



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

**PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A
PARTIR DE AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA
DE LA CERVEZA**

Memoria presentada por:

MARTA BEN GARCÍA

para optar al grado de Doctora
por la Universidade da Coruña

A Coruña, Octubre 2015

TESIS DOCTORAL

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE AGUA RESIDUAL
DE LA INDUSTRIA DE LA CERVEZA

AUTOR:

MARTA BEN GARCÍA

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN VEIGA BARBAZÁN

DR. CHRISTIAN KENNES

TRIBUNAL CALIFICADOR

PRESIDENTE:

VOCALES:

Acuerdan otorgar la calificación de:

A Coruña, ____ de _____ de 20__



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA
E ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

Rúa da Fraga, 1
15008 A Coruña
Teléfono 981 167 000
Fax 981 167 065

María del Carmen Veiga Barbazán, Coordinadora del programa de doctoramiento de Biotecnología Avanzada,

CERTIFICA

Que la Licenciada en C.C. Químicas **Marta Ben García** realizó en este programa de doctoramiento, dirigida por la **Dra. María del Carmen Veiga Barbazán** y el **Dr. Christian Kennes**, el trabajo titulado “**producción de polihidroxialcanoatos a partir de agua residual de la industria de la cerveza**”, que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, expide y firma la presente en A Coruña a 13 de Octubre de 2015.

María del Carmen Veiga Barbazán



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

Rúa da Fraga, 1
15008 A Coruña
Teléfono 981 167 000
Fax 981 167 065

M^a Carmen Veiga Barbazán, Catedrática de Ingeniería Química y **Christian Kennes**, Catedrático de Ingeniería Química del Departamento de Química Física e Enxeñería Química I de la Universidad de A Coruña,

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “**Producción de polihidroxicanoatos a partir de agua residual de la industria de la cerveza**” fue realizado por la Licenciada en C.C. Químicas **Marta Ben García** en el Departamento de Química Física e Ingeniería Química I, área de Ingeniería Química, y que como Directores del mismo la autorizan a su presentación para optar al grado de **Doctora en Química**.

Y para que así conste, expiden y firman la presente en A Coruña a 13 de Octubre de 2015.

María del Carmen Veiga Barbazán

Christian Kennes

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores de tesis, M^a del Carmen Veiga Barbazán y Christian Kennes, la oportunidad que me dieron al permitirme continuar con mi formación en el área medioambiental. Y es que extrañamente la gente se cree que los químicos solo sabemos contaminar... pero no se dan cuenta que también somos los que miramos por el medio ambiente y su salud.

También me gustaría agradecer a María Reis y a su grupo de investigación que me dieran la oportunidad de formar parte de ellos durante el mes que duró mi estancia allí. Nunca quise irme de estancia y sin embargo, después de ir allí no veía el momento de volver a repetir la experiencia.

No quisiera olvidarme de los trabajadores de la Estrella Galicia por su infinita paciencia a la hora de atendernos cuando teníamos que ir a recoger el agua que hizo posible este trabajo. Ni tampoco del grupo de Ramón Artiaga por realizar el análisis de los plásticos obtenidos.

En mi último año de químicas recuerdo que hubo una charla en la que varias personas que habían estudiado químicas nos relataban sus experiencias en el marco laboral. El objetivo de la charla era que viéramos la multitud de opciones laborales con las que contábamos al haber estudiado químicas. Recuerdo que entre estas personas se encontraba un profesor universitario que, al hablarnos de su experiencia, nos relató que los mejores años de su vida habían transcurrido durante el período en el que desarrolló su tesis doctoral.

Yo no podría asegurar que sean los mejores años de mi vida... porque hay muy buenos momentos a lo largo de una vida, pero sí que reconozco que es una experiencia inolvidable. Me quedo con grandes momentos vividos y un montón de gente increíble que no hubiera sido posible conocer de no haberme decidido a realizar la tesis doctoral en este departamento.

A Almu y a Bea, mis maestras, gracias por acogerme en el laboratorio como lo habéis hecho y por la infinita paciencia que demostrasteis conmigo. No podría haber deseado mejores maestras en esta etapa de mi vida.

A Tania. Gracias por todo. Sé que a veces no es fácil trabajar conmigo... y ya sabes que en mi cabeza todo es posible y eso hace que me embarque en mil historias a la vez. Gracias por soportar mi ritmo de trabajo todos los años que estuvimos

Agradecimientos

trabajando juntas sin quejarte. Ahora que ya no trabajamos juntas, no sabes lo mucho que te echo de menos.

A Sandra, que aunque solo hayamos coincidido un pequeño período de tiempo en el laboratorio, a lo largo de estos años he podido conocer a la gran persona que eres.

A Lea. Gracias por todas las visitas que nos hacías al laboratorio, creo que nunca te lo dije, pero siempre fuiste una más en nuestro laboratorio. Gracias por la alegría que siempre traías contigo. Siempre te he admirado por tu valentía a la hora de irte a un lado o a otro a trabajar y saber abrirte un camino en todas partes. No conozco a nadie que tenga una capacidad tan grande como tú para hacer amigos.

A Pablo por su infinita paciencia cuando recurría a él con mis múltiples problemas con los equipos. Pablo, te debo mi actual trabajo. Tú fuiste el que me ensañaste los conocimientos de cromatografía básicos que me permitieron estar donde estoy.

A la gente del departamento de analítica. Gracias por resolver todas mis dudas del campo de la analítica... y es que no sabéis cuantas dudas existenciales habéis resuelto.

Al departamento de biología animal. Gracias por dejarme usar el liofilizador. Sabed que sin él este trabajo no sería posible. Muchísimas gracias.

Al departamento de Química inorgánica por dejarme usar su balanza siempre que lo he necesitado, no sabéis de qué aprieto me habéis sacado.

Al resto de compañeros del laboratorio, porque para nombrarlos uno a uno necesitaría un libro solo de agradecimientos... y es que nueve años en el laboratorio dan para conocer a muchas personas. Pero sabed que todos me habéis aportado muchas cosas buenas.

Quisiera también dar las gracias a mis compañeros en SGS, por apoyarme en esta última etapa de mi tesis, y por estar siempre dispuestos a echarme una mano. En especial me gustaría agradecer a Belén sus consejos a la hora de maquetar la tesis y su ayuda al leer y corregir errores de formato de la tesis. No podría haber encontrado a nadie mejor para ayudarme en esta tarea.

Finalmente, quisiera agradecer a mi Familia y amigos todo el apoyo que me dieron en estos años.

Índice

Página

0. Resumen y objetivos	3
0.1. Resumo e obxetivos.....	3
0.2. Summary and goals.	5
0.3. Resumen y objetivos.....	7
0.4. Estructura de la tesis.....	9
1. Introducción	11
1.1. Industria <i>cervecera</i>	13
1.1.1. Situación socioeconómica del sector cervecero en España.	13
1.1.2. Proceso de fabricación y características de los efluentes generados.....	15
1.1.3. Efluentes generados en la industria de la cerveza.....	18
1.1.3.1. Procedencia del agua residual generada en la industria cervecera.	18
1.1.3.2. Generación de aguas residuales en la industria cervecera.	20
1.1.4. Tratamientos biológicos convencionales de los efluentes de la industria cervecera.	23
1.2. Problemática asociada a los plásticos tradicionales.....	24
1.3. Polihidroxicanoatos (PHA).....	26
1.3.1. Introducción a los polihidroxicanoatos.....	26
1.3.1.1. Biología.....	26
1.3.1.2. Composición química.....	27
1.3.1.3. Propiedades.....	28
1.3.1.4. Aplicaciones.....	30
1.3.2. Producción de los polihidroxicanoatos.....	31
1.3.2.1. Organismos y mecanismos de producción.....	31
1.3.2.1.1. Bacterias.....	32
1.3.2.1.1.1. Cultivos puros.....	32
1.3.2.1.1.2. Bacterias modificadas genéticamente.....	35
1.3.2.1.1.3. Cultivos mixtos.....	36
1.3.2.2. Estrategias de fermentación mediante el uso de cultivos mixtos.....	39
1.3.3. Extracción de PHA.....	41
1.4. Referencias.....	43

2. Materiales y métodos.....	51
2.1. Métodos analíticos.	53
2.1.1. Determinación de sólidos en suspensión totales y volátiles (SST y SSV).	53
2.1.2. Determinación de amonio (NH_4^+).....	53
2.1.3. Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes.	54
2.1.4. Determinación de azúcares.	56
2.1.5. Determinación del Nitrógeno Kjeldahl (NTK).....	56
2.1.6. Determinación de fosfato (PO_4^{3-}).....	57
2.1.7. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).....	57
2.1.8. Determinación de polihidroxialcanoatos (PHA).	58
2.2. Sistema.....	59
2.2.1. Fermentación acidogénica.....	59
2.2.1.1. Inóculo.....	59
2.2.1.2. Medio de cultivo.	60
2.2.1.3. Reactor acidogénico.	60
2.2.2. SBR operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica (ADF) y medio sintético.....	61
2.2.2.1. Inóculo.....	61
2.2.2.2. Medio de cultivo.	61
2.2.2.3. SBR aerobio.....	62
2.2.3. SBR aerobio operado bajo condiciones ADF y agua residual.	63
2.2.3.1. Inóculo.....	63
2.2.3.2. Medio de cultivo.	63
2.2.3.3. SBR operado con agua real.	63
2.2.3.4. Ensayos discontinuos.	65
2.2.3.5. Ensayos fedbatch.	66
2.3. Caracterización de los plásticos.....	66
2.3.1. Composición del polímero.	66
2.3.2. Extracción y recuperación del polímero.....	67
2.3.3. Propiedades térmicas.	67
2.4. Cálculos.....	68
2.4.1. Fermentación acidogénica.....	68

2.4.2.	Etapa aerobia.	68
2.5.	Referencias.	69
3.	Enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras	71
3.1.	Resumen.	73
3.2.	Sistema experimental.	74
3.2.1.	Inóculo.	74
3.2.2.	Medio de cultivo.	74
3.2.3.	SBR estándar.	74
3.3.	Resultados y discusión.	75
3.4.	Conclusiones.	79
3.5.	Referencias.	80
4.	Efecto de la concentración de nutrientes en la acumulación de PHA	81
4.1.	Resumen.	83
4.2.	Sistema experimental.	84
4.2.1.	Fermentación acidogénica.	84
4.2.2.	Etapa aerobia.	85
4.2.2.1.	Sequencing batch reactor (SBR).	85
4.2.2.2.	Ensayos discontinuos aerobios.	86
4.3.	Resultados y discusión.	88
4.3.1.	Operación del SBR.	88
4.3.2.	Efecto de la concentración de nitrógeno.	91
4.3.3.	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto (OD).	96
4.4.	Conclusiones.	99
4.5.	Referencias.	101
5.	Optimización de la acumulación de PHA variando la concentración de sustrato, el pH y la temperatura	105
5.1.	Resumen.	107
5.2.	Sistema experimental.	109
5.2.1.	Fermentación acidogénica.	109
5.2.2.	Etapa aerobia.	110
5.2.2.1.	Sequencing Batch Reactor (SBR).	110
5.2.2.2.	Ensayos discontinuos aerobios.	110
5.3.	Resultados y discusión.	112

5.3.1.	Operación del SBR.	112
5.3.2.	Efecto de la concentración de sustrato.....	114
5.3.3.	Efecto de la temperatura.	117
5.3.4.	Efecto del pH.	120
5.4.	Conclusiones.....	123
5.5.	Referencias.	125
6.	Efecto de la VCO en el enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras.....	127
6.1.	Resumen.....	129
6.2.	Sistema experimental.....	130
6.2.1.	Fermentación acidogénica.....	130
6.2.2.	Sequencing batch reactor (SBR).	130
6.3.	Resultados y discusión.....	132
6.3.1.	Condiciones limitantes del crecimiento celular.....	132
6.3.1.1.	Etapas de enriquecimiento del lodo.	132
6.3.1.2.	Ensayos batch.	134
6.3.2.	Condiciones no limitantes del crecimiento celular.....	136
6.3.2.1.	Etapas de enriquecimiento del lodo.	136
6.3.2.2.	Ensayos batch.	138
6.3.3.	Discusión.	139
6.4.	Conclusiones.....	144
6.5.	Referencias.	146
7.	Efecto del TRS en el enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras.....	149
7.1.	Resumen.....	151
7.2.	Sistema experimental.....	152
7.2.1.	Fermentación acidogénica.....	152
7.2.2.	Sequencing batch reactor (SBR).	153
7.3.	Resultados y discusión.....	154
7.3.1.	Condiciones limitantes del crecimiento.....	154
7.3.1.1.	Etapas de enriquecimiento del lodo.	154
7.3.1.2.	Ensayos batch.	156
7.3.2.	Condiciones no limitantes del crecimiento.....	158

7.3.2.1.	Etapa de enriquecimiento del lodo.	158
7.3.2.2.	Ensayos batch.	160
7.3.2.2.1.	Efecto de la concentración de nutrientes	162
7.3.3.	Discusión.	164
7.4.	Conclusiones.....	169
7.5.	Referencias.	170
8.	Caracterización de los bioplásticos.....	173
8.1.	Introducción.....	175
8.2.	Resultados y discusión.	176
8.3.	Conclusiones.....	182
8.4.	Referencias.	184
9.	Conclusiones	187

Índice de figuras

Fig. 1.1. Producción de cerveza en Europa en el año 2013.	13
Fig. 1.2. Producción de cerveza en el mundo en el año 2013.	14
Fig. 1.3. Evolución de la producción de cerveza desde el 2001 hasta la actualidad.	15
Fig. 1.4. Diagrama de flujo de la industria cervecera que colabora en este trabajo.	17
Fig. 1.5. Balance de consumo y emisiones en una industria cervecera española (Canales, 2005).	19
Fig. 1.6. Esquema de un granulo de PHB. El corazón consta de polímeros de PHA recubiertos por una monocapa lipídica con proteínas integradas. La monocapa lipídica dirige su parte hidrofóbica hacia el corazón. Las proteínas integradas están constituidas por PHA polimerasas, PHA depolimerasas, proteínas estructurales y proteínas de función desconocida (Zinn <i>et al.</i> , 2001).....	27
Fig. 1.7. Estructura general de los PHA (Formolo <i>et al.</i> , 2003).	27
Fig. 1.8. Rutas metabólicas para la síntesis y degradación de PHA por diversos microorganismos (de Lemos <i>et al.</i> , 2004 (capítulo 4 del libro: Resource, recovery and reuse in organic solid waste management)).	35
Fig. 1.9. Evolución del consumo de sustrato, producción y degradación de PHB y tasa específica de crecimiento celular para un sistema operado bajo condiciones ADF.....	39
Fig. 2.1. Calibrado de amonio con método espectrofotométrico.....	54
Fig. 2.2. Calibrado de ácidos grasos por HPLC.	55
Fig. 2.3. Calibrado de EtOH por HPLC.	55
Fig. 2.4. Calibrado de azúcares totales.	56
Fig. 2.5. Calibrado para la determinación de fosfato.	57
Fig. 2.6. Calibrado de PHA por el método del patrón interno.	59
Fig. 2.7. Reactor acidogénico.....	61
Fig. 2.8. SBR operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica alimentado con medio sintético.	63
Fig. 2.9. SBR operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica alimentado con agua real.	64
Fig. 2.10. Sistema empleado para realizar ensayos discontinuos.	66
Fig. 3.1. Esquema del SBR aerobio: 1. alimentación, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. efluente.....	75
Fig. 3.2. Esquema del ciclo de operación del reactor SBR.....	75
Fig. 3.3. Variación de los rendimientos de almacenamiento ($Y_{STO}(\bullet)$) y crecimiento ($Y_{GROWTH}(\square)$) y velocidad de consumo de acetato ($-q_S(\bullet)$), de amonio ($-q_N(\circ)$) y velocidad de producción de polímero ($q_P(^*)$) durante la operación del reactor.....	76

Fig. 3.4. Variación del tiempo de feast para las diferentes relaciones C/N estudiadas.....	78
Fig. 3.5. Variación de la concentración de SSV durante la operación del reactor a diferentes relaciones C/N.	79
Fig. 4.1. (a) Esquema del reactor anaerobio: 1. influente, 2. tanque de agitación, 3. decantador, 4. recirculación, 5. efluente. (b) Esquema del SBR aerobio: 1. influente, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. efluente.....	84
Fig. 4.2. Parámetros de operación obtenidos en el SBR operado bajo condiciones estándar durante el período de aclimatación del lodo al agua de cervecera fermentada.....	88
Fig. 4.3. Perfiles de concentración registrados durante un ciclo del SBR.	90
Fig. 4.4. Perfiles de consumo de sustrato y de nitrógeno y de producción de PHA. ...	91
Fig. 4.5. a) Porcentaje de PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.....	91
Fig. 4.6. Velocidades de consumo de sustrato, de nitrógeno y de producción de PHA obtenidas para diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.	93
Fig. 4.7. Perfiles de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de polímero.....	97
Fig. 4.8. a) Porcentaje de PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes velocidades de flujo de aire	97
Fig. 4.9. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes velocidades de flujo.	98
Fig. 5.1. (a) Esquema del reactor anaerobio: 1. influente, 2. tanque de agitación, 3. decantador, 4. recirculación, 5. efluente. (b) Esquema del SBR aerobio: 1. influente, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. Efluente.	109
Fig. 5.2. Parámetros de operación obtenidos en el SBR operado bajo condiciones estándar durante el período de aclimatación del lodo al agua de cervecera fermentada.....	113
Fig. 5.3. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes concentraciones de sustrato.....	114
Fig. 5.4. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes concentraciones de sustrato.....	115
Fig. 5.5. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.....	116
Fig. 5.6. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes temperaturas.....	118
Fig. 5.7. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes temperaturas.....	118
Fig. 5.8. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.....	119

