concentración de  $S$ , a la concentración de  $O$ , o debido a la fracción de PHA. En el planteamiento original del modelo, se había considerado que la tasa global de consumo de sustrato no se veía afectada por la inhibición debida a la acumulación de PHA; es decir, debida a valores altos de  $f_P$ . Sin embargo, las observaciones experimentales mostraron que si bien el sustrato siempre fue consumido, conforme aumenta el valor de  $f_P$ , y por tanto se acerca cero el valor del factor  $v(f_P)$  la tasa de consumo de sustrato sí disminuía. De esta manera se consideró en el modelo que el valor de  $q_S$  alcanza un valor mínimo,  $q_S^{\min}$ , que puede ser estimado a través de la simulación del modelo y su comparación con datos experimentales.

Por tanto se consideró que en la expresión de la ecuación 14, la tasa de consumo máxima de sustrato,  $q_S^*$ , no es constante, sino que se ve afectada por el factor  $v(f_P)$ . Cuando  $v(f_P) = 0$  (es decir, cuando no hay inhibición por acumulación de PHA:  $f_P = 0$ ), entonces el valor máximo es justamente  $q_S^*$ , pero cuando  $v(f_P)$  tiende a cero porque  $f_P > f_P^*$ , entonces disminuye al valor mínimo. Esto se puede representar con el siguiente modelo:

$$q_P = -\left(q_S^{\min} + (q_S^* - q_S^{\min})v(f_P)\right) \left(\frac{S}{k_S + S}\right) \left(\frac{O}{k_O + O}\right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Con esta modificación al modelo resulta claro que siempre  $q_S > q_P$ . El sustrato que se consume, pero no para producción de PHA, se considera que se emplea para procesos de mantenimiento celular, de tal manera que para completar el balance de masas, se considera que existe una tasa de consumo para mantenimiento celular dada por:

Ecuación 18

$$\frac{dS_m}{dt} = q_S - q_P$$

La constante de saturación media  $k_s$  se asume la misma en las ecuaciones cinéticas, ya que el consumo de acetato y su posterior transformación a AcCoA son comunes para el crecimiento celular, la formación de PHA y los procesos de mantenimiento.

En el presente modelo, no se consideró inhibición debida a nitrógeno y fosfato. En los datos experimentales se observó que el nitrógeno no tiene una influencia importante en el crecimiento de biomasa ni en la producción de PHA. Se considera que el nitrógeno es consumido únicamente para funciones de mantenimiento celular. Además se encontró que durante la fermentación no se consume gran cantidad de fosfatos, por lo que agregar un término por inhibición de fosfato implicaría complicar innecesariamente la estructura de este modelo.

#### 5.2.4. Sensibilidad de parámetros

Antes y durante el proceso de optimización de parámetros se halló que existían algunos parámetros que al modificarlos no tenían gran influencia en las predicciones del modelo. En contraste, se encontró que pequeñas variaciones en ciertos parámetros tenían una gran influencia en las predicciones del modelo. Antes de la calibración del modelo, se realizaron pruebas con el modelo con el fin de evaluar los parámetros más importantes. La determinación de los cambios que pueden sufrir los parámetros en el proceso de calibración es dependiente de la sensibilidad de esos parámetros a las predicciones dadas por el modelo. Para que un parámetro pueda ser realmente identificado, los datos medidos deben de ser altamente sensibles a los cambios en este parámetro. Una baja sensibilidad de los parámetros indica que es difícil asignar un valor único al parámetro dado.

Según las pruebas experimentales, se encontró que los parámetros más sensibles son el rendimiento de PHA con respecto a los AGV ( $Y_{P/S}$ ) y la fracción de PHA intracelular a partir de la cual se produce inhibición por producto ( $f_p^*$ ). Estos resultados sugieren que la identificación apropiada de la formación de PHA a partir de AGV dado por las ecuaciones 14 y 16 es crucial para la precisión del modelo. En cambio, los parámetros involucrados en la inhibición por sustrato en la producción de PHA ( $\beta_s$  y  $S^*$ ), así como la tasa máxima de consumo de sustrato  $q_s^*$  mostraron tener una sensibilidad media. Por otra parte, los parámetros menos sensibles son algunos involucrados en la tasa de consumo de AGV  $q_s^{min}$  y  $k_s$ , lo cual no es sorprendente ya que, por ejemplo,  $q_s^{min}$  está muy relacionada con el consumo de sustrato para el mantenimiento celular, y la cantidad de AGV destinada a este proceso es sólo una pequeña fracción con respecto a la

cantidad destinada al almacenamiento de PHA. Estas observaciones proveen información muy útil en las subsecuentes calibraciones del modelo.

### 5.2.5. Simulación y estimación de parámetros cinéticos y de rendimiento

Para llevar a cabo la optimización de parámetros y la validación del modelo propuesto, se desarrolló un programa de simulación en MATLAB™ (Ver. 7.5.0, 2007). El sistema de ecuaciones diferenciales se resolvió usando un programa de integración en un modulo de Simulink para minimizar las desviaciones entre las predicciones dadas por el modelo y los resultados de los cultivos en lote alimentado en pulsos. El criterio de minimización usado fue el siguiente:

$$SECR = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m \Delta_{ij}^2$$

Donde SECR representa la Suma del Error Cuadrático de los Residuos;  $i$  y  $j$  representan el número de datos experimentales y el número de variables, respectivamente;  $m$  y  $n$  son el número total de variables y el número total de datos experimentales, respectivamente; y  $\Delta_{ij}$  es la diferencia entre el modelo y el dato experimental ( $y_{\text{modelo}} - y_{\text{expt}}$ ).