Fig. 5.9. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes valores de pH.	121
Fig. 5.10. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes valores de pH.....	122
Fig. 5.11. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.	122
Fig. 6.1. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).....	133
Fig. 6.2. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero.	135
Fig. 6.3. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).....	137
Fig. 6.4. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero observados en los ensayos batch.	139
Fig. 7.1. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).....	155
Fig. 7.2. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero.	157
Fig. 7.3. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).....	159
Fig. 7.4. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero observados en los ensayos batch realizados con un lodo seleccionado a diferentes TRS.....	161
Fig. 7.5. Variación del contenido de PHA (%) (x) y de la producción específica de polímero (Δf_{PHA}) (Cmmol/CmmolX) (o) con la concentración de nitrógeno.	163
Fig. 7.6. Variación de la fracción de los monómeros de HB y HV en la composición del polímero con la concentración de nitrógeno.	164
Fig. 8.1. Imagen de un plástico producido durante la operación del reactor a diferentes TRS.....	177

Fig. 8.2. Curva de calentamiento de calorimetría diferencial de barrido típica de los polímeros caracterizados (en la gráfica de arriba se muestra la curva del copolímero P(HB:HV) 66:34% y en la gráfica de abajo la curva del copolímero P(HB:HV) 74:26%).....	178
Fig. 8.3. En la parte de arriba, perfiles de los diferentes AGV alimentados durante un fedbatch y variación en la composición del polímero obtenido. En la parte de abajo fracción acumulativa de HB, HV y HA (mg/mg).....	180
Fig. 8.4. Típica curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de los polímeros caracterizados ((-) curva del copolímero P(HB:HV) 66:34% and (- -) curva del copolímero P(HB:HV) 74:26%).	182

Índice de tablas

Tabla 1.1. Caracterización de algunos efluentes en la industria cervecera.....	22
Tabla 1.2. Distintos campos de aplicación de los PHA.....	31
Tabla 2.1. Parámetros operacionales durante el enriquecimiento del lodo acidogénico.....	60
Tabla 2.2. Composición del medio sintético empleado en el enriquecimiento del lodo.....	62
Tabla 2.3. Condiciones operacionales durante el enriquecimiento del lodo aerobio.....	62
Tabla 2.4. Parámetros operacionales de los diferentes ensayos realizados en el reactor continuo operado con agua real.....	65
Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo.....	74
Tabla 4.1. Características del agua residual empleada como influente.....	85
Tabla 4.3. Condiciones experimentales fijadas en los ensayos discontinuos.....	87
Tabla 4.2. Condiciones operacionales del SBR.....	87
Tabla 5.1. Condiciones operacionales del SBR.....	111
Tabla 5.2. Condiciones operacionales aplicadas en los ensayos discontinuos.....	111
Tabla 6.1. Parámetros operacionales del reactor SBR estándar operado a diferentes VCO bajo condiciones limitantes del crecimiento celular.....	131
Tabla 6.2. Parámetros operacionales del reactor SBR estándar operado a diferentes VCO bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular.....	132
Tabla 6.3. Resultados más relevantes obtenidos en los fedbatchs.....	135
Tabla 6.4. Resultados más relevantes obtenidos en los ensayos batch.....	139
Tabla 7.1. Parámetros operacionales del reactor estándar operado bajo condiciones desfavorables al crecimiento.....	153
Tabla 7.2. Parámetros operacionales del reactor estándar operado bajo condiciones favorables al crecimiento celular.....	154
Tabla 7.3. Resultados obtenidos en los fedbatchs llevados a cabo con el lodo seleccionado a diferentes TRS (6 y 3,5 d) bajo condiciones desfavorables al crecimiento celular.....	157
Tabla 7.4. Resultados obtenidos en los fedbatchs llevados a cabo con el lodo seleccionado a diferentes TRS (3,5; 10 y 1 d) bajo condiciones favorables al crecimiento celular.....	162
Tabla 8.1. Comparativa entre las propiedades de los plásticos obtenidos en este trabajo y aquellos encontrados en la bibliografía.....	181

Nomenclatura

Abrev.: abreviatura

Ac: ácido acético

ADF: aerobic dynamic feeding (alimentación dinámica aerobia)

AGV: ácidos grasos volátiles

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ASBR: anaerobic sequencing batch reactor (reactor discontinuo secuencial anaerobio)

Bu: ácido butírico

Cmmol/L: milimoles de carbono

C/N: relación carbon/nitrógeno

C/N/P: relación carbono/nitrógeno/fósforo

COD: carbono orgánico disuelto

%Crist: %cristalinidad

CSTR: reactor continuo de tanque agitado

d: días

DQO: demanda química de oxígeno

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EBPR: eliminación de fósforo biológica (Enhanced Biological Phosphorous Removal)

EDTA: ácido etilendiaminatetracético

FAS: sulfato ferroso amónico

F/F: relación entre el tiempo de feast y el tiempo de famine

FID: detector de ionización de llama

Δf_{HA} : producción específica de polímero

GAO: organismos acumuladores de glicógeno (Glycogen Accumulating Organisms).

mg GLU/L: mg glucosa por litro de disolución

ΔH_c : entalpía de cristalización

ΔH_m : entalpía de fusión

HA: hidroxialcanoato

3-HA: 3-hidroxialcanoato

Ac: ácido acético

HB: hidroxibutirato

3-HB: 3-hidroxibutirato

4-HB: 4-hidroxibutirato

HHx: hidroxihexanoato

HPr: ácido propiónico

HV: hidroxivalerato

3-HV: 3-hidroxivalerato

3-HP: 3-hidroxipropionato

NTK: nitrógeno total kjeldahl

mlc-PHA: polihidroxicanoato de cadena media

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida

n.c.: no controlado

Nmmol/L: milimoles de nitrógeno

PAO: organismo acumuladores de fósforo (Phosphorous Accumulating Organisms)

PFR: reactor de flujo en pistón

P(HB:HV): copolímero conteniendo unidades de HB y HV

P(HB:HV): copolímero conteniendo unidades de 3HB y 3HV

PHA: polyhidroxicanoato

PHB: polihidroxi butirato (también mencionado como P(HB) o P(3HB))

PHV: polihidroxivalerato

Pmmol/L: milimoles de fósforo

PP: polipropileno

OD: oxígeno disuelto

OUR: oxygen uptake rate (velocidad de consumo de oxígeno)

-q_S: velocidad específica de consumo de sustrato

-q_N: velocidad específica de consumo de nitrógeno

q_P: velocidad específica de producción de polímero

SBR: sequencing batch reactor (reactor discontinuo secuencial)

slc-PHA: polihidroxicanoato de cadena corta

SST: sólidos en suspensión totales

SSV: sólidos en suspensión volátiles

TGA: análisis termogravimétrico

t_{feast}: tiempo de feast

t_{famine}: tiempo de famine

T_g: temperatura de transición vítrea

T_C: temperatura de cristalización

T_m: temperatura de fusión

T_{max}: temperatura de degradación máxima

TRH: tiempo de retención hidráulico

TRS: tiempo de retención de sólidos

UBF: filtro de lecho ascendente

Uds.: unidades

UV/Vis: ultravioleta/visible

i-Val: ácido isovalérico

n-Val: ácido n-valérico

VCO: velocidad de carga orgánica

V_{RX}: volumen de reactor

vvm: volumen de gas por volumen de reactor por minuto

X₀: biomasa activa inicial

X: biomasa activa

Y_{GROWTH}: rendimiento de crecimiento

Y_{O2}: rendimiento de respiración celular

Y_{STO}: rendimiento de acumulación o almacenamiento

0. Resumen y objetivos

0.1. Resumo e obxetivos.

Hoxe en día os plásticos convertéronse en algo especial na nosa vida diaria. A versatilidade destes materiais convertelos en materias aptos para un gran rango de aplicacións, desde o campo da medicina hasta o seu emprego na industria do automóbil ou como envases contedores. O feito de que sexan materiais sintéticos permite a manipulación da súa estrutura química, podendo adoptar diferentes formas (desde fibras ate películas finas). Estes a súa vez presentan diferentes graos de resistencia física e unha elevada resistencia química. Sen embargo, ao non ser biodegradábeis, a acumulación dos plásticos no medio ambiente estase a converter nun problema medioambiental de gran dimensión.

Actualmente as formas de eliminación dos plásticos do medio ambiente mais frecuentes son a incineración e o reciclaxe, pero estas presentan varios problemas. A incineración de materiais plásticos pode levar á emisión de sustancias tóxicas ó medio ambiente como poden ser os ácido clorhídrico e o ácido cianhídrico. En canto a reciclaxe, esta está restrinxida a só algúns dos materiais plásticos e, ademais, con cada ciclo de reciclaxe prodúcense cambios nos materiais plásticos o que condiciona o seu uso en aplicacións posteriores.

A alternativa a este problema sería o emprego de plásticos biodegradábeis que presenten propiedades similares ós dos plásticos convencionais.

Entre os plásticos biodegradábeis que se coñecen na actualidade, os máis prometedores son os polihidroxialcanoatos (PHA). Estes son completamente biodegradábeis, xa que son producidos polos microorganismos como material de reserva cando son sometidos a condicións desfavorábeis para o crecemento celular na presenza dun exceso de carbono. Por outro lado, as súas propiedades son moi similares as do polipropileno e o polietileno.

Na actualidade xa existen varias empresas que producen este tipo de polímeros a escala industrial, sen embargo, a substitución dos plásticos convencionais por estes polímeros non é factible hoxe en día, debido ós maiores costes de estes materiais no mercado. O alto prezo destes materiais debese en gran parte ós costes dos substratos empregados na súa produción. A produción destes compostos ten lugar mediante o emprego de cultivos puros, o que fai necesario o uso de substratos puros (glucosa, sacarosa, alcohois, etc.) e condicións estériles. Unha alternativa para

reducir o prezo de mercado destes produtos sería o emprego de cultivos puros e o uso de residuos coma substratos.

A produción de PHA a partir de cultivos mixtos ten lugar en sistemas nos que o doador e o aceptor de electróns están fisicamente separados (sistemas anaerobio/aerobio ou anóxico/aerobio) ou ben en sistemas onde se favorece un crecemento desequilibrado mediante a imposición de condicións da alimentación dinámica (o substrato non está dispoñíbel).

No presente traballo xurdiu a posibilidade de producir PHA empregando un cultivo mixto sometido a condicións aerobias de alimentación dinámica e un efluente residual da industria cervexeira como substrato.

O auga residual da industria cervexeira caracterizouse por un alto contido de materia orgánica facilmente biodegradábel que baixo condicións de fermentación acidoxénica pode ser transformada na súa totalidade en ácidos graxos volátiles (AGV), principais precursores dos PHA nos procesos aerobios de alimentación dinámica de substrato.

O proceso empregado para o desenvolvemento deste traballo constou de tres etapas:

1. Fermentación acidoxénica: necesaria para transformar a materia orgánica presente na auga residual en AGV.

2. Selección do cultivo aerobio: etapa aerobia na que se selecciona un cultivo con capacidade de acumular PHA mediante o sometemento da biomasa a condicións alternas de presenza e ausencia de substrato.

3. Produción do PHA: o cultivo mixto seleccionado na segunda etapa é sometido a un pulso de substrato contendo altas concentracións de AGV para desta maneira promover ó almacenamento do PHA no interior das bacterias.

0.2. Summary and goals.

Nowadays plastics are considered essential in our daily life. The versatility of these materials makes their application feasible in a great range of different industrial sectors, from medicine to their use in the car industry or as a container. As they are synthetic materials, their chemical structure can be manipulated being capable of presenting different shapes (from fibres to thin films). These materials also present different grades of physical resistance and a high chemical resistance. However, since they are not biodegradable, they accumulate in the environment causing a waste disposal problem.

Until now, solutions to plastic waste management include incineration or recycling. However, most of these techniques present some problems. The incineration of plastic materials can lead to the release of toxic substances to the environment like chloridric acid and hydrogen cyanide. Moreover, recycling is restricted to some plastic materials and, in each cycle of recycling, the plastic materials suffer some changes conditioning their use in further applications.

The alternative to this problem would be to use biodegradable plastics that present similar properties to the conventional ones.

Nowadays, PHA are among the most promising bioplastics. PHA are completely biodegradable, as they are produced by microorganisms as reserve material when bacteria are submitted to unbalanced growth conditions in presence of high carbon concentrations. On the other hand, their properties are similar to those presented by polypropylene and polyethylene.

Although PHA are already produced at industrial scale, their applications are limited and they are not yet considered as commodity materials since their production costs are still much higher than those of synthetic polymers. Until now, the main obstacle to replace conventional plastics by PHA is the great difference in cost. PHA price is highly dependent on substrate costs.

An alternative to reduce PHA prices would be to use mixed cultures and cheap substrates such as waste.

PHA storage by mixed cultures occurs in systems where electron donor and acceptor availability are separated (anaerobic/aerobic systems or anoxic/aerobic

systems) or when the substrate is not continuously available to the microorganisms (aerobic dynamic feeding).

In this work, it was proposed to produce PHA using a mixed culture submitted to aerobic conditions of dynamic feeding and using an industrial effluent from a brewery industry as substrate.

Brewery wastewater is characterized by a high organic matter content easily biodegradable which, under acidogenic fermentation conditions, can be totally transformed into volatile fatty acids (VFA), the main precursors used to produce PHA under aerobic dynamic conditions.

The process used to develop this work consisted on three steps:

1. Acidogenic fermentation: needed to transform organic matter present in wastewater into VFA.

2. Aerobic culture selection step: aerobic step in which a culture with PHA storage ability is selected by submitting the biomass to transient conditions of substrate presence and absence.

3. PHA production step: the mixed culture selected in the second step is submitted to a substrate pulse containing high VFA concentration to promote the PHA storage inside the cell.

0.3. Resumen y objetivos.

Hoy en día los plásticos se han convertido en algo esencial en nuestra vida cotidiana. La versatilidad de estos materiales los convierte en materiales aptos para un gran rango de aplicaciones, desde el campo de la medicina hasta su empleo en la industria del automóvil o como envases contenedores. El hecho de que sean materiales sintéticos permite la manipulación de su estructura química, pudiendo adoptar diferentes formas (desde fibras a películas finas). Estos a su vez presentan diferentes grados de resistencia física y una elevada resistencia química. Sin embargo al no ser biodegradables, la acumulación de los plásticos en el medio ambiente se está convirtiendo en un problema medioambiental de gran dimensión.

Actualmente las formas de eliminación de los plásticos del medioambiente más frecuentes son la incineración y el reciclaje, pero estas presentan varios problemas. La incineración de materiales plásticos puede llevar a la emisión de sustancias tóxicas al medio ambiente como pueden ser ácido clorhídrico o cianhídrico. En cuanto al reciclaje, este está restringido a solo algunos de los materiales plásticos y, además, con cada ciclo de reciclado se producen cambios en los materiales plásticos lo que condiciona su uso en posteriores aplicaciones.

La alternativa a este problema sería el empleo de plásticos biodegradables que presenten propiedades similares a la de los plásticos convencionales.

Entre los plásticos biodegradables que se conocen en la actualidad, los más prometedores son los polihidroxialcanoatos (PHA). Estos son completamente biodegradables, ya que son producidos por los microorganismos como material de reserva cuando son sometidos a condiciones desfavorables para el crecimiento en presencia de un exceso de carbono. Por otro lado, sus propiedades son muy similares a las del polipropileno y a las del polietileno.

Actualmente ya existen varias empresas que producen este tipo de polímeros a escala industrial, sin embargo, la sustitución de los plásticos convencionales por estos polímeros no es factible a día de hoy, debido a los mayores costes de estos materiales en el mercado. El alto precio de estos materiales se debe en gran parte a los costes de los sustratos empleados en la producción. La producción de estos compuestos tiene lugar mediante el empleo de cultivos puros, lo que hace necesario el uso de sustratos puros (glucosa, sacarosa, alcoholes, etc) y condiciones estériles.

Una alternativa para reducir el precio de mercado de estos productos sería mediante el empleo de cultivos mixtos y el uso de residuos como sustratos.

La producción de PHAs a partir de cultivos mixtos tiene lugar en sistemas en los que el donador y el aceptor de electrones están físicamente separados (sistemas anaerobio/aerobio o anóxico/aerobio) o bien en sistemas donde se favorece un crecimiento desequilibrado mediante la imposición de condiciones de alimentación dinámica (el sustrato no está siempre disponible).

En el presente trabajo se planteó la posibilidad de producir PHA empleando un cultivo mixto sometido a condiciones aerobias de alimentación dinámica y un efluente residual de la industria cervecera como sustrato.

El agua residual de la industria cervecera se caracteriza por un alto contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable que bajo condiciones de fermentación acidogénica puede ser transformada prácticamente en su totalidad en ácidos grasos volátiles (AGV), principales precursores de los PHA en los procesos aerobios de alimentación dinámica de sustrato.

El proceso empleado para el desarrollo de este trabajo constó de tres etapas:

1. *Fermentación acidogénica*: necesaria para transformar la materia orgánica presente en el agua residual en AGV.
2. *Selección del cultivo aerobio*: Etapa aerobia en la que se selecciona un cultivo con capacidad de acumular PHA mediante el sometimiento de la biomasa a condiciones alternas de presencia y ausencia de sustrato.
3. *Producción de PHA*: el cultivo mixto seleccionado en la segunda etapa se somete a un pulso de sustrato conteniendo altas concentraciones de AGV para de esta manera promover el almacenamiento de PHA en el interior de las bacterias.

0.4. Estructura de la tesis.

La presente tesis se estructuró de la siguiente manera:

En el primer capítulo se presenta una revisión bibliográfica en la que se hace una breve introducción a la industria cervecera y a los tratamientos que se pueden aplicar en el tratamiento de estos efluentes industriales y, finalmente, se describen brevemente los polihidroxialcanoatos (PHA) y sus características.

En el segundo capítulo se describen los métodos de análisis y los materiales empleados para la determinación de los diferentes parámetros analizados durante la realización de este trabajo.

En el tercer capítulo se estudia la puesta en marcha de un reactor secuencial discontinuo (SBR) conteniendo un cultivo mixto y operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica con el objetivo de seleccionar una biomasa con capacidad acumuladora. En la puesta en marcha del reactor se estudian diferentes relaciones carbono/nitrógeno (C/N) para determinar así la relación óptima que nos permita seleccionar un cultivo acumulador de PHA.

En el cuarto y quinto capítulo se plantea el estudio y optimización de la etapa de producción de PHA mediante la variación de algunos parámetros fundamentales del proceso como son la concentración de nutrientes esenciales (capítulo 4), la concentración de sustrato, el pH y la temperatura (capítulo 5)

En el sexto y séptimo capítulo se plantea la optimización de la etapa de selección del lodo con objeto de mejorar la productividad del sistema mediante la variación de la velocidad de carga orgánica (capítulo 6) y el tiempo de retención de sólidos (capítulo 7). Asimismo, en ambos capítulos se plantean dos estrategias diferentes a la hora de enriquecer el lodo; una estrategia basada en la limitación de nutrientes esenciales (limitación del crecimiento celular) y una estrategia basada en la limitación del carbono (no limitación del crecimiento celular).

Finalmente, en el capítulo octavo nos centramos en el estudio de algunas de las características de los plásticos obtenidos durante los capítulos 7 y 8.

1. Introducción

1.1. Industria cervecera.

1.1.1. Situación socioeconómica del sector cervecero en España.

Dentro de la industria agroalimentaria, el sector cervecero ocupa una posición económica estratégica. La cerveza es la quinta bebida consumida en el mundo por detrás del té, bebidas carbónicas, la leche y el café, con un consumo medio de 23 litros/persona y año (Fillaudeau *et. al.*, 2006)

El sector de la elaboración de cerveza en España ostenta una posición destacada tanto en el contexto europeo como mundial (Figuras 1.1 y 1.2). España es el cuarto país productor de cerveza en la Unión Europea, por detrás de Alemania, Reino Unido y Polonia y ocupa la décima posición a nivel mundial, precedida por Reino Unido y Polonia.

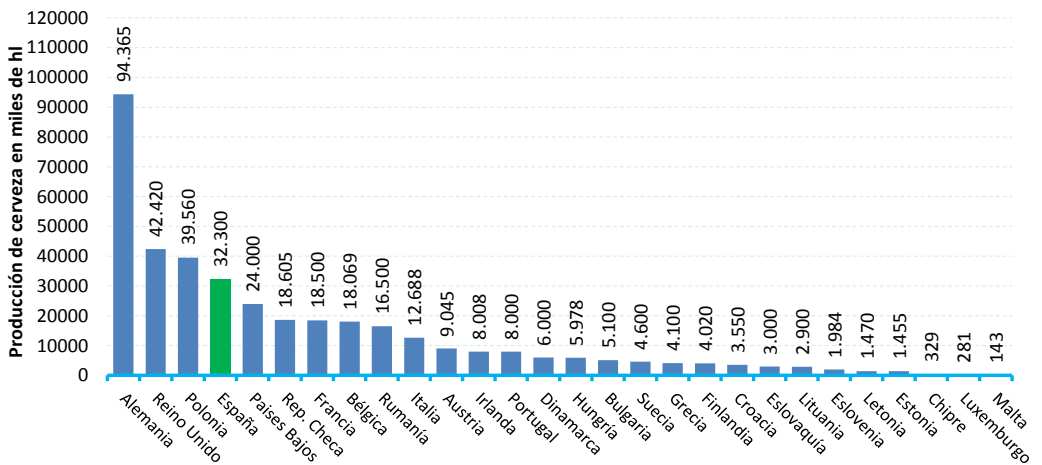


Fig. 1.1. Producción de cerveza en Europa en el año 2013.

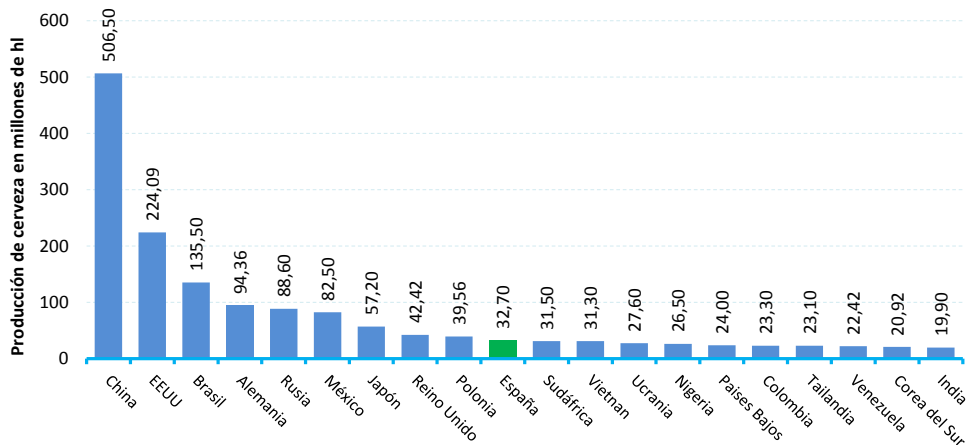


Fig. 1.2. Producción de cerveza en el mundo en el año 2013.

La producción de cerveza en España ha ido creciendo progresivamente a lo largo de los años (Fig. 1.3.); en el ejercicio 2003 se elaboraron 2,8 millones de hectolitros más que en el año 2002, lo que supuso un incremento del 10,1%. Este dato no solo confirma la tendencia ascendente de los últimos 7 años, sino que rompe esa línea de crecimiento moderado para transformarla en un súbito incremento. Entre los años 2001 y 2007 se recuperaron e incluso superaron los niveles de producción que se tenían a finales de la década de los 80. Sin embargo la producción de la industria cervecera española durante el año 2008 fue de 33,4 millones de hl, lo que supuso un descenso de 2,4% con respecto al ejercicio anterior. Este descenso en la producción fue una consecuencia de la situación económica del momento que afectó en gran medida al consumo de cerveza, afectando por lo tanto también a su producción (Martínez, 2010).

Tras años marcados por la crisis económica, en el 2014 las ventas de cerveza subieron de manera significativa en el conjunto del año. En total las compañías del sector comercializaron en 2014 cerca de 32,2 millones de hectolitros, cifra que se traduce en un aumento del 2,3 % respecto al año anterior. Este aumento constituye el mayor aumento observado desde el 2006, año en el que se marca el inicio de la crisis. En el 2014 se producen en España 33,6 millones de hl.

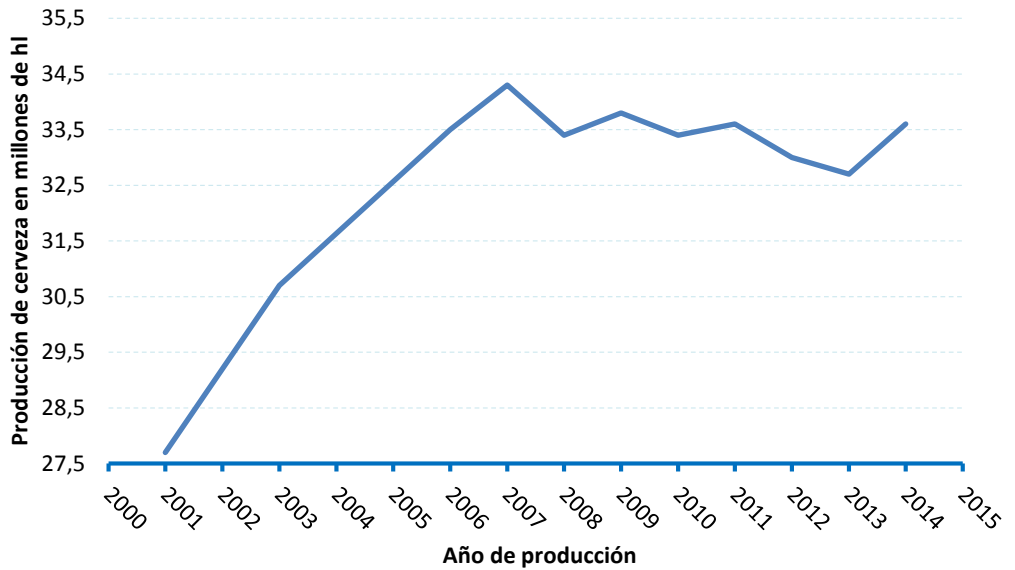


Fig. 1.3. Evolución de la producción de cerveza desde el 2001 hasta la actualidad.

El interés de esta bebida se ha intensificado en los últimos años lo que ha contribuido al nacimiento de microcervecías repartidas por diferentes puntos de la geografía española. En diciembre de 2014 había inscritas 314 microcervecías en el Registro General Sanitario.

1.1.2. Proceso de fabricación y características de los efluentes generados.

La cerveza es la bebida resultante de fermentar, mediante levaduras seleccionadas, el mosto procedente de malta de cebada (solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática) tras su cocción y aromatizado con lúpulo. La malta se obtiene mediante la germinación, desecación y tostado de la cebada. Entre las materias primas adicionales empleadas en el proceso se incluyen diversas clases de maltas (malta de trigo), cereales sin maltear llamados granos crudos (cebada, trigo, maíz o arroz), harina de almidón y productos de la degradación del almidón y el azúcar.

La mayoría de las cervezas que se encuentran en el mercado se pueden incluir en uno de los siguientes grupos básicos diferenciados por el tipo de levadura empleada en su fabricación:

- *De tipo lager o fermentación baja*, la cual utiliza fundamentalmente levadura del género *Saccharomyces carlsbergensis* que se deposita en el fondo del fermentador tras la fermentación o
- *De tipo ale o fermentación alta*, la cual emplea *saccharomyces cerevisiae* que flota en la superficie del líquido.

El proceso general de elaboración de cerveza d se resume de la siguiente forma:

La cebada malteada se tritura para obtener una harina muy grosera. A continuación se le añade agua para formar una masa o papilla y estimular los enzimas de la malta para solubilizar el endospermo degradado de la malta molida.

El extracto acuoso, denominado mosto, se separa de los sólidos (bagazos) mediante filtración y la aspersion de más agua caliente sobre la masa.

Una vez extraído el mosto se añade el lúpulo, el cual aportará a la cerveza sus características aromáticas propias. A continuación se realiza la cocción con lo que se detiene la acción enzimática, se esteriliza el mosto y se coagulan algunas proteínas.

En la siguiente etapa, el mosto se clarifica, enfría y airea, para conseguir las condiciones ideales para el crecimiento de las levaduras y el comienzo de la fermentación.

Durante la fermentación, gran parte de los hidratos de carbono se convierten en alcohol y dióxido de carbono, mientras que otros metabolitos de las levaduras confieren aroma y sabor.

La cerveza de fermentación o cerveza verde se deja madurar en los depósitos de guarda, donde se mantiene a baja temperatura para que tenga lugar la fermentación secundaria con la levadura arrastrada y precipiten las sustancias que de otro modo enturbiarían la cerveza.

Por último, se realizan las operaciones de carbonatación, pasterización y envasado cuyo orden dentro del proceso depende del tipo de envase utilizado.

En la Fig. 1.4. se muestra el diagrama de flujo de la industria productora de cerveza que colaboró en este trabajo.

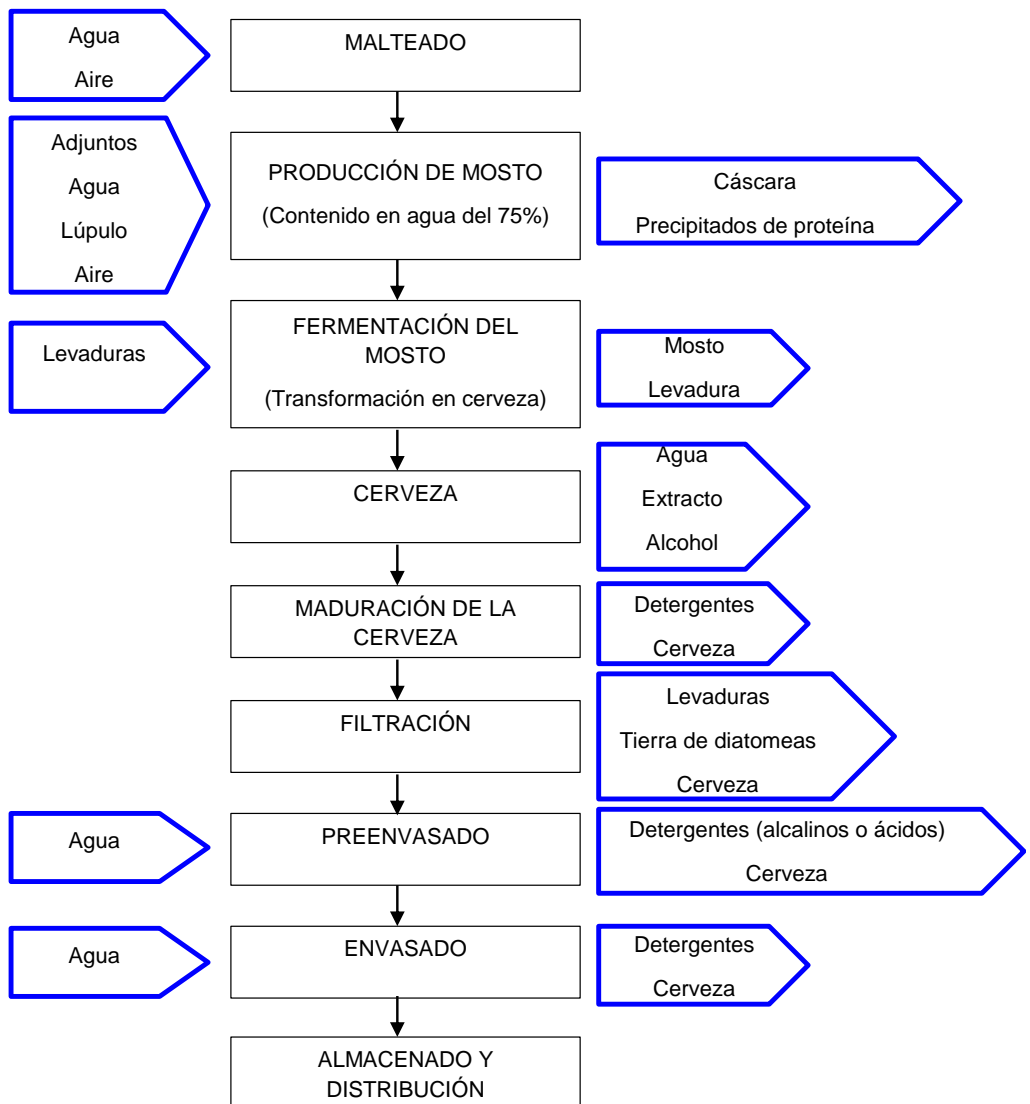


Fig. 1.4. Diagrama de flujo de la industria cervecera que colabora en este trabajo.

1.1.3. Efluentes generados en la industria de la cerveza.

1.1.3.1. Procedencia del agua residual generada en la industria cervecera.

Los principales recursos consumidos en el proceso de elaboración de la cerveza son:

- El agua
- La energía, tanto eléctrica como térmica
- El consumo de materiales

En la Fig. 1.5. se muestra un balance de entradas y salidas global que resume en términos generales los valores de consumos y emisiones que se pueden registrar con más frecuencia en las instalaciones cerveceras españolas para el proceso de elaboración de un hectolitro de cerveza envasada. Los valores recogidos en esta figura son valores orientativos, dado que existen multitud de variables que pueden influir en el orden de magnitud de los parámetros cuantificados en cada instalación productiva individual. Todos los valores están expresados como ratio de consumo/emisión referidos a la unidad de producción (hl de cerveza envasada) (Canales, 2005).