El proceso de calibración del modelo es un procedimiento en el cual se ajustan los valores de los coeficientes del modelo para lograr que los resultados producidos por el modelo ajusten con el conjunto de datos medidos. Con base en los resultados del análisis de sensibilidad, los parámetros  $q_S^{\text{mín}}$  y  $k_S$ , fueron establecidos como predeterminados debido a su baja sensibilidad. Para iniciar el procedimiento de calibración, fue necesario realizar una estimación inicial de los parámetros involucrados. Estos valores iniciales fueron obtenidos sobre la base de los resultados experimentales obtenidos ( $q_S^*$ ,  $Y_{P/S}$ ) y de los reportados en la literatura ( $k_S$ ,  $S^*$ ).

Para simplificar el proceso de calibración del modelo, la estrategia fue cambiar el menor número de constantes posible a la vez debido a la variabilidad limitada de algunos parámetros. El algoritmo para la optimización de parámetros que se siguió fue el siguiente:

- a. Obtención de datos experimentales del archivo muestra;
- b. Asignación de valores iniciales a los parámetros del modelo;
- c. Simulación del proceso con el programa;

- d. Análisis de las gráficas y comparación de los valores obtenidos por el modelo con los reales;
- e. Comprobar si el error cuadrático entre los datos estimados y los datos experimentales cumplen con el criterio minimización;
- f. Asignación de nuevos valores a los parámetros en caso de no lograr el ajuste.

A través del simulador, se obtiene de manera rápida y automática una gráfica comparativa de los valores experimentales y de los calculados por el modelo. En las figuras 5.17-5.19, es posible visualizar claramente el ajuste entre las predicciones dadas por el modelo (líneas) con respecto a los valores reales (puntos). A través de esta visualización, es posible hacer cambios en la estructura del modelo y/o de los parámetros del mismo durante el proceso de construcción del modelo matemático.

En la figura 5.14 se observa el simulador utilizado en la determinación de los parámetros cinéticos y de rendimiento. En las figuras 5.15 y 5.16, se muestran los módulos correspondientes a las expresiones dinámicas y cinéticas respectivamente, que describen la acumulación de PHA.

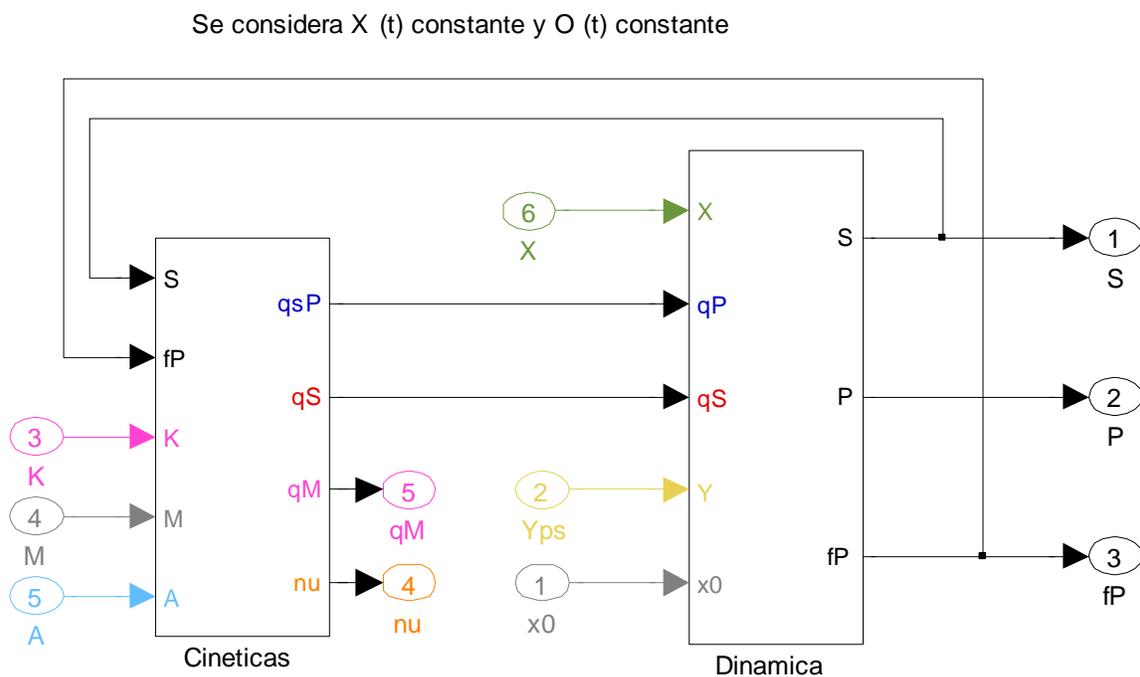


Figura 5. 14 Simulador del proceso de acumulación de PHA a partir de cultivos mixtos Matlab™ (Ver. 7.5.0, 2007)