En el caso de la industria cervecera, como en casi todas las industrias de medio y gran tamaño con un elevado número de operaciones y procesos de cierta complejidad y dependientes para su funcionamiento de servicios auxiliares, los niveles de consumo y emisiones son función de muchos factores, entre los cuales se indican los siguientes ejemplos:

- Capacidad productiva y antigüedad de la instalación
- Tipos de cerveza y procesos de elaboración aplicados
- Ubicación geográfica y condiciones climatológicas
- Posibilidades de acceso a redes de suministro de ciertos combustibles, como gas natural
- Tipología de envases empleados y proporción de envases reutilizables que se ponen en el mercado
- Distancia a núcleos urbanos
- Sistemas de depuración empleados y manejo de los mismos

- Composición inicial del agua de abastecimiento

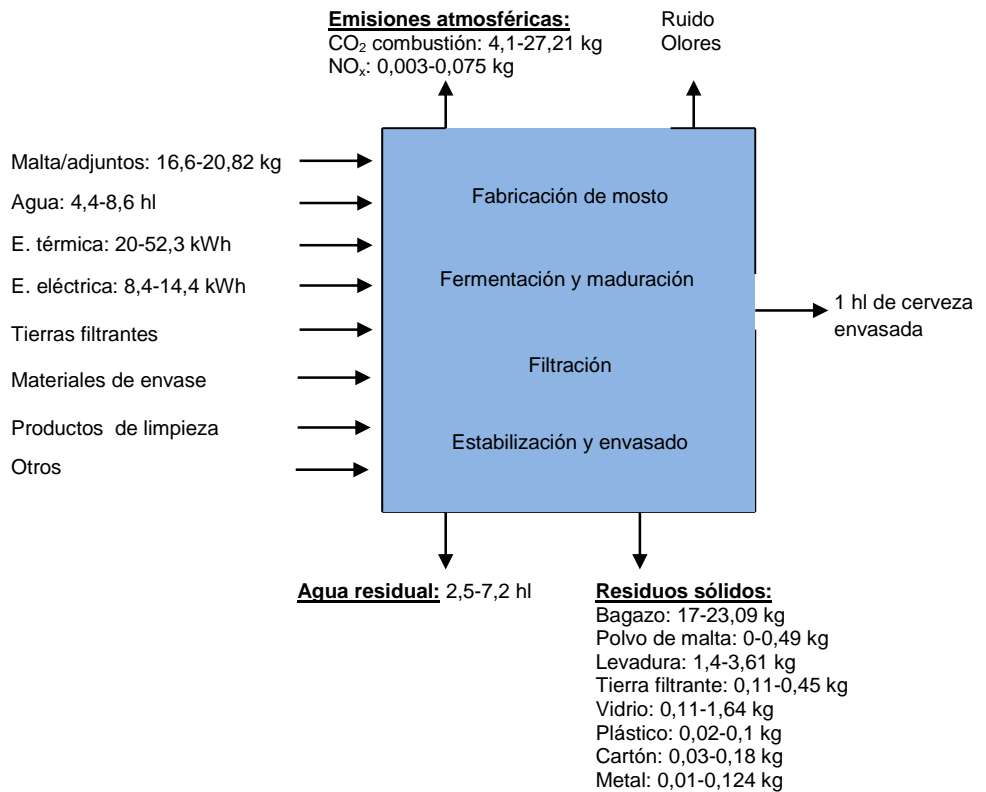


Fig. 1.5. Balance de consumo y emisiones en una industria cervecera española (Canales, 2005).

Los anteriores factores son inherentes a la instalación productiva y sus circunstancias particulares. Sin embargo existe otro factor de incertidumbre que tiene que ver con el método y las condiciones particulares en que se han realizado los cálculos, medidas o estimaciones de los valores de emisión.

Los aspectos ambientales más significativos asociados a emisiones son la generación de aguas residuales y residuos.

El agua es el componente principal de la cerveza, constituyendo aproximadamente el 95% en peso del producto. Pero además de ser la materia prima mayoritaria de la cerveza, es una sustancia indispensable para el funcionamiento de gran número de operaciones:

- Limpieza de equipos e instalaciones: todos los procesos incluidos en la producción de la cerveza (fabricación del mosto, fermentación del mosto, maduración de la cerveza, filtración, preenvasado y envasado) requieren una rigurosa limpieza, en la cual se emplearan detergentes de naturaleza ácida o alcalina según el criterio de los operarios

- Incorporación al producto: el consumo de agua en esta etapa es variable ya que va a depender de las características de agua de entrada. Si la composición química del agua de abastecimiento no es la idónea para ser empleada directamente como materia prima, es necesario realizar una serie de tratamientos para ajustar la concentración de los iones con el fin de evitar efectos perjudiciales en la calidad de los mostos y cervezas. Este acondicionamiento previo del agua puede hacer que el consumo se incremente notablemente ya que el ajuste de la composición requerida no se puede realizar sin una cierta pérdida de agua.

- Circuitos de refrigeración y calderas: En este apartado el mayor consumo se produce en la operación de enfriamiento del mosto, en la cual se suele consumir tanta agua como mosto producido. Sin embargo, el hecho de que el agua empleada en esta operación sale caliente a la salida del intercambiador de calor, hace que esta sea idónea para otras operaciones del proceso pudiendo ser reutilizada.

- Envasado: en la línea de envasado existen dos puntos donde el consumo de agua es elevado, en el acondicionamiento de los envases reutilizables y en los túneles de pasteurización. También es importante el consumo que tiene lugar en la etapa de lubricación de las cintas de transporte de las líneas de envasado.

- Sanitarias: a los residuos líquidos generados durante la producción de la cerveza se le suman otros residuos líquidos ajenos al proceso de producción (agua de los aseos, agua de la lluvia y agua procedente de las instalaciones de la fábrica).

De forma general, en las instalaciones españolas el consumo total de agua es de 4,4-8,6 hl/hl_{cerveza producida}.

1.1.3.2. Generación de aguas residuales en la industria cervecera.

Según la Guía de Mejores Técnicas Disponibles (MTD) del Sector Cervecerero, en España el volumen total de agua residual vertida en los centros productivos españoles oscila entre 2,5-7,2 hl/hl cerveza producida. Este amplio rango de emisión está relacionado directamente con el nivel de consumo de agua y con la eficiencia de la gestión de cada fábrica en relación a este recurso.

El volumen total del agua residual producida proviene principalmente de las operaciones de limpieza de equipos e instalaciones, siendo a la vez la corriente que normalmente aporta mayor carga contaminante, ya que las soluciones de limpieza además de contener diversas sustancias químicas como agentes de limpieza y desinfección, entran en contacto directo con la superficie de equipos, conductos y depósitos que han transportado o contenido mosto, cerveza o materias primas, incrementando considerablemente la carga orgánica y la cantidad de sólidos en suspensión entre otros parámetros.

Tanto los caudales como la composición son muy variables a lo largo de un día de trabajo o entre temporadas de alta y baja producción (invierno-verano). Esto se debe a la naturaleza discontinua del proceso de elaboración de la cerveza (proceso en lotes), por lo que el efluente varía en caudal y concentración en periodos cortos de tiempo, coincidiendo con los momentos en el día en los que se produce una determinada operación.

En la Tabla 1.1 se muestran algunas caracterizaciones de efluentes de fábricas cerveceras.

Tabla 1.1. Caracterización de algunos efluentes en la industria cervecera.

Parámetros	Referencias						
	Canales, 2005	Driessen y Vereijken 2003	Parawira <i>et al.</i> , 2005	Ahn <i>et al.</i> , 2001	Ling y Lo, 1999	Shao <i>et al.</i> , 2008	Este trabajo
V (hl/hl _{cerveza producida})	2,5-7,2	2-8					
pH		4,5-12	3,3-6,3	4,9-8,3	6,1-9,5	3,2-3,9	4,2-4,8
DQO (mg/l)	5000- 29000	2000- 6000	8240- 20000	990- 2400	1038- 4524	22500- 32500	3000- 8800
DBO ₅ (mg/l)		1200- 3600		690- 2300	671- 4200		
DBO ₅ /DQO	>0.6	0,6-0,7		0,6-0,8			
N _{total} (mg/l)	100-600	25-80	0.019- 0.033		28-343	320-450	4-32
SST(mg/l)	600- 2800	200- 1000	2910- 3000	200-750	450- 1044		250-470
N-NH ₄ ⁺ (mg/l)						144-216	0-1,8
Fósforo (mg/l)	100- 1000	10-50			6,3-56		8-26

De manera general, este tipo de efluentes se pueden definir como aguas residuales con un alto contenido en materia orgánica de fácil degradación (ácidos grasos, etanol, azúcares, etc) y en sólidos en suspensión derivados de la etapa de clarificado de la cerveza.

El pH de esta agua dependerá en gran medida de los productos de limpieza empleados así como del proceso de fabricación que se esté realizando, pudiendo fluctuar entre valores de 3 a 12.

Estos efluentes residuales se caracterizan también por un bajo contenido en nutrientes (nitrógeno y fósforo), los cuales derivan principalmente de las operaciones de limpieza, de la materia prima empleada para la producción así como de la cantidad de levadura presente en el efluente (Driessen y Vereijken, 2003; Parawira *et al.*, 2005).

1.1.4. Tratamientos biológicos convencionales de los efluentes de la industria cervecera.

Convencionalmente, se ha utilizado el tratamiento aerobio de forma eficaz para eliminar los contaminantes presentes en las aguas residuales de industrias productoras de cerveza. El sistema más común es el de lodos activos, con aireadores que suministran el oxígeno necesario para la oxidación biológica de los compuestos orgánicos. Los reactores de tipo SBR también han demostrado tener una buena eficacia para la eliminación de compuestos orgánicos y nitrogenados de este tipo de aguas (Wang *et al.* 2007).

Sin embargo, los sistemas aerobios presentan dos inconvenientes fundamentales:

1. Elevados requerimientos energéticos debido a la necesidad de un flujo continuo de oxígeno.
2. Elevada generación de lodos.

Las aguas residuales de la industria cervecera, debido a su carga orgánica entre media y alta, hacen que estos dos inconvenientes ganen peso. Por este motivo, el tratamiento anaerobio resulta una buena alternativa, ya que no se necesita oxígeno, se genera menos lodo y además se produce biogás aprovechable, por ejemplo, para mantener la temperatura en el propio reactor o para otras necesidades energéticas de la planta.

Son varios los sistemas anaerobios encontrados en la bibliografía que han sido aplicados con éxito en el tratamiento anaerobio de agua residual de la industria cervecera. Algunos ejemplos son el reactor UASB (reactor de lecho ascendente (Cronin y Lo, 1997 Parawira *et al.*, 2005 Öktem y Tüfekçi, 2006 Gangagni *et al.*, 2007), el UBF (filtro de lecho ascendente) (Yu y Gu, 1996), el filtro anaerobio (Leal *et al.*, 1998), el reactor de lecho fluidizado (Young-ho *et al.*, 2001) o el reactor ASBR (reactor secuencial discontinuo anaerobio) (Li y Mulligan, 2005 Shao *et al.*, 2008 Ling y Lo, 1999).

Algunos autores proponen el empleo de sistemas combinando tratamientos anaerobios y aerobios. De esta manera, en una primera etapa anaerobia, se eliminaría la mayor parte de la materia orgánica y en una segunda etapa aerobia se eliminarían los nutrientes presentes en este tipo de aguas (Rodrigues *et al.*, 2001; Brito *et al.*, 2007).

En los últimos años el enfoque de los procesos de tratamiento de residuos ha cambiado, ya no solo se busca la depuración de los residuos, sino que también se busca la forma de hacer estos tratamientos rentables convirtiendo a los residuos en productos valorizables ya sea mediante la obtención de energía o transformándolos en un producto de valor en el mercado.

En este trabajo se pretende optimizar la producción de Polihidroxialcanoatos PHA (bioplásticos) empleando cultivos mixtos como inóculo y agua residual procedente de una industria cervecera como sustrato.

1.2. Problemática asociada a los plásticos tradicionales.

Los plásticos sintéticos se han convertido en una parte fundamental de la vida cotidiana, siendo un material muy demandado. Este arraigo de los plásticos convencionales en la vida actual es debido a sus propiedades tanto físicas como mecánicas, entre las que cabe destacar la durabilidad y resistencia a la degradación. Estas propiedades tan aclamadas para algunas aplicaciones los convierten, sin embargo, en compuestos de difícil eliminación. Los desechos plásticos van acumulándose en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas por año (Lee *et al.*, 1996).

Hoy en día, uno de los tratamientos más empleados para la eliminación de estos materiales sólidos del medio ambiente consiste en la incineración de los mismos (Stein *et al.*, 1992). Bajo condiciones controladas, los niveles de CO₂ emitidos a la atmósfera mediante la combustión de las poliolefinas halogenadas y los poliestirenos son mucho menores que aquellos emitidos por combustión de combustibles fósiles (Braunegg *et al.*, 1998). Sin embargo, es un tratamiento caro pudiendo ser potencialmente peligroso. Durante la combustión de los residuos plásticos, se puede

formar cianuro de hidrógeno a partir de los plásticos basados en acrilonitrilo (Khanna y Srivastava, 2005).

Otros tratamientos asociados a la eliminación de plásticos del medio ambiente serían la bio- y la foto-degradación así como el reciclaje de estos materiales (Khanna y Srivastava, 2005). Sin embargo estos tratamientos plantean varios problemas.

El tratamiento por foto-degradación se basa en la descomposición del plástico mediante su exposición a la luz, sin embargo, es difícil encontrar un plástico que se mantenga inalterable en presencia de luz durante su vida útil y que en condiciones de compostaje se descomponga mediante el efecto de la luz (La Mantia, 1993).

La bio-degradación del plástico se basa en la posibilidad de crear vertederos en los que se consiga un ambiente en el cual, mediante la presencia de microorganismos capaces de degradar plástico y la aplicación de las condiciones adecuadas, se consiga la eliminación de estos materiales. No obstante, aunque las esterasas (enzimas hidrolizadoras de grupos éster) y algunos microorganismos son capaces de degradar algunos materiales plásticos a una velocidad de degradación que dependerá de la estructura del poliéster, hay materiales plásticos, como por ejemplo los poliésteres aromáticos, que no son susceptibles de ser degradados (La Mantia, 1993).

Por otro lado, el reciclaje de estos materiales no es una solución definitiva, ya que con cada etapa de reciclado se alteran las propiedades de estos materiales lo que reduce sus posibles aplicaciones posteriores (Ince *et al.* 2011).

Actualmente, la postura adoptada para tratar este problema se basa en la búsqueda de materiales con propiedades similares que sean de fácil degradación. Estos materiales es lo que se conoce con el nombre de bioplásticos o biopolímeros.

El término de bioplásticos o biopolímeros engloba básicamente tres tipos de polímeros (Khanna y Srivastava, 2005):

1. *Polímeros sintetizados químicamente*, son compuestos susceptibles de ser atacados mediante una reacción enzimática o por la actividad

microbiana. Sus propiedades, ligeramente diferentes a las de los plásticos convencionales, los convierten en un candidato no apto para la sustitución de estos últimos.

2. *Plásticos biodegradables basados en almidón*, se obtienen por mezcla de almidón (que se usa como relleno) y un plástico (ejemplo: almidón-polietileno). De esta forma cuando son desechados, los microorganismos degradan el almidón fácilmente destruyendo la matriz del plástico reduciéndose significativamente el tiempo de degradación. Sin embargo, los fragmentos del polímero que no son almidón son recalcitrantes permaneciendo en el medio ambiente durante mucho tiempo.

3. *Polihidroxicanoatos (PHA)*, son polímeros 100% degradables, ya que estos son sintetizados por una gran variedad de bacterias como material de reserva. Estos polihidroxicanoatos proporcionan una buena alternativa a los plásticos derivados del petróleo ya que presentan propiedades similares a las del polietileno y a las del polipropileno (Lee et al., 1996).

1.3. Polihidroxicanoatos (PHA).

1.3.1. Introducción a los polihidroxicanoatos.

1.3.1.1. Biología.

Los polihidroxicanoatos son sintetizados y acumulados por una amplia variedad de bacterias cuando son sometidas a condiciones desfavorables para el crecimiento (ejemplo bajo limitación de algún nutriente: nitrógeno, fósforo u oxígeno) en presencia de un exceso de carbono. Características como su alta insolubilidad en agua y su alto peso molecular (que apenas ejerce presión osmótica a la célula bacteriana) los convierten en materiales ideales para el almacenamiento de carbón y energía (Sudesh y Doi, 2000). En la naturaleza, los organismos procariontes responden a bruscos aumentos en nutrientes esenciales en su ambiente almacenándolos para sobrevivir durante prolongados períodos de hambre (Loo y Sudesh, 2007).

Los PHA sintetizados son acumulados en el citoplasma celular en forma de discretos gránulos. Estas inclusiones presentan un diámetro de 0,2-0,5 μm , y están envueltos por una membrana en la que se unen las enzimas que participan en su síntesis (Sudesh *et al.*, 2000) (Fig.1.6.).

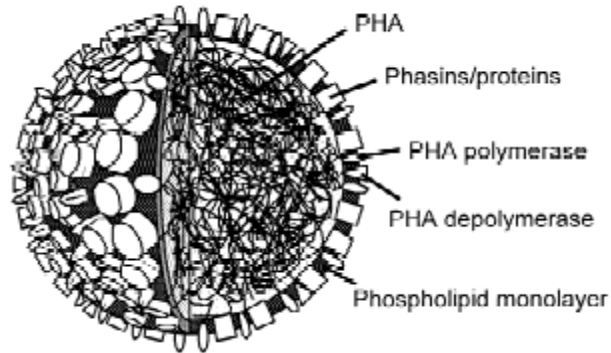


Fig. 1.6. Esquema de un granulo de PHB. El corazón consta de polímeros de PHA recubiertos por una monocapa lipídica con proteínas integradas. La monocapa lipídica dirige su parte hidrofóbica hacia el corazón. Las proteínas integradas están constituidas por PHA polimerasas, PHA depolimerasas, proteínas estructurales y proteínas de función desconocida (Zinn *et al.*, 2001).

La alta refractividad que presentan permite su visualización con microscopía de contraste de fase. Colorantes lipídicos como el azul de Nilo (Sudesh y Doi, 2000) o el negro de Sudan (Sudesh y Doi, 2000) permiten su diferenciación del restante material celular.

1.3.1.2. Composición química.

Los PHA son polímeros lineales de 3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxílico de un monómero forma un enlace de tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Fig. 1.7.) (Almeida *et al.*, 2004).

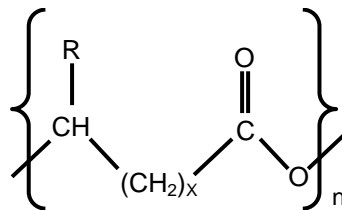


Fig. 1.7. Estructura general de los PHA (Formolo *et al.*, 2003).

La composición de la cadena lateral o átomo R y el valor de X determinan la identidad de la unidad monomérica (Braunegg *et al.*, 1998).