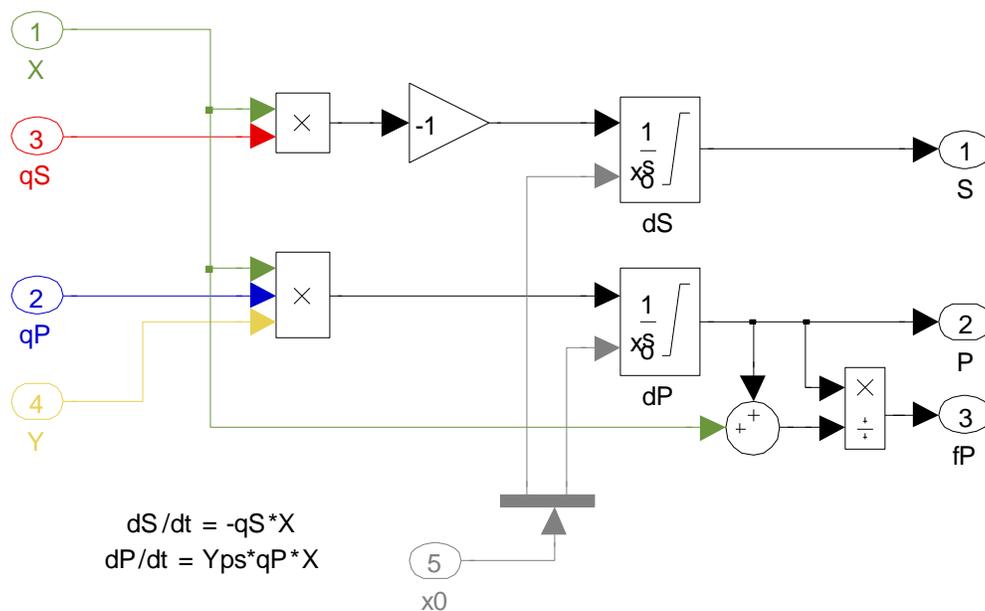


Figura 5. 15 Módulo de la dinámica de acumulación de PHA

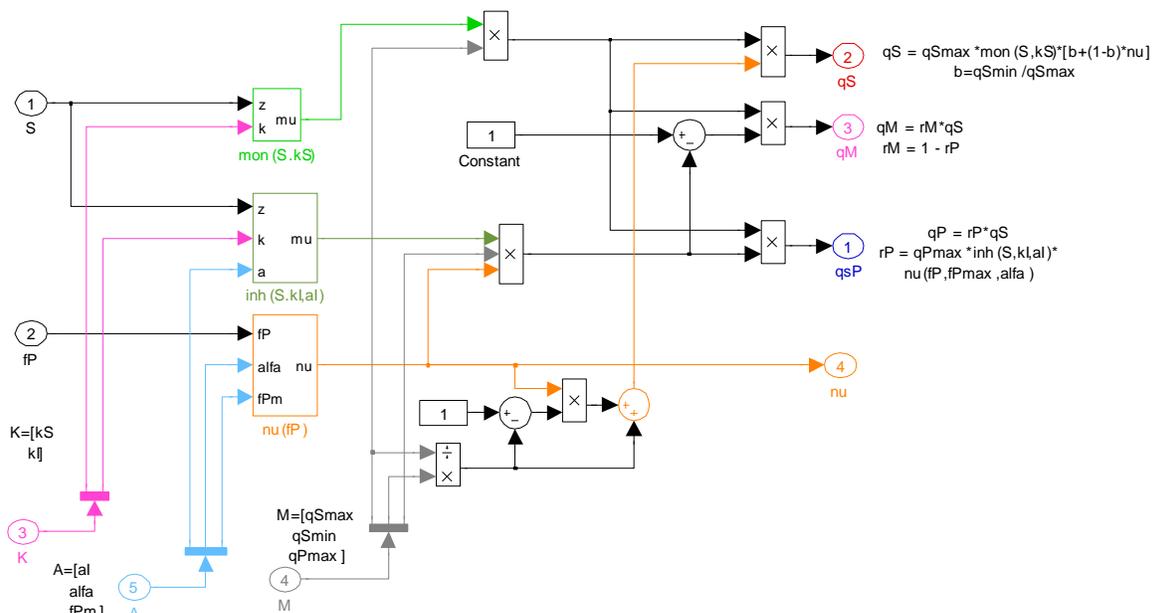


Figura 5. 16 Módulo de la cinética de acumulación de PHA

En la tabla 5.6, se muestran los valores de los parámetros optimizados. Aparentemente la fracción máxima  $f_p$  de PHA que se puede alcanzar en determinadas condiciones de operación depende del coeficiente de rendimiento, el cual depende de la concentración de oxígeno disuelto de referencia.

Tabla 5. 6 Resultados de la estimación de parámetros

Parámetro	Definición	Valor	Unidad
$q_S^*$	Tasa máxima de consumo de sustrato S	0.75	(mgAGV/mgPHA · h)
$q_S^{min}$	Tasa mínima de consumo de sustrato S	0.4	(mgAGV/mgPHA · h)
$k_S$	Constante de afinidad de la biomasa por S	0.05	(mgAGV/L)
$Y_{P/S}$	Coeficiente de rendimiento de almacenamiento de PHA respecto a S	0.55 (3.0 mgO <sub>2</sub> /L) 0.50 (0.5 y 5.5 mgO <sub>2</sub> /L)	(mgPHA/mgAGV)
$S^*$	Concentración de ácidos grasos volátiles a partir de la cual se produce inhibición por sustrato	100	(mgAGV)
$\beta_S$	Concentración de ácidos grasos en la cual la tasa de consumo de sustrato se reduce a la mitad	500	(mgAGV)
$f_P^*$	Fracción de PHA intracelular a partir de cual se produce inhibición por producto	0.55	(mgPHA/mgSSV)
$\alpha$	Constante de saturación en la producción de PHA	2.3	(adimensional)

### 1.2.6 Validación del modelo

La validación del modelo se basa en la comparación entre los resultados experimentales y las predicciones del modelo, usando los mismos parámetros del modelo. Para la verificación del modelo se usaron datos experimentales que no fueron utilizados para su calibración. En el reactor de producción, se estudiaron ocho condiciones experimentales diferentes, seis de las cuales fueron usadas para la generación del modelo matemático, mientras que los experimentos 5 y 7, descritos en la sección 4.6.2 sirvieron para validar el modelo. En la figuras 5.17 y 5.18, se muestran los resultados de las simulaciones de los experimentos 5 y 7 respectivamente.

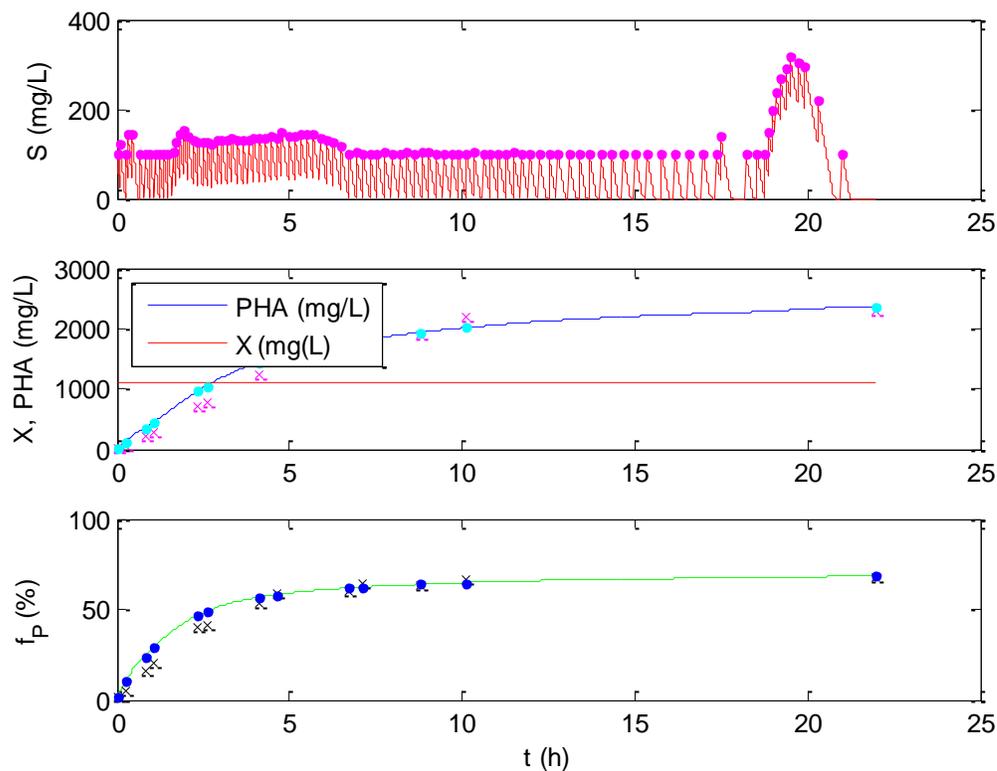


Figura 5. 17 Resultados de validación para el experimento 5. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (100 mgDQO/L, 3.0 mgO<sub>2</sub>/L y 40 mgN/L)

En las figuras 5.17 y 5.18 se exponen las cinéticas de acumulación de PHA de los experimentos 5 y 7 respectivamente. El primer cuadro en ambas figuras representa el consumo de sustrato externo  $S$ , el modelo se alimenta con una matriz que contiene los tiempos en los cuales se alimentaron los pulsos de sustrato. Con esta información el modelo calcula la tasa de consumo de sustrato y a partir de ésta predice el perfil de consumo de AGV en cada uno de estos pulsos (líneas en rojo). Los puntos rosas en este mismo cuadro representan la concentración inicial de sustrato en cada pulso, cabe notar que al final de las acumulaciones la tasa de consumo de sustrato disminuye y éste se acumula en el medio de cultivo.

Los dos cuadros inferiores en las figuras 5.17 y 5.18 muestran la producción de PHA en concentración dentro del medio de cultivo (mgPHA/L) y en fracción intracelular (mgPHA/mgSSV). Las líneas (verde y azul) representan los datos predichos por el modelo, mientras que los puntos simbolizan los datos experimentales. Es posible observar que los perfiles de concentración de PHA y fracción de PHA en la biomasa coinciden con los datos experimentales, por lo que la validación del modelo fue posible.