Actualmente se conocen aproximadamente 125 ácidos hidroxialcanoicos formando parte de los PHA (identificados en diversos géneros bacterianos) (Sudesh y

Doi, 2000). Según el número de átomos de carbono de las unidades monoméricas, los PHA pueden ser divididos en dos grupos: scl-PHA (PHA de cadena corta) conteniendo de 3 a 5 átomos de carbono y mcl-PHA (PHA de cadena media) presentando entre 6 y 14 átomos de carbono (Lee, 1996). Esta diferencia es principalmente debida a la especificidad del sustrato de la PHA sintasa que puede aceptar 3-hidroxicanoato (3-HA) de una determinada longitud de cadena (Khanna y Srivastava, 2004).

Otros criterios empleados para la clasificación de los PHA, a parte de su tamaño (número de átomos de carbono), son (Loo y Sudesh, 2007):

- *Origen:* si son PHA naturales (producidos de forma natural por los microorganismos a partir de sustratos generales) o semisintéticos (producidos mediante la adición de precursores para promover la biosíntesis).
- *Número de monómeros diferentes en la cadena:* homopolímeros (cuando una unidad monomérica sencilla está unida a otra igual) o heteropolímeros (dos o más unidades monoméricas distintas se unen entre sí para formar un copolímero).
- *Naturaleza química de los monómeros:* PHA conteniendo ácidos grasos alifáticos, PHA conteniendo ácidos grasos aromáticos o PHA conteniendo ambos tipos de ácidos grasos.

1.3.1.3. Propiedades.

Las diferentes propiedades de los PHA surgen químicamente como consecuencia de la longitud de las cadenas laterales unidas al esqueleto del polímero, así como de la distancia entre las uniones éster en el esqueleto del polímero. Generalmente, los PHA con cadenas laterales cortas son materiales duros y cristalinos, mientras que los PHA con cadenas laterales largas son elastómeros (Williams *et al.*, 1999). Además de ofrecer un amplio rango de propiedades mecánicas, los PHA son termoplásticos, insolubles en agua, 100% biodegradables y biocompatibles (Lee, 1996).

La familia de los PHA presenta una gran variedad de propiedades mecánicas que varían dependiendo de la composición de las unidades monoméricas. De esta forma el polihidroxibutirato (P(3HB)) presenta unas propiedades mecánicas comparables a las del polipropileno (PP), sin embargo es más rígido y más quebradizo (Loo y Sudesh, 2007). La introducción de unidades de hidroxivalerato (HV) en la estructura del polímero resulta en un aumento de la resistencia de impacto, de la flexibilidad y de la dureza. Así, los copolímeros P(3HB:3HV) serán más flexibles y al mismo tiempo más resistentes que el homopolímero P(3HB). Las propiedades mecánicas son dependientes de la relación molar del 3-hidroxivalerato (3HV) y estas pueden ser controladas mediante el ajuste de la fracción 3HV durante la fermentación (Loo y Sudesh, 2007; Khanna y Srivastava, 2003).

La introducción de monómeros diferentes al 3HV tales como 3-hidroxihexanoato (3HHX), 3-hidroxipropionato (3HP), 4-hidroxibutirato (4HB) en la cadena de polihidroxibutirato (PHB) también da lugar a copolímeros de propiedades mecánicas mejoradas. Las propiedades físicas y térmicas pueden ser reguladas mediante la variación de la composición de los copolímeros (Khanna y Srivastava, 2005).

La incorporación de unidades 4HB en la secuencia de unidades 3HB resulta en la obtención de copolímeros con un rango amplio de propiedades físicas variando entre polímeros elastómeros a polímeros altamente cristalinos. La cristalinidad de estos copolímeros decrece con el aumento de unidades de 4HB. Un reciente estudio demostró que el copolímero P(3HB:4HB) posee una buena compatibilidad y es comparable al poliglactin 910 (usado clínicamente) (Loo y Sudesh, 2007).

Finalmente la presencia de unidades de 3HHx da lugar a polímeros con propiedades intermedias a las presentadas por los scl-PHA y los mcl-PHA. La incorporación de unidades de 3HHx en la secuencia de 3HB reduce significativamente el punto de fusión del polímero y mejora considerablemente las propiedades físicas del polímero. Las propiedades que presenta este copolímero son muy similares a las de los plásticos comunes (Loo y Sudesh, 2007).

1.3.1.4. Aplicaciones.

Hasta el momento solo se ha hecho referencia a la importancia de los PHA debido a su similitud con los plásticos convencionales lo que los convierte en potenciales sustitutos de los mismos. Sin embargo, los campos de aplicación de los PHA son múltiples dado su amplio rango de propiedades físicas y mecánicas.

Las principales aplicaciones de estos compuestos son como materiales de embalaje o envases contenedores (por ejemplo films, contenedores de cosméticos, botes de champú, etc).

Sin embargo, dada su composición quiral, su biocompatibilidad y su biodegradabilidad, también tienen aplicaciones en la industria farmacéutica, en la medicina, en la industria alimentaria, en la industria de la cosmética, en la agricultura.

Asimismo, su naturaleza piezoeléctrica los hace también aptos para la electrónica.

En la Tabla 1.2 se muestra de forma resumida algunos de los campos de aplicación a los que son destinados estos compuestos.

Tabla 1.2. Distintos campos de aplicación de los PHA.

Campo de aplicación	Ejemplos	Referencia
Embalaje	Envases, films, botellas, y envases para embalar la comida.	Verlinden <i>et al.</i> , 2007; Suriyamongkol <i>et al.</i> , 2005; Khanna y Srivastava, 2005
Cosmética	Cremas de manos	Madison y Huisman, 1999
Medicina	Reparación de nervios y vías urinarias, tratamiento de heridas con suturas, tornillos, placas, materiales osteosintéticos, filamentos etc.	Suriyamongkol <i>et al.</i> , 2005; Khanna y Srivastava, 2005
Industria alimentaria	Agentes liberadores de sabor en los alimentos.	Madison y Huisman, 1999
Industria farmacéutica	Envoltorio de medicamentos, dispositivos de eliminación controlada de fármacos o como precursores de otros compuestos	Khanna y Srivastava, 2005
Agricultura	Encapsulación de semillas y fertilizantes de lenta eliminación, films de plásticos para la protección de los cultivos, envases biodegradables para las instalaciones del invernadero, etc.	Verlinden <i>et al.</i> , 2007; Philip <i>et al.</i> , 1999
Electrónica	Teléfonos móviles, sensores de presión para los teclados, instrumentos de medición, micrófonos, auriculares, altavoces, sensores de onda, etc.	Verlinden <i>et al.</i> , 2007, Philip <i>et al.</i> , 2007
Objetos de un solo uso	Utensilios de comer, maquinillas de afeitar, pañales, productos de higiene femenina	Kerhavarz <i>et al.</i> 2010
Otros	Tintas de impresora, adhesivos, ligas metálicas, cerámicas, colas, pinturas, etc	Verlinden <i>et al.</i> , 2007; Madison y Husiman, 1999

1.3.2. Producción de los polihidroxialcanoatos.

1.3.2.1. Organismos y mecanismos de producción.

Los PHA son sintetizados por un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas perteneciendo a, por lo menos, 75 géneros diferentes. Sin embargo, aunque en la bibliografía se pueden encontrar multitud de bacterias capaces de

generar PHA, tan solo unas pocas consiguen altos rendimientos. Algunos de los cultivos empleados industrialmente para la producción de PHA incluyen: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes Latus* y varias *pseudomonas* sp (*P. oleovorans*, *P. desnitrificans*, *P. Putida*).

La producción de PHA por los microorganismos surge debido a la limitación del crecimiento celular, la cual puede ser de dos tipos:

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

Ambas limitaciones dan lugar a un proceso de crecimiento desequilibrado en el que la producción de biomasa activa se ve reducida y el sustrato es acumulado como reservas intracelulares (Daigger and Grady, 1982).

1.3.2.1.1. Bacterias.

1.3.2.1.1.1. Cultivos puros.

Un cultivo puro es aquel que está compuesto por un solo tipo de microorganismos. Este tipo de cultivo surge a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo presenten la misma composición genética. Los cultivos axénicos son muy extraños en la naturaleza. En los medios naturales como por ejemplo, en el suelo, agua, o en el cuerpo humano existen cultivos mixtos.

La producción de PHA a partir de cultivos puros resulta, en la mayoría de los casos de la existencia de limitaciones externas (carencia de un nutriente esencial).

Algunos ejemplos de cultivos puros empleados para la producción de PHA son:

- Las bacterias *Ralstonia Eutropha* (inicialmente conocida como *Alcaligenes eutrophus*), las cuales son capaces de almacenar hasta un 80% de PHA referido a peso seco. Estas fueron empleadas en el proceso industrial inicial de ICI (Imperial Chemical Industries, ahora Zeneca Bio Products, UK) en el

cual se producía P(3HB) y P(3HB:3HV) mediante la alimentación de glucosa y una mezcla de glucosa y propiónico respectivamente a un cultivo batch a gran escala (Lee, 1996).

- Las bacterias *Alcaligenes latus*, consideradas durante mucho tiempo buenas candidatas para la producción de P(3HB). Las bacterias *A. latus* son capaces de utilizar diferentes sustratos de carbono como la sacarosa con una velocidad de crecimiento elevada trabajando en condiciones no limitantes (Formolo *et al.*, 2003). Sin embargo, el contenido de PHB obtenido por esta bacteria bajo condiciones de no limitación era inferior al 50% del peso seco de célula (Lee, 1996). Estudios posteriores demostraron que una limitación en la concentración de nitrógeno inicial llevaba a un aumento del contenido de PHA en la célula (Grothe *et al.*, 1999). Esto sugirió que el crecimiento durante la acumulación de PHA no era un proceso eficiente (Lee, 1999)
- Algunos géneros de pseudomonas son también capaces de emplear alcanos, alcoholes y alcanosatos de cadena media para crecer y acumular PHA en ausencia de limitación de nutrientes (Lee *et al.*, 1996).

Las vías metabólicas mediante las que se puede explicar la síntesis microbiana de PHA son dos: una para la especie *Ralstonia eutropha* y otra para las cepas *Pseudomonas sp* (Fig. 1.8.). Esta división viene determinada por los diferentes monómeros producidos por los dos tipos de microorganismos, scl-PHA y mcl-PHA, respectivamente (Sudesh *et al.*, 2000).

Vía metabólica de la especie *R. eutropha*: la síntesis de PHA tiene lugar en una reacción en tres etapas. Inicialmente, dos acetil-CoA derivadas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) condensan, debido a la acción de la enzima β -cetotiolasa (acetoacetil-CoA tiolasa). A continuación, la acetoacetil-CoA reductasa ((R)-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenada) cataliza la segunda etapa de la vía biosintética de P(HB) en la que la acetoacetil-CoA es convertida en 3-hidroxiacil-CoA. La reacción ocurre estereoespecíficamente, lo cual significa que todos los 3-hidroxiacil-CoA resultantes de la reacción presentarán una configuración R en la posición 3.

Finalmente, en la superficie del gránulo, el PHB es sintetizado a partir de la polimerización de las moléculas de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA mediante la actuación de la enzima PHB sintasa (Madison y Huissman, 1999; Sudesh *et al.*, 2000; Kessler y Witholt, 2001; Zinn *et al.*, 2001).

La *R. eutropha* puede emplear diversas fuentes de carbono para crecer y/o producir PHA. Entre los compuestos estudiados como sustrato de la *R. eutropha* destacan como precursores de PHB el ácido láctico, los n-alcanoatos con número par de átomos de carbono y el CO₂. El empleo de n-alcanoatos de número impar de átomos de carbono da lugar a copolímeros con unidades HB y HV. Por último destacar que el uso de fuentes de carbono especializadas como ácido 4-hidroxi-butírico, γ -butirolactona y 1,4-butenodiol potencian la introducción de monómeros 4HB junto con unidades 3HB (Sudesh *et al.*, 2000).

La síntesis de PHA por la bacteria *Rhodospirillum rubrum* tiene lugar mediante una vía metabólica semejante a la descrita para la *R. eutropha*, diferenciándose por el hecho de que la reducción de la acetoacetyl-CoA a L(+)-hidroxi-butiril-CoA es debida a la actuación de una reductasa NADPH dependiente. Este L(+)-hidroxi-butiril-CoA es posteriormente convertido a la forma D(-) mediante la actuación de dos enoil-CoA hidratasas. Esta vía metabólica es también empleada por *Aeromonas Caviae* en la síntesis de P(HB/HHXx) (Sudesh *et al.*, 2000).

Vía metabólica de la cepa *Pseudomonas sp.*: la síntesis de PHA a partir de las *Pseudomonas* pertenecientes al grupo de homología I de ARNr, como es el caso de la *P. oleovorans*, generalmente producen PHA de cadena media usando como sustrato algunos alcanos, alcoholes y alcanoatos conteniendo entre 6 y 14 átomos de carbono. Esta vía metabólica implica la formación del intermedio 3-hidroxiacil-CoA a través de la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, la mayor parte de las *Pseudomonas* fluorescentes del grupo de homología I de ARNr, excepto la *P. oleovorans*, son capaces de sintetizar también PHA de cadena media empleando como fuente de carbono carbohidratos. En este caso, el PHA es producido inicialmente conteniendo 3-hidroxi-alcanoato como monómero principal. Un ejemplo de los sustratos utilizados son la glucosa, la fructosa, el acetato, el glicerol o el lactato.

A diferencia de las bacterias productoras de PHA, las bacterias *E. coli* no son capaces de producir ni degradar PHA, son de crecimiento rápido (incluso a altas temperaturas) y la rotura de su pared celular es más sencilla (Reddy *et al.*, 2003). El rápido crecimiento de las bacterias permite la acumulación de altas cantidades de polímero, y por otro lado, la fácil rotura de la pared celular disminuye los costes de purificación de los gránulos de PHA (Madison y Huissman, 1999). La introducción de genes implicados en la acumulación perteneciendo a bacterias *R. eutropha* permitiría la síntesis de PHA por parte de bacterias *E. coli* lo que llevaría a una reducción de los costes de producción de PHA.

Las bacterias *P. oleovorans* son bacterias sintetizadoras de mcl-PHA. La introducción de plásmidos conteniendo genes procedentes de la *R. eutropha* en bacterias *P. oleovorans* permitiría la síntesis de mezclas conteniendo mcl- y scl-PHA dando lugar a polímeros de diversas propiedades físicas y mecánicas (Sudesh *et al.*, 2000).

1.3.2.1.1.3. Cultivos mixtos.

Un cultivo mixto es una población bacteriana de microorganismos de composición no definida y estructura determinada por las condiciones operacionales impuestas al sistema biológico. Las condiciones operacionales impuestas ejercerán una selección natural en los microorganismos permitiendo obtener una población capaz de efectuar transformaciones específicas de componentes intra- y extracelulares. La selección de un cultivo mixto productor de PHA viene dado por la imposición de condiciones que limitan el metabolismo primario.

Existen diversos mecanismos de selección de cultivos mixtos sintetizadores de PHA:

1. *Limitación externa del crecimiento celular* por limitación de un nutriente esencial para la síntesis de PHA, como es el caso de la limitación por oxígeno en sistemas anaerobios-aerobios (sistemas de eliminación de fósforo, EBPR), anóxico-aerobio (sistemas de nitrificación desnitrificación simultánea) y/o procesos microaerofílicos.

2. *Limitación interna del crecimiento* en condiciones de alimentación dinámica aeróbica (también conocido con las siglas ADF (aerobic dynamic feeding)).

Se sabe que los cultivos mixtos presentes en sistemas de tratamiento de agua pueden acumular PHA. Esta acumulación de PHA por cultivos mixtos cobra una gran importancia en aquellos sistemas de tratamiento en los que se experimentan condiciones variables de disponibilidad de algunos nutrientes como pueden ser el carbono y/o el oxígeno.

Algunos ejemplos de sistemas para la producción de PHA basados en la aplicación de condiciones variables de oxígeno son:

1. *Sistemas de eliminación de fósforo (EBPR)*. En este tipo de sistemas la biomasa es sometida a ambientes anaerobio y aerobio de forma continuada. Dos son los tipos de microorganismos sintetizadores de PHA que se pueden encontrar en estos sistemas, PAO (polyphosphate accumulating organism) y GAO (glycogen accumulating organism), sin embargo el rendimiento de producción de PHA en estos sistemas es bajo alcanzándose tan solo rendimientos del 20%. Algunos intentos realizados con el objeto de mejorar la producción de estos sistemas llevaron a la obtención de contenidos de PHA entre el 30-57%, sin embargo la capacidad de acumulación no era estable (Serafim *et al.*, 2008).
2. *Sistemas SND (Simultaneous nitrification denitrification)* en los que se alternan condiciones anóxicas y aerobias. En este tipo de sistemas, los PHA pueden actuar como agente reductor en la etapa de desnitrificación en ausencia de sustrato externo (Beun *et al.*, 2002; Third *et al.*, 2003b).
3. *Sistema microaerofílico/aerobio* propuesto por Satoh *et al.* (1998). Este proceso consta de dos fases. En una de ellas (fase microaerofílica) se introduce la cantidad justa de oxígeno para el mantenimiento celular, mientras que en la segunda fase (fase aerobia) el oxígeno no está limitado. De esta manera, en la primera fase, el crecimiento celular está limitado por la concentración baja de oxígeno quedando una mayor fracción de sustrato disponible para la síntesis de PHA. En la segunda fase el exceso de oxígeno en el medio favorece el crecimiento celular a partir de las reservas de PHA acumuladas durante la

primera fase del proceso. Los rendimientos de acumulación observados en estos sistemas son elevados, llegándose a alcanzar valores del 62%. Sin embargo, estos presentan el inconveniente de que con el paso del tiempo la biomasa pierde capacidad de sedimentación, observándose fenómenos de bulking. El proceso se desestabiliza en el tiempo (Punrattanasim, 2001).

La producción de PHA por cultivos mixtos es especialmente elevada cuando estos son sometidos a condiciones alternas de disponibilidad y no disponibilidad de carbono. Esta alternancia en la presencia y ausencia de carbono causa una respuesta dinámica en el metabolismo celular. Los organismos sometidos a estas condiciones experimentan lo que se conoce en la bibliografía como crecimiento desequilibrado: en un mismo ciclo la biomasa es expuesta a un exceso de sustrato durante la fase de alimentación y a un déficit del mismo durante la fase de reacción. Bajo estas condiciones los microorganismos no son capaces de adaptar su velocidad de crecimiento a las condiciones cambiantes dentro de la escala de tiempo del cambio. En principio, la respuesta microbiana frente a las condiciones dinámicas puede incluir varios fenómenos, en particular, crecimiento o almacenamiento de reservas internas. La respuesta más rápida es la acumulación de reservas ya que implica una menor adaptación fisiológica. En el caso de que la respuesta resultante sea la de acumulación, el sustrato es empleado en casi toda su totalidad (cerca del 70%) para acumulación de reservas, que en ausencia de sustrato, serán usadas como fuente de carbono y energía (Fig. 1.9.). De esta manera tiene lugar un desacoplamiento entre el consumo de sustrato y el crecimiento celular. Este proceso es reversible, de manera que si la exposición al sustrato es suficientemente larga tendría lugar la adaptación fisiológica de los microorganismos, convirtiéndose el crecimiento celular en el proceso dominante (Majone *et al.*, 1996).

En los procesos dinámicos (feast and famine), el aceptor de electrones usado para la oxidación de carbón puede ser tanto el oxígeno como el nitrato. Estudios llevados a cabo bajo condiciones aerobias o anóxicas han demostrado que el rendimiento es prácticamente igual para ambas situaciones, mientras que la velocidad de producción específica de PHA es mayor para la operación aeróbica. En términos de energía requerida para el proceso, el uso de condiciones anóxicas en lugar de aerobias resulta en un ahorro de energía (Reis *et al.*, 2003).

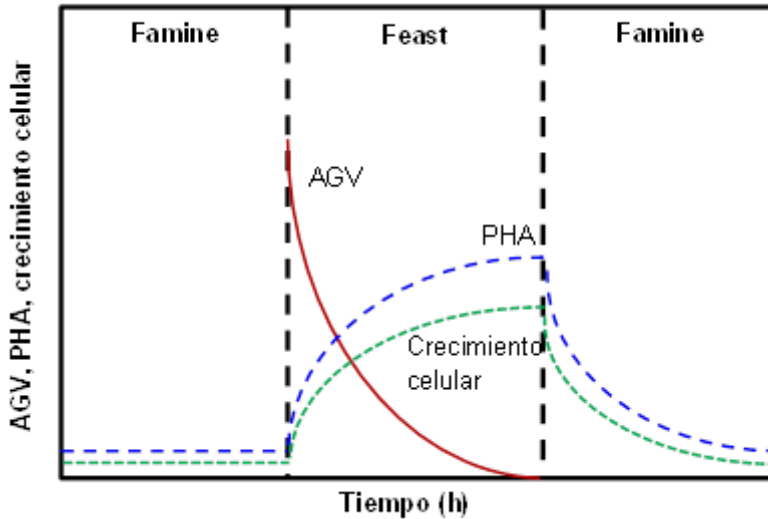


Fig. 1.9. Evolución del consumo de sustrato, producción y degradación de PHB y tasa específica de crecimiento celular para un sistema operado bajo condiciones ADF.

1.3.2.2. Estrategias de fermentación mediante el uso de cultivos mixtos.

La producción de PHA a partir de fermentación bacteriana empleando cultivos mixtos y sustratos sintéticos generalmente tiene lugar en un proceso en dos etapas con alimentación dinámica (alternando períodos de presencia y ausencia de sustrato); una fase de crecimiento inicial en un medio enriquecido en nutrientes para producir suficiente biomasa, seguido por una fase de formación de productos en un medio con limitación de nutrientes.

Entre los procesos descritos para la producción industrial de PHA empleando cultivos mixtos, el más prometedor es el conocido como “feast and famine” ya que permite obtener altas cantidades de PHA en célula y altas productividades. En este proceso, el reactor es alimentado de forma intermitente para, así, favorecer la capacidad de almacenamiento de PHA del lodo. Este proceso es, generalmente, llevado a cabo en reactores discontinuos secuenciales (SBR), ya que permiten obtener cultivos robustos con altas capacidades de almacenamiento. Otras ventajas de los SBR son su fácil manejo, y su alta flexibilidad permitiendo cambios rápidos en las condiciones operacionales (longitud del ciclo o de la etapa de alimentación) (Reis *et al.*, 2003). El uso de reactores continuos en la producción de PHA ha sido también propuesto por Albuquerque *et al.* (2010). En este caso, el sistema consta de dos

reactores conectados en serie: un reactor de flujo en pistón (PFR) simulando el período de feast y un reactor continuo (CSTR) imitando la etapa de famine, seguidos por un decantador. El efluente del PFR, conteniendo biomasa con un alto contenido en PHA, es dividido en dos corrientes: una encaminada al reactor CSTR y la otra hacia una etapa de saturación de las células en PHA.

El uso de residuos, en lugar de sustratos sintéticos, llevaría a la mejora del proceso, ya que se conseguiría un producto de valor en el mercado a partir de un material de desecho, disminuyéndose a su vez el precio de los PHA. En este caso, sería necesario incorporar una etapa previa (fermentación acidogénica) en el proceso que permita obtener, a partir del material de residuo, ácidos grasos volátiles (AGV) (precursores de la síntesis de PHA por cultivos mixtos). Majone *et al.* (1999) propone un proceso en tres etapas para la obtención de PHA a partir de agua residual el cual implica la combinación de tratamientos anaerobio (fermentación acidogénica) y aerobios (etapas de enriquecimiento y producción de PHA). El proceso emplea lodos activos con alta capacidad acumuladora operados bajo condiciones dinámicas y alimentados con agua residual con un alto contenido en AGV (efluente acidogénico).

Las principales ventajas que presenta este proceso son:

1. La disminución del exceso de lodos producidos en las plantas de tratamiento de aguas residuales y,
2. La transformación de un material de desecho (agua residual o residuo) en un producto de gran valor: polímeros biodegradables (PHA).

Asimismo, durante la producción de los ácidos grasos, se puede producir hidrógeno (subproducto generado en la fermentación acidogénica), el cual puede ser empleado como biogas para la obtención de energía.

Hasta el momento, los trabajos descritos en la bibliografía empleando agua residual como sustrato basan su estrategia de operación en este proceso en tres etapas (Albuquerque *et al.*, 2007; Coats *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2008; Salmiati *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2010; Ben *et al.*, 2011).

1.3.3. Extracción de PHA.

Otra de las etapas relevantes en la producción de PHA y que va a determinar en gran medida el precio final del producto es la etapa de recuperación. Para que el proceso de producción sea rentable es necesaria la extracción de la mayor cantidad de polímero posible el cual ha de presentar además una elevada pureza.

Las células productoras de PHA generalmente se caracterizan por presentar lisis de la pared celular difíciles lo que dificulta el proceso de extracción y de recuperación de los gránulos. Por otro lado, la mayor parte de los métodos de recuperación de PHA intracelular implican el uso de disolventes orgánicos (acetona, cloroformo, cloruro de metileno o dicloroetano) en grandes cantidades lo que hace que el procedimiento sea poco atractivo desde el punto de vista económico y medioambiental (Braunegg *et al.*, 1998).

Son varios los procesos de extracción propuestos en los últimos años. De esta manera, en la bibliografía, se pueden encontrar desde los métodos clásicos de extracción basados en la solubilidad del PHA en cloroformo y su insolubilidad en metanol, hasta métodos basados en la solubilización de todos los componentes celulares excepto el PHA mediante el empleo de mezclas de agentes surfactantes y enzimas (Doi, 1990).

Otras técnicas encontradas en la bibliografía son aquellas que emplean en la extracción una disolución alcalina de hipoclorito. Sin embargo, este proceso puede llevar a la degradación parcial del PHA como consecuencia de su hidrólisis (Lafferty *et al.*, 1988; Anderson y Dawes, 1990). El método se ve mejorado en gran medida cuando se incorpora cloroformo en el proceso, posiblemente debido a la rápida solubilización del PHA en este (Lee, 1996).

Más recientemente se ha hecho referencia al empleo de varios ácidos (HCl y H₂SO₄), álcalis (NaOH, KOH y NH₄OH) y surfactantes (sal dioctilsulfosuccinato sódica, bromuro de hexadeciltimetilamonio, dodecilsulfonato sódico, polioxietileno-p-ter octilfenol polioxietileno (20) sorbitan monolaurato) para la extracción de los PHA en la célula (Choi & Lee, 1999).

Otros métodos de extracción de los PHA son los basados en procesos mecánicos los cuales se pueden clasificar en dos tipos: los que emplean sólidos (molino de bolas) y los que emplean líquidos (homogenizador a alta presión). Dentro de este grupo también nos encontramos la extracción mediante baño de ultrasonidos o la centrifugación con tratamiento químico (Jackel *et al.*, 2008).

Más recientemente, la búsqueda de alternativas más baratas y menos contaminantes han llevado al desarrollo de técnicas como la extracción mediante el empleo de fluidos supercríticos (ejemplo el CO₂) o la solubilización de los componentes celulares que no son PHA mediante el empleo de protones (Dias *et al.*, 2008).

1.4. Referencias.

- Ahn, Y-H.; Min, K-S.; Speece, R. E.(2001). Full Scale UASB Reactor Performance in the Brewery Industry, *Environmental Technology*, **22** (4), 463-476.
- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Albuquerque, M. G. E.; Concas, S.; Bengtsson, S.; Reis, M. A. M., (2010). Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: the use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresourcetechnology*, **101** (18), 7112–7122.
- Almeida, A.; Ruiz, J. A.; López, N. I.; Pettinari, M. J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva*, **3**, 122-133.
- Ben, M.; Mato, T.; Lopez, A.; Vila, M.; Kennes, C.; Veiga, M. (2011). Bioplastic production using wood mill effluents as feedstock. *Water Science & Technology*, **63**(6), 1196-1202.
- Bengtsson, S.; Werker, A.; Christensson, M.; Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresourcetechnology*, **99** (3), 509-516.
- Beun, J. J.; Dircks, K.; van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J. (2002). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Research*, **36**, 1167-1180.
- Braunegg, G.; Gilles, L.; Genser, K.F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, **65**, 127-161.
- Brito, A. G.; Peixoto, J.; Oliveira, J. M.; K Oliveira, J. A.; Costa, C.; Nogueira, R., & Rodrigues, A. (2007). Brewery and winery wastewater treatment: some focal

points of design and operation. In *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry* (pp. 109-131). New York, NY: Springer.

Canales, C. (2005). *Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España del sector Cervecerero*. Centro de Publicaciones Secretaría General Técnica, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

Cerveceros de Espana y Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM). 2014. *Informe socioeconomico del sector de la cerveza en España*.

Choi, J. I.; yLee, S. Y. (1999). Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnology and Bioengineering*, **62**(5), 546-553.

Coats, E. R.; Loge, F. J.; Smith, W. A. Thompson, D. N.; Wolcott, M. P. (2007). Functional stability of mixed microbial consortium producing PHA from waste carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **136**, 909-925.

Cronin, C. y Lo, V. (1997). Anaerobic treatment of brewery wastewater using UASB reactors seeded with activated sludge. *Bioresource Technology*, **64**, 33-38.

Daigger, G. T. y Grady Jr, C. P. (1982). The dynamics of microbial growth on soluble substrates: a unifying theory. *Water Research*, **16**(4), 365-382.

Dias, J. M.; Lemos, P. C.; Serafim, L. S.; Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., Reis, M. A. M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromolecular bioscience*, **6**(11), 885-906.

Doi, Y. (1990). *Microbial Polyesters*. VCH Publisher, Inc., New York.

Driessen W y Vereijken T. (2003). Recent developments in biological treatment of brewery effluent. In: *The Institute and Guild of Brewing Convention*. Livingstone, Zambia.

- Fillaudeau L.; Blanpain-Avet P.; Daufin G. (2006). Water, wastewater and waste management in brewing industries. *Journal of Cleaner Production*, **14**, 463-471.
- Formolo, M. C.; Duarte, M. A. T., Schneider, A. L.; Burlan, S. A.; Pezzin, A. P. T. (2003). Poliídrolxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renovaveis. *Health and Enviroment Journal*, **4**, 14-21.
- Gangagni, R.; Reey, T.S.K.; Prakash, S.S.; Vanajakshi, J.; Joseph, J.; Sarma, P.N. (2007). pH regulation of alkaline wastewater with carbon dioxide: a case study of treatment of brewery wastewater in UASB reactor coupled with absorber. *Bioresource Technology*, **98**, 2131-2136.
- Grothe, E.; Moo-Young, M.; Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of Poly(β -hidroxibutírico ácido) microbial thermoplástico. *Enzime and Microbial Technolgy*, **25**, 132-141.
- Ince, O.; Basak, B.; Ince, B. K.; Cetecioglu, Z.; Celikkol, S.; Kolukirik, M. (2011). Effect of nitrogen deficiency during SBR operation on PHA storage and microbial diversity, *Enviromental Technology*, DOI: 10.1080/09593330.2011.634441.
- Jacquel, N.; Lo, C. W.; Wei, Y. H.; Wu, H. S.; Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly (3-hidroxialcanoatos). *Biochemical Engineering Journal*, **39**(1), 15-27.
- Keshavarz, T. y Roy, I. (2010). Polyhidroxialcanoatos: bioplásticos with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 321–326
- Kessler, B. y Witholt, B. (2001). Factors involved in the regulatory network of polyhidroxialcanoato metabolismo. *Journal of Biotechnology*, **86**, 97-104.
- Khanna, S.; Srivastava, A. K. (2003). Recent advances in microbial polyhidroxialcanoatos. *Process Biochemistry*, **40**, 607-619.

- Lafferty, M. R.; Korsato, B.; Korsato, W. (1988). Microbial production of poly- β -hidroxybutyric acid. In: *Biotechnology* (eds. H. J. Rehm and G. Reed), Vol. 6B, *Special Microbial Processes*, pp. 136-176. UCH, Weinheim, Germany
- La Mantia, F. P. (Ed.). (1993). Recycling of plastic materials. ChemTec Publishing.
- Leal, K.; Chacin, E.; Behling, E.; Gurierrez, E.; Fernandez, N.; Forster, C.F. (1998). A mesophilic digestión of brewery wastewater in an unheated anaerobic filter, *Bioresource Technology*, **65**, 51-55.
- Lee S. Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, 1-14.
- Lee, S. Y.; Choi, J.; Wong, H. H. (1999). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **25**, 31-36.
- Lemos P. C.; Serafim, L. S.; Ramos, A. M.; Reis, M. A. M. (2004). Capítulo 20: Bioplasticis from wate materials. In: *Resource recovery and reuse in organic solid waste management*. (Eds Lens, P., & Lens, P. N.) IWA Publishing. London
- Li, P. y Mulligna, C. N. (2004). Anaerobic treatment of waste Beer. *Enviromental Progress*, **24** (1), 88-95.
- Ling, L. y Lo; K.V. (1999). Brewery wastewater treatment using suspended and attached growth sequencing batch reactors. *J. Environ. Sci. Health*, **34**(2), 341-355.
- Loo C-H y Sudesh K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, **2**(2), 31-57.
- Madison, L. L. y Huissman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 21-53.

- Majone, M.; Masanisso, P.; Carucci, A.; Lindera, K., Tandoi, V. (1996). Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology*, **34**, 223-232.
- Majone, M.; Ramadori, R.; Beccari, M. (1999). Biodegradable polymers from waste by using activated sludges enriched by aerobic periodic feeding. AIDIC Conf Ser, **4**, 163-170.
- Martínez Martínez-Espejo, R. (2010). Descontaminación de efluentes de la industria cervecera mediante el uso de membranas UF arrolladas en espiral como barrera de seguridad. *Tesis doctoral*.
- Mato, T.; Ben, M.; Kennes, C.; Veiga, M. (2010). Valuable product production from wood mill effluents. *Water Science & Technology*, 62(10), 2294-2300.
- Min, B., Angelidaki, I., (2008). Innovative microbial fuel cell for electricity production from anaerobic reactors. *Journal of Power Sources*, **180**(1):641-647. [doi:10.1016/j.jpowsour.2008.01.076]
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM). Disponible en:<http://www.marm.es>.
- Öktem, Y. y Tüfekçi, N. (2006). Treatment of brewery wastewater by pilot scale upflow anaerobic sludge blanket reactor in mesophilic temperature. *Journal of Scientific & Industrial Research*, **65**, 248-251.
- Parawira, W.; Kudita, I.; Nyandoroh, M.G.; Rvauya, R. (2005). A study of industrial anaerobic treatment of opaque beer brewery wastewater in a tropical climate using a full-scale UASB reactor seeded with activated sludge. *Process Biochemistry*, **40**, 593-599.
- Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **82**, 233–247.