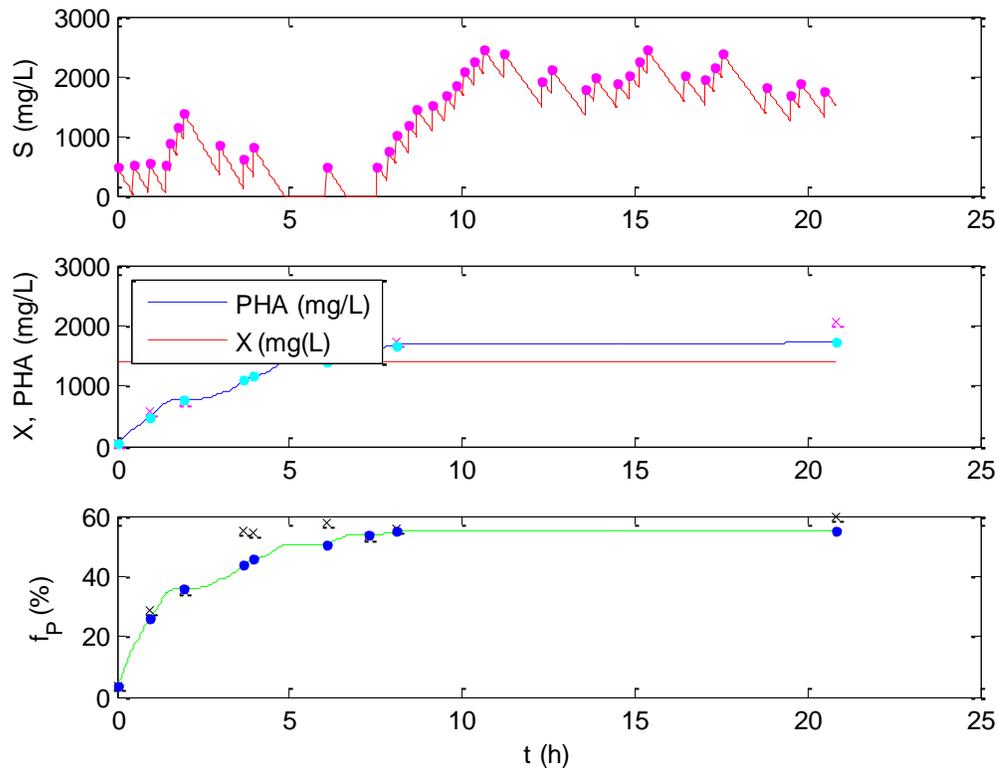


Figura 5. 18 Resultados de validación para el experimento 7. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (500 mgDQO/L, 3.0 mgO<sub>2</sub>/L y 20 mgN/L)

### 1.2.7 Análisis del desempeño del modelo

Del análisis de la respuesta obtenida del modelo mediante las simulaciones y las comparaciones con los valores experimentales reales, se pueden concluir varios puntos en relación al modelo y a sus parámetros:

El principal objetivo de este trabajo es obtener un modelo matemático simple que prediga adecuadamente el perfil de producción de PHA y consumo de fuente de carbono a partir de dos variables de entrada: la concentración de sustrato en cada pulso de alimentación y la concentración de biomasa inicial. El propósito a futuro de este modelo es la realización de estudios de optimización basados en este modelo para aumentar la producción de polímero en cultivos mixtos en lote alimentado.

Se encontró que el modelo describe adecuadamente un cultivo en lote alimentado para la producción de PHA. El modelo se alimenta únicamente de una matriz de tiempos

correspondientes al tiempo en el que se alimentaron los pulsos de alimentación, de la biomasa inicial, de la concentración del pulso de alimentación y de la concentración de oxígeno disuelto de referencia.

En otros modelos de acumulación de PHA se ha considerado un término de inhibición por acumulación de PHA. Por ejemplo en el trabajo de Dias *et al.*, (2005), se considera el siguiente término de inhibición de PHA:

$$\left[ 1 - \left( \frac{f_P}{f_P^*} \right)^\alpha \right]$$

$u(f_P; f_P^*; \alpha)$

La ventaja de éste término de inhibición con respecto a otros modelos (van Loosdrecht and Heijen, 2002), es que incorpora el parámetro  $\alpha$ , el cual permite ajustar con mayor precisión el contenido intracelular de PHA. Sin embargo, en este trabajo se hizo una modificación a este término, lo que permite hacer un ajuste más fino a la curva de acumulación de PHA usando el mismo número de parámetros.

Por otra parte, el modelo no describe la inhibición debida a una baja relación C/N como fue reportado en el trabajo de Johnson, *et al.* (2010) para cultivos mixtos y en Mulchaldani *et al.*, (1989) para cultivos puros. Sin embargo, en este trabajo se ha encontrado que para los cultivos mixtos la acumulación de PHA no se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento celular y no se encuentra limitada por la presencia de nitrógeno.

El modelo es lo suficientemente robusto para amortiguar cambios imprevistos en la concentración del influente y otros problemas que se pudieran presentar con el controlador de alimentación por pulsos. Por ejemplo, en la fig. 5.19 se muestra la simulación de la cinética de acumulación de PHA del experimento 6 (33 mgDQO/L, 3.0 mgO<sub>2</sub>/L y 20 mgN/L). Durante la realización de una de las réplicas de este experimento se tuvieron varios problemas técnicos con la alimentación automática de los pulsos a partir de la hora 15. A pesar de estos problemas, el modelo es capaz de predecir correctamente la fracción final de PHA, pues se considera la inhibición por acumulación de sustrato.

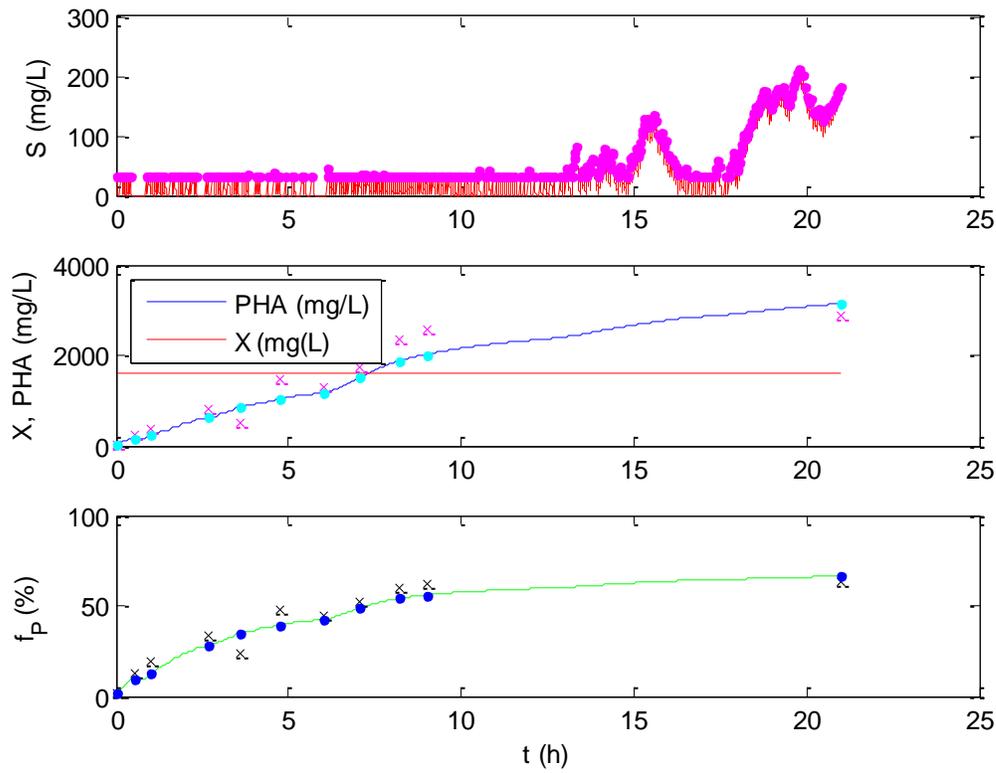


Figura 5. 19 Resultados de simulación para el experimento 6. Los símbolos representan los datos medidos, las líneas representan las predicciones del modelo (33 mgDQO/L, 3.0 mgO<sub>2</sub>/L y 20 mgN/L)

Algo novedoso de este modelo es la introducción de la influencia del nivel de oxígeno disuelto en la acumulación de PHA, lo cual fue posible a través de una estrategia de control automático que permitió mantener la concentración de oxígeno en un nivel fijo. Intentos anteriores de considerar esta influencia se basan en relaciones estequiometrias que involucran metabolitos como ATP y AcCoA, los cuales son muy difíciles de cuantificar.

## Capítulo 6 Conclusiones

- La estrategia de alimentación automática de pulsos de AGV para la acumulación de PHA en cultivos mixtos, la cual usa el flujo de aire como variable de control y mantiene la concentración de oxígeno disuelto alrededor de un valor de referencia, demostró ser una buena estrategia de control capaz de obtener una mayor fracción de PHA intracelular en comparación con la estrategia usual que utiliza el oxígeno disuelto como indicador de cuándo alimentar los pulsos de sustrato.
- La capacidad de almacenamiento de PHA en cultivos mixtos es comparable a los resultados obtenidos en cultivos puros; con la estrategia de alimentación de pulsos usando el flujo de aire como variable de control se obtuvo una fracción de PHA de hasta 79% en peso seco celular.
- La concentración de oxígeno disuelto demostró ser un factor muy importante en la acumulación de PHA en cultivos mixtos. El proceso de acumulación se favorece a bajas concentraciones de oxígeno disuelto; sin embargo, concentraciones de oxígeno extremadamente bajas pueden ser limitantes para la producción del polímero. A nivel industrial, la ventaja de obtener una mayor producción de PHA usando un flujo de aireación bajo es la reducción significativa de los costos de aireación.
- El modelo matemático desarrollado muestra ser preciso para describir el estado del proceso en la mayoría de los experimentos realizados. Este modelo es capaz de predecir experimentos de acumulación realizados bajo diferentes condiciones de operación.
- Los resultados experimentales indican que la cinética de producción de PHA en cultivos mixtos sigue un comportamiento de tipo Haldane con respecto a la concentración de oxígeno disuelto y a la concentración de ácidos grasos volátiles. Es decir, existe una concentración tanto de OD como de AGV en los pulsos de alimentación en la cual se maximiza la producción de PHA. Para las condiciones de este caso de estudio estas concentraciones óptimas son 3.0 mg/L de OD y pulsos de 100 mqDQO/L.

- La cinética de formación de PHA no está relacionada con el crecimiento de biomasa activa, ya que durante la acumulación de PHA por cultivos mixtos no se observó crecimiento celular evidente. Además, la síntesis de PHA no está limitada por la presencia o ausencia de amonio dentro de las concentraciones probadas en este trabajo.
- La fracción intracelular de PHA inhibe su propia tasa de formación. Existe una fracción de PHA intracelular  $f_p^*$  a partir de cual la tasa de acumulación se desacelera, es decir se produce inhibición por producto. En las condiciones de trabajo en esta investigación, el valor de  $f_p^*$  es 0.55 mgPHA/mgSSV.