- Reddy, C. S. K.; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, **87**, 137-146.
- Reis, M. A. M.; Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Ramos, A. M.; Aguiar, F. R.; Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **25**, 377-385.
- Rodrigues, A. C.; Brito, A. G., Melo, L. F. (2001). Posttreatment of a brewery wastewater using a Sequencing Batch Reactor, *Water Environmental Research*, **73** (1), 45-51.
- Salmiati, Z.; Ujang, M. R.; Salim, M. F.; Din, Md and Ahmad, M. A. (2007). Intracellular biopolymer productions using mixed microbial cultures from fermented POME. *Water Science and Technology*, **56** (8), 179-185.
- Satoh, H.; Iwamoto, Y.; Mino, T.; Matsuo, T. (1998). Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic. *Water Science and Technology*, **37**, 579-582.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Albuquerque, M. G.; Reis, M. A. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology*, **81**(4), 615-628.
- Shao, X.; Peng, D.; Teng, Z.; Ju, X. (2008). Treatment of brewery wastewater using anaerobic sequencing batch reactor (ASBR). *Bioresource Technology*, **99**(8), 3182-3186.
- Stein, R.S. (1992). Polymer recycling: opportunities and limitations. *Proceedings of the. Natural Academy of Science.*, USA **89**, 835-838.
- Steinbüchel, A. (2001). Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience*, **1**(1), 1-24.

- Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates biological polyesters. *Progress on polymer science*, **25**, 1503-1535.
- Sudesh, K. y Doi, Y. (2000). Molecular design and biosynthesis of biodegradable polyesters. *Polymers for Advanced Technologies*. **11**, 865-872.
- Suriyamongkol, P.; Weselake, R.; Narine, S.; Moloney, M.; Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganism and plants- A review. *Biotechnology Advance*, **25**, 148-175.
- Third, A. K.; Burnett, N.; Cord-Ruwisch, R. (2003). Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in an SBR. *Biotechnology and Bioengineering*, **83** (6), 706-720.
- Verlinden, R. A. J.; Hill, D.J.; Kenward, M. A., Williams, C. D. and Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 1-13.
- Wang, X.; Feng, Y.J.; Lee, H., (2008). Electricity production from beer brewery wastewater using single chamber microbial fuel cell. *Water Science and Technolgy.*, **57**(7):1117-1121. [doi:10.2166/wst.2008.064]
- Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M., Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue I. *issue engineering. Biological Macromolecules*, **25**, 111-121.
- Young-ho, A.; Min, K-S.; Speece, R.E. (2001). Pre-acidification in anaerobic sludge bed process treating brewery wastewater. *Water Research*, **35** (18), 4267-4276.
- Yu, H. y Gu, G. (1996). Biomethanation of brewery wastewater using an anaerobic upflow blanket filter. *Journal of Cleaner Production*, **4** (3-4), 219-223.
- Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical applications of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Advanced Drug Delivery views*, **53**, 5-21.

2. Materiales y métodos

2.1. Métodos analíticos.

En este capítulo se detallan las diferentes metodologías de trabajo empleadas para el análisis de los diferentes parámetros de interés durante la investigación. De la misma manera, también se describen los reactores así como los diferentes ensayos realizados a lo largo del trabajo recogido en dicho documento.

Los análisis que requieren de recta de calibrado para la determinación cuantitativa van acompañados de una de ellas, representativa de las realizadas durante el período de trabajo aquí recogido. El método de ajuste empleado en los distintos casos es el de mínimos cuadrados, realizando todos los calibrados con el método de patrones externos.

2.1.1. Determinación de sólidos en suspensión totales y volátiles (SST y SSV).

La determinación de sólidos se realizó según el método descrito en “Standard Methods” (APHA, 1998).

Un volumen de muestra conocido es filtrado a vacío sobre filtros de fibra Whatman (tamaño de poro de 1,2 μm), previamente calcinados y secados hasta peso constante (P_0). El filtro con el residuo se seca a 110 °C hasta peso constante (P_1) y la diferencia entre P_1 y P_0 representa los sólidos en suspensión totales (SST). Posteriormente, los filtros son calcinados a 550 °C hasta peso constante (P_2) y la diferencia entre este peso (P_2) y el peso del filtro conteniendo el residuo seco (P_1) representa los sólidos en suspensión volátiles (SSV). Cada medida se realizó por duplicado.

2.1.2. Determinación de amonio (NH_4^+).

Para la determinación de amonio se empleó un método colorimétrico basado en la reacción del NH_4^+ con hipoclorito y fenol en medio alcalino, mediante la cual se obtiene un complejo coloreado (azul de indofenol), cuya absorbancia se mide a 635 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 11 UV/VIS). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Dada la inestabilidad de los reactivos, estos fueron preparados semanalmente, al igual que la recta de calibrado la cual presentó en todos los casos un rango lineal de 0 a 1,4 mg N/L (Fig. 2.1)

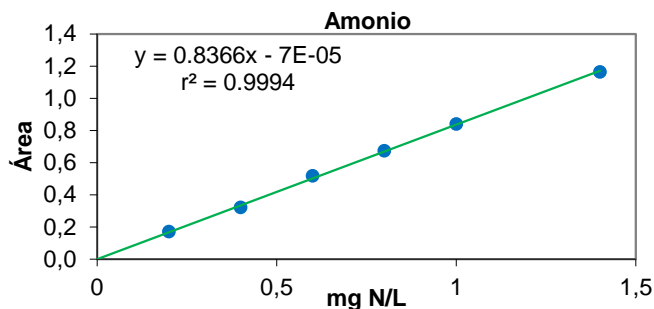


Fig. 2.1. Calibrado de amonio con método espectrofotométrico.

2.1.3. Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes.

Los ácidos grasos volátiles y los alcoholes fueron determinados por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatógrafo Hewlett Packard Serie 1100 equipado con una columna Supelcogel C-610H. La separación de los componentes de la muestra se basa en la exclusión por tamaño molecular. Como fase móvil se empleó H_3PO_4 0,1%, con un flujo de 0,5 mL/min. La temperatura del horno se fijó en 30°C y el volumen de muestra inyectado fue de 10 μ L. La detección de los ácidos grasos se llevó a cabo por absorción de los compuestos en la región ultravioleta (UV), a 210 nm. La identificación de cada ácido se hizo en función de su tiempo de retención (acetato a 20,6 min, propionato a 24,6 min, butirato a 31,1 min, iso-valerato a 37,1 y n-valerato a 46,5 min). Mientras que para la detección de los alcoholes se hizo uso de un detector de índice de refracción (IR), siendo identificados también por el tiempo de retención (etanol a 27,5 min). Para su cuantificación se empleó una recta de calibrado en el rango de 0-3000 ppm (Fig. 2.2 y Fig. 2.3)

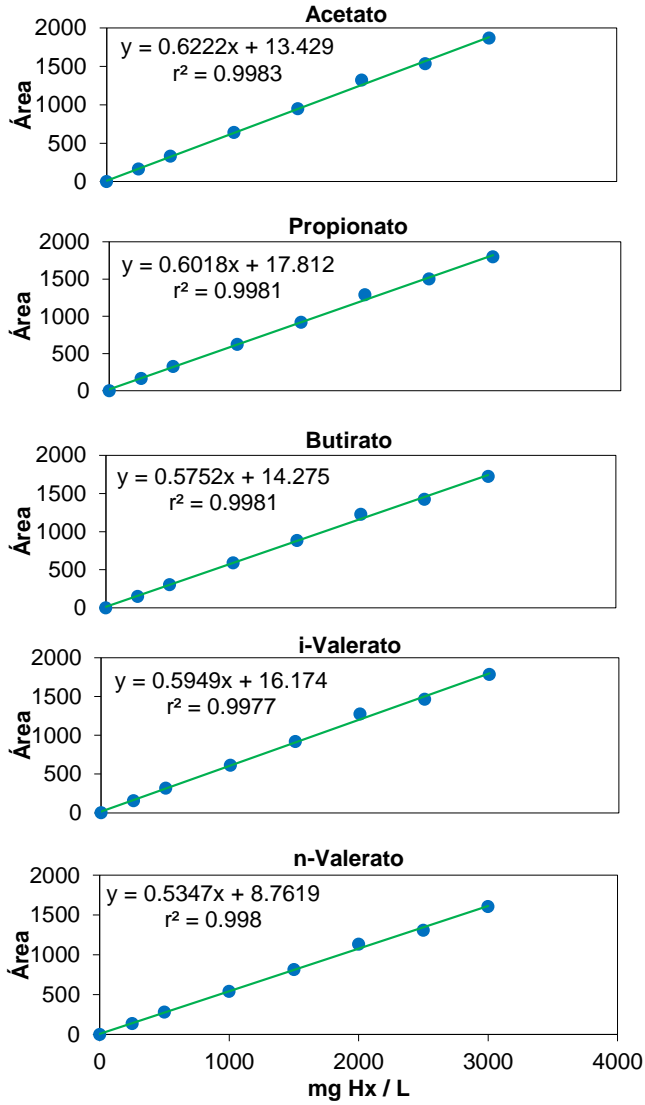


Fig. 2.2. Calibrado de ácidos grasos por HPLC.

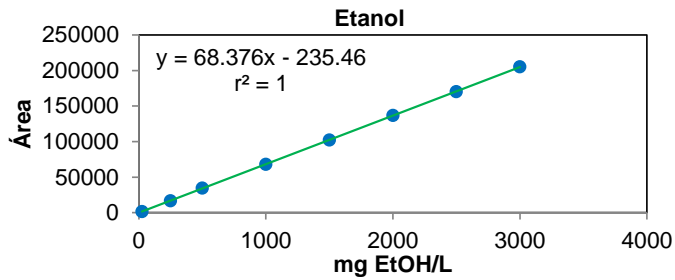


Fig. 2.3. Calibrado de EtOH por HPLC.

2.1.4. Determinación de azúcares.

La determinación de azúcares se hizo siguiendo el método propuesto por Dubais *et al.* (1956), mediante el cual los carbohidratos reaccionan con una disolución de fenol al 5% en medio ácido para dar un compuesto coloreado de color amarillo-naranja. La determinación es espectrofotométrica siendo empleado un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11 UV/VIS y la longitud de onda seleccionada fue de 490 nm. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

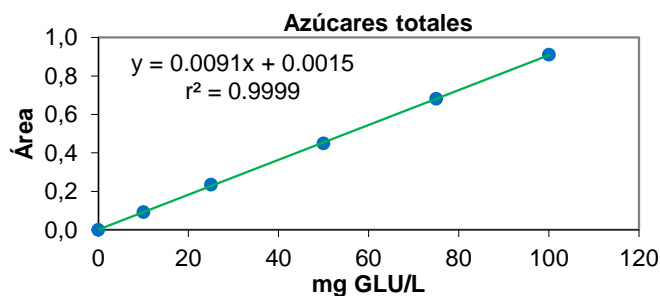


Fig. 2.4. Calibrado de azúcares totales.

2.1.5. Determinación del Nitrógeno Kjeldahl (NTK).

El término nitrógeno Kjeldahl incluye el nitrógeno amoniacal y los compuestos orgánicos nitrogenados (excepto las formas azida, azo, hidrazona, nitrito, nitrato, nitrilo, nitroso, oxima o semicarbazona).

La muestra es digerida en caliente con una mezcla de $H_2SO_4:H_3PO_4$ (9:1), utilizando selenio como catalizador y una mezcla de $CuSO_4$ y K_2SO_4 para elevar el punto de ebullición de la mezcla líquida. Durante la digestión, el H_2SO_4 se reduce a SO_2 y H_2O , mientras el carbono e hidrógeno presentes en la materia orgánica de la muestra se oxidan a CO_2 y H_2O , y el nitrógeno se transforma en sales de amonio. A continuación se lleva a cabo la destilación de la muestra digerida, durante la cual se añade $NaOH_{(c)}$ para convertir el NH_4^+ en NH_3 , facilitando su desorción y arrastre por la fase vapor. El destilado se valora con una disolución de HCl de concentración conocida, empleando como indicador una mezcla de verde de bromocresol y naranja de metilo.

2.1.6. Determinación de fosfato (PO_4^{3-}).

Se utilizó un método colorimétrico, mediante el cual se hace reaccionar el fósforo con una disolución de molibdato amónico, obteniéndose ácido molibdofosfórico, que al ser reducido con cloruro estagnoso forma un complejo de color azul (azul de molibdeno), cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente a 690 nm (Perkin Elmer Lambda 11 UV/VIS). Cada determinación se realizó por duplicado.

En la Fig. 2.5. se muestra una recta de calibrado representativa de las medidas realizadas durante este estudio.

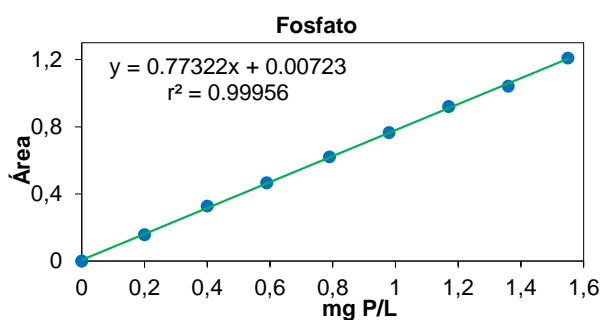


Fig. 2.5. Calibrado para la determinación de fosfato.

2.1.7. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

Se define como la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica y los compuestos químicamente oxidables de un agua. La medida de este parámetro se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en "Standard Methods" (APHA, 1998). Las muestras son digeridas durante dos horas a 150 °C, utilizando una disolución de dicromato potásico y ácido sulfúrico como oxidante, sulfato de plata como catalizador y sulfato de mercurio para eliminar las interferencias del ión cloruro. El exceso de dicromato se valora con sulfato ferroso amónico (FAS) de concentración conocida. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y en presencia de un blanco de digestión.

2.1.8. Determinación de polihidroxialcanoatos (PHA).

En la determinación de PHA se empleó cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama (FID), de acuerdo con el método propuesto por Braunegg *et al.* (1978) y Comeau *et al.* (1988) con ligeras modificaciones introducidas por Satoh *et al.* (1992). El método consiste en la rotura de las estructuras celulares, con la hidrólisis de las cadenas de PHA y posterior esterificación (metilación) de los monómeros obtenidos.

Se centrifugan 1,5 ml de suspensión celular y la fase sólida, después de su liofilización, se resuspende en 1 ml de metanol acidificado (20 % de H₂SO₄). A esta mezcla se le añade 1 ml de cloroformo conteniendo 0,8 g/L de patrón interno (n-decano). El cloroformo no debe estar estabilizado con etanol, ya que sino, además de la metilación de los monómeros, una pequeña parte de estos serían etilados. El medio se introduce en un reactor de calor seco a 100°C durante 3 horas y media, en frascos estancos. Después de que se enfríen, se procede a la extracción de los monómeros metilados. Para ello se añaden 0,5 ml de agua destilada y se agita la mezcla en vórtex, favoreciéndose el paso de dichos monómeros a la fase orgánica. Cuando ambas fases líquidas están completamente separadas, se recoge la fase orgánica con ayuda de una pipeta, y se adiciona en los viales de cromatografía conteniendo filtros moleculares (Merk, con diámetro de 0,3 nm), para la completa eliminación del agua.

El equipo empleado fue un cromatógrafo gas-líquido Focus de Thermo, dotado de un detector de llama (FID). Como fase estacionaria se empleó una columna SPB-1 de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro externo, con un relleno de 0,25 µm de grosor. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 220 °C. Se estableció un programa de temperaturas para el horno, comenzando en 40 °C y aumentando 30 °C/min hasta 50 °C (tiempo 2 min), a continuación se aplicó una rampa de 8 °C/min hasta 160 °C (tiempo 7 min), para finalmente aumentar la temperatura hasta 220 °C con una rampa de 30 °C/min permaneciendo con esta temperatura 7 min (tiempo total: 32,08 min). Como gas portador se utilizó Helio, con un caudal de 2 ml/min. Se trabajó en modo splitless. La inyección se realizó con un inyector automático AI 3000, siendo inyectado 1 µl de muestra.

Para la determinación de PHA procedente del reactor operado con medio sintético, conteniendo acetato como única fuente de carbono, se empleó un patrón de P(HB/HV) (0,95:0,05) Sigma-Aldrich, mientras que para la medida de los PHA generados en los reactores operados con agua real se empleó un patrón P(HB/HV) (0,88:0,12). Se efectuó una curva de calibrado con diez patrones. Los patrones (obtenidos a partir de una disolución madre conteniendo aproximadamente 3 mg/ml de polímero) sufrieron el mismo procedimiento que las muestras: hidrólisis, metilación y extracción. Para determinar la concentración de PHB y PHV en las muestras se utilizó el método de patrones externos con correcciones mediante un patrón interno (n-decano). La recta de calibrado se obtuvo a partir de la correlación directa entre las áreas de los picos de cada monómero y el área del pico del patrón interno, y las razones de las respectivas concentraciones (Fig. 2.6).

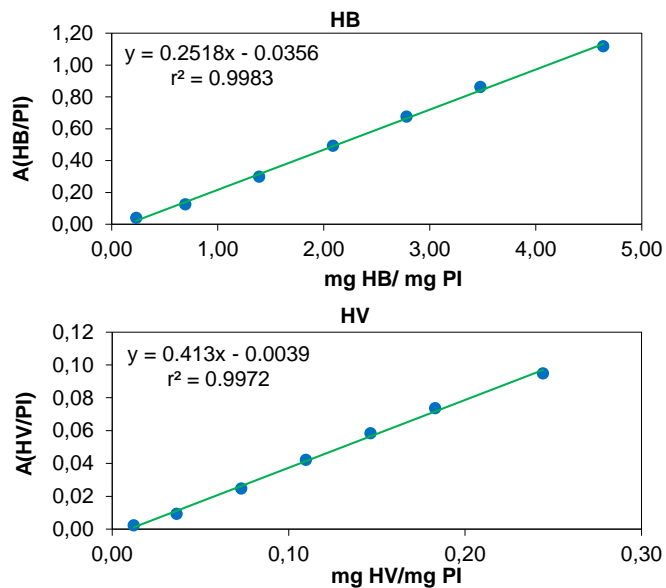


Fig. 2.6. Calibrado de PHA por el método del patrón interno.