## Capítulo 7 Recomendaciones

- La estrategia de alimentación automática de pulsos propuesta en este trabajo demostró funcionar de manera adecuada. Sin embargo, se debe considerar que la concentración de oxígeno disuelto medida es una aproximación de la concentración real, esto debido al tiempo de respuesta del sensor. Por esta razón, el sustrato puede ser consumido completamente antes que el sensor de oxígeno lo detecte y por consiguiente, el controlador puede demorar en adicionar el nuevo pulso y provocar cortos periodos de limitación de carbono donde puede ocurrir consumo de PHA. En el futuro sería interesante realizar un modelo de la dinámica del sensor para tener una medición real de la concentración de oxígeno disuelto dentro del reactor.
- Para poder determinar la verdadera influencia del nitrógeno en la síntesis de PHA, es recomendable hacer pruebas en el reactor de producción manteniendo una relación C:N constante a lo largo del proceso de acumulación.
- El modelo propuesto en el presente trabajo, es una buena base en la realización de estudios de optimización en la producción de PHA. Por ejemplo, se podrían hacer ciertas modificaciones para hacer que la concentración de los pulsos de alimentación durante las cinéticas de acumulación y compararlas con los resultados actuales donde todos los pulsos suministrados tienen la misma concentración.

## Capítulo 8 Referencias

- <<http://www.anoxkaldnes.com/Eng/c2fouc2/bioplastic.htm>>. 2008. Turning wastewater into a resource in a biological process. [web en línea]. [con acceso el 20 de Noviembre de 2008]
- American Public Health Association (APHA), the American Water Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21 ed., Port City Press, Baltimore, ML.
- Arcos, M. (2008). Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un biorreactor discontinuo. *Tesis de Maestría*. Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Beccari, M., Majone, M., Massaniso, P., Ramadore, R. (1998). A bulking sludge with high storage response selected under intermittent feeding. *Wat. Res.*, 32(11): 3403-3413.
- Beun, J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M., Heijnen, J. (2002). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Wat. Res.*, 36:1167–1180.
- Braunegg, G., Sonnleitner B., Lafferty, R. (1979). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 29-37.
- Comeau, Y., Hall, K., Oldham, W. (1988). Determination of poly-3 hydroxybutyrate and poly-3-hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2325-2327.
- Dias, J., Lemos, P., Serafim, L., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M., Ramos, A., Oliveira, R., Reis, M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.*, 6: 885-906.
- Dias, J., Oehmen, A., Serafim, L., Lemos, P., Reis, M., Oliveira, R. (2008). Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. *BMC Systems Biology*, 2:59.

- Dias, J., Serafim, L., Lemos, P., Reis, M., Oliveira, R. (2005). Mathematical Modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. *Biotechnol. Bioeng.*, 92(2):209-222.
- Dionisi, D., Beccari, M., Majone, Di Gregorio, S., M., Petrangeli, M., Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80:1306–1318.
- Dionisi, D., Majone, M., Papa, V., Beccari, M. (2004). Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnol. Bioeng.*, 85 (6): 569-579.
- Grau, P. (1991). Criteria for nutrient-balanced operation of activated sludge process. *Water Sci. Technol.*, 24(3): 251-258.
- Gujer, W., Henze, M., Takashi, M., Van Loosdrecht, M. (1999). Activated Sludge Model No. 3. *Water Sci. Technol.*, 39(1):183–193.
- Gurieff, N. (2007). Production of biodegradable polyhydroxyalkanoate polymer using advanced biological wastewater treatment process technology. *PhD Thesis*. Advanced Wastewater Management Centre; University of Queensland, St. Lucia, Brisbane, Australia.
- Gurieff, N., Lant, P. (2007). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technol.*, 98: 3393-3403.
- Guzmán, F. (17 de Julio de 2008). Proyecto UNAM: Crean polímeros biodegradables. El Universal, pág. F2.
- Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008). *Biological wastewater treatment. Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing, London.
- Johnson, K., Jiang, Y., Kleerebezem, R., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromol.* 10:670–676.
- Johnson, K., Kleerebezem R., van Loosdrecht, M. (2010b). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Wat. Res.*, 44:2141-2152.

- Johnson, K., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. (2010a). Influence of the ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *J. Biotechnol.*, 147:73-79.
- Khanna, S., Srivastava, A. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.*, 40:607–619.
- Khanna, S., Srivastava, A. (2006). Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHA: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. *Biochem. Eng. J.*, 27:197-203.
- Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2009). Production of PHAs from mixed and pure cultures of *Pseudomonas sp.* using short-chain fatty acids as carbon source under nitrogen limitation. *Desal.* 248:723-732.
- Lee, S. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, 49:1-14.
- Lemos, P., Serafim, L., Reis, M. (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J. Biotechnol.*, 122:226-238.
- Lenz, R., Marchessault, R. (2005). Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6 (1):1-14.
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S., Jie, R. (2009). Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresource Technol.*, 100: 1399–1405.
- Metcalf & Eddy. (2003). *Wastewater Engineering, treatment and reuse*. 4<sup>th</sup> Edition, Mc Graw-Hill, New York.
- Mulchandani, A., Luong, J. H. T., Groom, C. (1989). Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of PHB by *A. eutrophus* ATCC 17697. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 11-17.
- Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003). *Biorreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

- Oehmen, A., Keller-Lehman, B., Zeng, R., Yuan, Z. (2004). Optimization of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *Journal of chromatography*, 1070: 131-136.
- Pandolfi, D., Pons, M., Motta, M. (2007). Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis. *Biotechnol. Lett.*, 29:1263–1269.
- Patnaik, P. (2005). Perspectives in the modeling and optimization of PHB production by pure and mixed cultures. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25:153-171.
- Patnaik, P. (2008). Cognitive optimization of microbial PHB production in an optimally dispersed bioreactor by single and mixed cultures. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 32(4):557568.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates:biodegradable polymers with a range of applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82:233-247.
- Ramírez, N. (2009). Evaluación de un sistema de producción de polihidroxicanoatos usando lodos activados y biorreactores discontinuos. *Tesis de Maestría*. Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Riascos, C., Pinto, J. (2003). Optimal control of bioreactors: a simultaneous approach for complex systems. *Chem. Eng. J.*, 99:23-34.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22: 261-279.
- Serafim, L., Lemos, P., Albuquerque, M., Reis, M. (2008a). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81:615-628.
- Serafim, L., Lemos, P., Oliveira, R., Reis, M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioen.*, 87 (2): 145–160.
- Serafim, L., Lemos, P., Torres, C., Reis, M., Ramos, A. (2008b). The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromol. Sci.*, 8: 355-366.

- Sudesh, K., Abe H., Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25:1503-1555.
- Third K., Newland, M., Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 82(2):238-250.
- Tohyama, M., Patarinska, T., Qiang, Z., Shimizu, K. (2002). Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production. *Biochem. Eng. J.*, 10:157–173.
- van Aalst-van Leeuwen, MA, Pot MA, van Loosdrecht, MCM, Heijnen JJ. (1997). Kinetic modeling of poly(bhydroxybutyrate) production and consumption by *Paracoccus pantotrophus* under dynamic substrate supply. *Biotechnol. Bioeng.*, 55(5):773-782.
- van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (2002). Modelling of activated sludge processes with structured biomass. *Water Sci. Technol.* 45(6):13-23.
- Westerberg, K. (2007). Using the dissolved oxygen signal for automatic control in fed-batch production of PHA by a mixed culture. *Internal Report*, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Lund University, Sweden.
- Yamane, T. (1993). Yield of poly-d-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.*, 41:165–170.
- Yu, L., Qi-Shan, L. (2005). Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnology Advances*, 24 (2006) 115–127.

## Productos de Investigación

- Montañaño, L., Ramírez, N. y Vargas, A. (2009). Producción de polímeros biodegradables por lodos activados enriquecidos en reactores discontinuos. XIII **Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería** y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco Guerrero, México, del 21 al 26 de junio.
- Montañaño, L. and Vargas, A. (2010). Effect of dissolved oxygen concentration on PHA production by mixed cultures in a pulse fed batch bioreactor. **2<sup>nd</sup> Mexico Young Water Professionals Conference** 12-14 April 2010, Querétaro, Qro., México.
- Montañaño, L. and Vargas, A. (2010). PHA Production by mixed cultures in a batch bioreactor with dissolved oxygen control. **World Water Congress and Exhibition** 19–24 September 2010, Montréal, Canada.
- Estancia de investigación en la Universidad de Queensland desarrollando el proyecto: “Thermal stability of polyhydroxyalkanoates” en la Escuela de Ingeniería Química y el Instituto Australiano de Bioingeniería y Nanotecnología.

### Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos

Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos (APHA & AWWA & WPCF, 2005), se preparó el papel de filtro enjuagándolo con agua destilada y aplicando vacío en un embudo de filtración, hasta eliminar el exceso de agua. Se dejó secar en estufa a 103-105°C durante 1 hora y se llevó a la mufla por 15 min a 550 °C. Posteriormente, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y luego se pesó en la balanza analítica.

Una vez que se obtuvo el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se mojó el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada. Se tomó un volumen de 5 mL de la muestra homogeneizada, vertiendo el volumen en el embudo de filtración y se aplicó vacío hasta eliminar totalmente el exceso de agua. Usando un soporte de aluminio se llevó a secar a la estufa a 105°C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador durante 15 min y se registró su peso, obteniendo así los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

Para calcular los sólidos suspendidos fijos se colocó el filtro anterior en la mufla a 550 ± 50°C durante 15 min, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y se registró su peso. Los sólidos suspendidos volátiles se determinan por la diferencia entre sólidos totales y fijos.

Cálculos

$$SST, mg/L = \frac{(P_e - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSF, mg/L = \frac{(P_m - P_c) * 1000}{V}$$

$$SSV, mg/L = SST - SSF$$

Donde:

SST = sólidos suspendidos totales en mg SST/L

SSF = sólidos suspendidos fijos en mg SSF/L

SSV = sólidos totales volátiles en mg SSV/L

Pc = Peso constante del filtro en mg

Pe = Peso del filtro con el sólido seco a 103-105°C en mg

Pm = Peso de la filtro más el residuo calcinado a 550 °C en mg

V = volumen de muestra en mL

En el grupo de trabajo se determinó la incertidumbre de este método gravimétrico, obteniéndose un resultado de  $U_{SST} = \pm 64.8$  mg/L.