2.2. Sistema.

2.2.1. Fermentación acidogénica.

2.2.1.1. Inóculo.

Como inóculo inicial se empleó un cultivo mixto anaerobio el cual fue enriquecido en bacterias acidogénicas en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR), alimentado en continuo con agua residual de la industria cervecera (apartado

2.2.1.2.). La aclimatación del lodo tuvo lugar a un pH de 6,5 y a una temperatura de 30°C.

Las condiciones operacionales empleadas en esta etapa de enriquecimiento se describen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Parámetros operacionales durante el enriquecimiento del lodo acidogénico.

Parámetros	Valor	Unidades
Volumen del reactor (V_{RX})	1,6	L
Sólidos en suspensión volátiles (SSV_0)	7	g/L
Temperatura (T)	30	°C
pH	6,5	-
Tiempo de retención hidráulica (TRH)	1,2	d

2.2.1.2. Medio de cultivo.

Como sustrato de la etapa acidogénica se empleó agua residual de cervecera. Este tipo de efluentes se caracterizan por poseer un alto contenido de materia orgánica biodegradable, así como sólidos en suspensión y un bajo contenido de nutrientes. El pH del agua suele ser ácido, aunque este es muy variable pudiendo presentar valores de pH básico. Esta variación del pH va a venir determinado por la etapa de producción que se esté llevando a cabo.

2.2.1.3. Reactor acidogénico.

La fermentación de un efluente residual de cervecera se llevó a cabo en un reactor acidogénico de tanque agitado conectado a un decantador (Fig. 2.7). El reactor se operó a una velocidad de carga orgánica (VCO) de 3300-4900 mg DQO/L·d, lo que se correspondió con un tiempo de retención hidráulico (TRH) situado entre 0,9-1,4 d y a un caudal de 1,8-2,9 L/d. Se controlaron tanto el pH como la temperatura del reactor. El pH se controló a un valor de 6,2, considerado como el óptimo para la fermentación de esta agua, mediante la adición de NaOH 2 M. La temperatura fue controlada a 37 °C mediante el empleo de una cámara termostatzada.



Fig. 2.7. Reactor acidogénico.

2.2.2. SBR operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica (ADF) y medio sintético

2.2.2.1. Inóculo.

Como inóculo se empleó un cultivo procedente del reactor aerobio de una planta depuradora de aguas residuales urbanas, caracterizada por tratar agua residual urbana conteniendo una pequeña fracción de agua industrial.

2.2.2.2. Medio de cultivo.

Para la aclimatación del lodo se empleó un medio sintético cuya composición es presentada en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Composición del medio sintético empleado en el enriquecimiento del lodo.

Medio básico		Solución mineral	
composición	Conc.	composición	Conc.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g/L	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,5 g/L
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,14 g/L	H ₃ BO ₃	0,15 g/L
EDTA	0,12 g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15 g/L
Solución mineral	4 mL/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,12 g/L
Solución sales fósforo		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,06 g/L
composición	Conc.	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03 g/L
K ₂ HPO ₄	0,184 g/L	KI	0,03 g/L
KH ₂ PO ₄	0,09 g/L		

Como sustrato (fuente de carbono) se empleó acetato sódico a una concentración de 4,08 g CH₃COONa·3H₂O/L y como fuente nitrogenada se utilizó NH₄Cl, para una concentración de 0,16 g/L.

2.2.2.3. SBR aerobio.

La selección de un cultivo mixto con capacidad acumuladura tuvo lugar en un reactor secuencial (SBR) (Fig 2.8.) de 1,5 L de volumen útil, operado bajo condiciones ADF con un ciclo de 12 horas repartidas en tres etapas: aerobiosis o fase aerobia (11 horas), decantación (0,8 horas) y vaciado (0,2 horas). La adición de medio fresco conteniendo sustrato y nutrientes tenía lugar en los primeros dos minutos de la fase aerobia.

Las condiciones operacionales empleadas se describen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones operacionales durante el enriquecimiento del lodo aerobio.

Parámetros	Valor	Unidades
Volumen del reactor (V _{Rx})	1,5	L
Sólidos en suspensión volátiles (SSV ₀)	2	g/L
Temperatura (T)	Sin control	°C
pH	Sin control	-
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	1	d
Tiempo de retención de sólidos (TRS)	10	d
Flujo de aireación	1,5	ml/min



Fig. 2.8. SBR operado bajo condiciones aeróbicas de alimentación dinámica alimentado con medio sintético.

2.2.3. SBR aerobio operado bajo condiciones ADF y agua residual.

2.2.3.1. Inóculo.

Para la realización del estudio se empleó el cultivo mixto previamente enriquecido en bacterias productoras de PHA en el SBR operado bajo condiciones ADF y alimentado con medio sintético (apartado 2.2.2.3.).

2.2.3.2. Medio de cultivo.

Para la realización del proceso, el reactor SBR fue alimentado con agua residual de cerveza fermentada en el reactor acidogénico descrito anteriormente (apartado 2.2.1.3).

2.2.3.3. SBR operado con agua real.

Para la aclimatación de los lodos con capacidad para almacenar PHA al agua residual, se empleó un reactor SBR (Fig. 2.9.), con un volumen útil de 1L. El reactor fue operado con un ciclo de 12 horas compuesto de las siguientes etapas: aireación (11 h), decantación (0,8 h) y vaciado (0,2 h). El medio descargado fue reemplazado por medio fresco durante los primeros dos minutos de la fase de aireación. El reactor fue alimentado con agua residual de cerveza fermentada suplementada con cloruro de amonio y en ocasiones con fósforo y AGV para obtener unas condiciones

determinas al comienzo del ciclo. La nitrificación fue inhibida mediante la adición de tiourea a una concentración de 0,01 g/L. El flujo de aire fue mantenido constante para un valor de 1 L/min durante toda la operación del reactor resultando en una velocidad de flujo de aire de $1 \text{ L}_{\text{aire}}/\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{min}$ (vvm). El pH no fue controlado en ninguno de los ensayos.

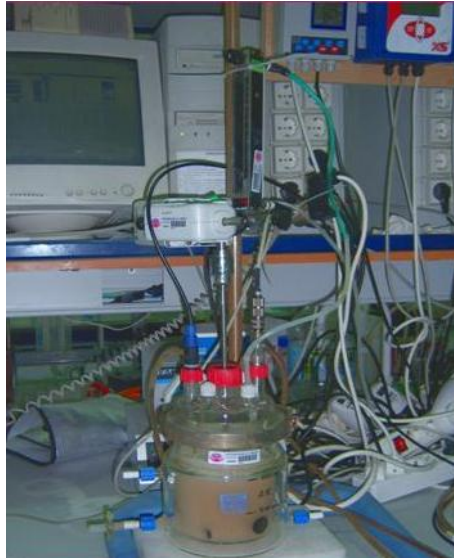


Fig. 2.9. SBR operado bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica alimentado con agua real.

Las condiciones operacionales empleadas en los diferentes ensayos descritos en este documento son descritas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Parámetros operacionales de los diferentes ensayos realizados en el reactor continuo operado con agua real.

Parámetro	Valor	Uds.
<i>Aclimatación al agua real</i>		
Velocidad de carga orgánica	60	Cmmol/L-d
Temperatura	Sin control	°C
Tiempo de retención hidráulica	1	d
Tiempo de retención de sólidos	10	d
<i>Efecto de la VCO- condiciones limitantes para el crecimiento celular</i>		
Velocidad de carga orgánica	40-80	Cmmol/L-d
Temperatura	Sin control	°C
C/N/P	250/20/1-517/34/1	
Tiempo de retención hidráulica	1	d
Tiempo de retención de sólidos	6	d
<i>Efecto de la VCO- condiciones no limitantes del crecimiento celular</i>		
Velocidad de carga orgánica	100-140	Cmmol/L-d
Temperatura	30	
C/N/P	11/2/1-16/2/1	°C
Tiempo de retención hidráulica	1	d
Tiempo de retención de sólidos	6	d
<i>Efecto del TRS- condiciones limitantes para el crecimiento celular</i>		
Velocidad de carga orgánica	50	Cmmol/L-d
Temperatura	30	°C
C/N/P	281/12/1-304/16/1	
Tiempo de retención hidráulica	1	d
Tiempo de retención de sólidos	3,5-6	d
<i>Efecto del TRS- condiciones no limitantes del crecimiento celular</i>		
Velocidad de carga orgánica	100	Cmmol/L-d
Temperatura	30	°C
C/N/P	9/2/1-18/2/1	
Tiempo de retención hidráulica	1	d
Tiempo de retención de sólidos	1-10	d

2.2.3.4. Ensayos discontinuos.

El estudio del efecto de los diferentes parámetros en la etapa de acumulación de PHA (concentración de nitrógeno, velocidad de flujo de aire, concentración de sustrato, pH y temperatura) se realizó en un reactor con un volumen útil de 0,6 L (Fig. 2.10). El inóculo empleado para estos estudios procedió del reactor SBR previamente descrito (apartado 2.2.3.3.). Las condiciones operacionales empleadas fueron las

mismas que aquellas usadas durante la selección del lodo. Para las medidas de velocidad de consumo de oxígeno (OUR) se conectó un respirómetro al reactor donde se introdujo el oxímetro, haciendo recircular la biomasa a alta velocidad por el mismo.



Fig. 2.10. Sistema empleado para realizar ensayos discontinuos.

2.2.3.5. Ensayos fedbatch.

Durante la optimización de la etapa de enriquecimiento de lodo, para comprobar la capacidad acumuladora del lodo seleccionado, una vez que la operación del reactor fue estable en el tiempo, éste se alimentó en un modo discontinuo. Estos ensayos fueron realizados sin la adición de amonio ni de fósforo y con una concentración inicial de sustrato de 50 Cmmol/L. Las condiciones operacionales empleadas fueron las mismas que aquellas usadas durante la selección del lodo.

2.3. Caracterización de los plásticos.

2.3.1. Composición del polímero.

La composición del polímero fue determinada mediante cromatografía de gases (CG) siguiendo el método descrito por Braunegg *et al.* (1978) con modificaciones introducidas por Comeau *et al.* (1988) y Satoh *et al.* (1992) (ver apartado 2.1.8.). Las concentraciones de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV) fueron determinadas mediante el empleo de una recta de calibración obtenida con un patrón de P(HB/HV) (88%/12%) corregida por un patrón interno (n-decano).

2.3.2. Extracción y recuperación del polímero.

La extracción de los polímeros fue realizada mediante el lavado de la biomasa con acetona para la eliminación de las impurezas y su posterior extracción con cloroformo.

El lavado tuvo lugar mediante la centrifugación del lodo para eliminar el sobrenadante y la redispersión del pellet en acetona. Esta operación fue repetida hasta que la acetona descartada tras el lavado no presentó color.

El pellet lavado se secó a 102°C y se redispersó en cloroformo. El plástico fue extraído mediante la agitación vigorosa en un frasco sellado durante varios días para favorecer la rotura de la estructura celular y la disolución del plástico en cloroformo.

Para la recuperación del plástico, el extracto de cloroformo fue filtrado a través de filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,45 µm y evaporado.

2.3.3. Propiedades térmicas.

Las temperaturas de transición (la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de cristalización (T_c) y la temperatura de fusión (T_m)) y las entalpías de transición (entalpía de cristalización (ΔH_c) y entalpía de fusión (ΔH_m)) fueron analizadas mediante calorimetría diferencial de barrido (TA Instruments Q2000 TMDSC), empleando cápsulas de aluminio y un flujo de nitrógeno de 50 ml/min. Las rampas de temperatura de calentamiento y enfriamiento aplicadas fueron todas de 10°C/min. Durante el ensayo la muestra fue previamente calentada hasta 190°C para eliminar su historia térmica. El ciclo de temperaturas al que se sometió la muestra fundida fue: enfriamiento hasta -65°C, calentamiento hasta 190°C y finalmente, enfriamiento hasta -65°C.

La temperatura de descomposición (T_d) fue analizada mediante análisis termogravimétrico (TGA) (Rheometric STA 1500), siendo empleada una atmósfera de nitrógeno. Durante el ensayo, la temperatura fue aumentada a una velocidad de

10°C/min hasta los 575°C. La temperatura de descomposición fue determinada mediante la observación de pérdida de peso del polímero.

2.4. Cálculos.

2.4.1. Fermentación acidogénica.

El porcentaje de conversión de la materia orgánica en AGV fue calculado como $(AGV \text{ (mg DQO}_{\text{efluente}}/\text{DQO}_{\text{influyente}}) \cdot 100$. La concentración total de AGV se correspondió con la suma de las concentraciones de acetato, propionato, butirato, i-valerato y n-valerato.

2.4.2. Etapa aerobia.

El contenido de PHA en el lodo fue determinado como la fracción de PHA en base a la biomasa ($\%PHA = PHA \cdot 100 / SSV$; la concentración de PHA y SSV en g/L). La concentración de biomasa consistió en la suma del contenido de PHA y la biomasa activa ($SSV = PHA + X$; donde X representa la biomasa activa). La biomasa activa fue calculada considerando que todo el amonio fue empleado únicamente para crecer.

La velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$) (Cmmol AGV/CmmolX·h), la velocidad específica de consumo de amonio ($-q_N$) (Nmmol/CmmolX·h) y la velocidad específica de producción de polímero (q_P) (Cmmol HA/CmmolX·h) fueron calculadas por el ajuste lineal de los datos experimentales, determinando la primera derivada (pendiente de la recta) y dividiendo por la biomasa activa en este punto (punto cero). La concentración de PHA se correspondió con la suma de monómeros de PHB y PHV, respectivamente.

Los rendimientos de almacenamiento de PHA (Y_{STO}) y de crecimiento (Y_{GROWTH}) en base al sustrato consumido fueron calculados como la relación entre la cantidad total de polímero o biomasa formada y la cantidad total de sustrato consumido. La producción específica de PHA (Δf_{PHA}) fue determinada mediante la resta de la concentración inicial específica de PHA y la final (Cmmol HA/Cmmol X).

2.5. Referencias.

- APHA-AWWA-WPCF (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed., Washington DC, USA.
- Braunegg, G.; Sonnleitner, B.; Lafferty, R.M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of polyhydroxybutiric acid in microbial biomass, *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, **6**, 29-37.
- Comeau, Y.; Hall, K.J.; Oldham, W.K. (1988). Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography, *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(9), 2325-2327.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analitical Chemistry*, **28** (3), 350-356.
- Satoh, H.; Mino, T.; Matsuo, T. (1992); Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes, *Water Science and Technology*, **29**, 933-949.

3. Enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras

3.1. Resumen.

En los últimos años, la producción de PHA a partir de aguas residuales usando cultivos mixtos ha centrado la atención de los investigadores en este campo. Los rendimientos obtenidos con cultivos mixtos hasta el momento son más bajos que aquellos alcanzados con cultivos puros, aunque recientemente se han encontrado cultivos mixtos enriquecidos con una elevada capacidad de acumulación de PHA.

Aunque se sabe que gran cantidad de bacterias son capaces de acumular PHA como reservas internas, la cantidad almacenada es variable dependiendo de las diferentes especies. La etapa de enriquecimiento de estos cultivos mixtos en bacterias con alta capacidad acumuladora de PHA se hace necesaria para la obtención de altos rendimientos en este proceso.

El empleo de cultivos mixtos para la acumulación de PHA precisa de una estimulación mediante la imposición de condiciones cambiantes de alimentación de sustrato; cortos períodos de exceso de carbono alternados con largos períodos de ausencia de carbono. Cuando los microorganismos son sometidos a condiciones alternas de disponibilidad y ausencia de sustrato, convierten la mayor parte de sustrato en reservas internas (PHA) y el resto en síntesis celular. Este fenómeno es debido a la menor adaptación fisiológica requerida para el almacenamiento de PHA que para el crecimiento celular.

En este capítulo se propone el enriquecimiento de un lodo mixto en bacterias acumuladoras. Es por ello que, para la selección del lodo, se opta por un reactor SBR operado bajo condiciones ADF; el reactor es alimentado de forma intermitente, lo que favorece la capacidad de almacenamiento de PHA del lodo. Se seleccionan ciclos de 12 horas con períodos de alimentación muy corta. Con la aplicación de ciclos largos se pretende que el tiempo de ausencia de sustrato sea lo suficientemente largo para que el polímero almacenado en el interior de la célula sea consumido por ésta, ya sea para crecimiento celular o en operaciones de mantenimiento. De esta manera se evita la saturación de la célula favoreciendo la acumulación del polímero.

Además, se estudian varias relaciones C/N para determinar la mínima concentración de nitrógeno óptima para el desarrollo del proceso. Altas

concentraciones de nitrógeno supondrían un gasto extra en el proceso, ya que el agua de cervecera se caracteriza por una baja concentración de nutrientes; este compuesto se tendría que adicionar a la planta de tratamiento. Mientras que bajas concentraciones de nitrógeno pueden afectar al crecimiento celular, impidiendo el desarrollo de las bacterias acumuladoras o incluso a la capacidad acumuladora de las mismas.

3.2. Sistema experimental.

3.2.1. Inóculo.

Como inóculo se empleó un cultivo procedente del reactor aerobio de una planta depuradora de aguas residuales urbanas. En esta planta se trata agua residual urbana conteniendo una pequeña fracción de agua industrial.

3.2.2. Medio de cultivo.

Para la aclimatación del lodo se empleó un medio sintético cuya composición es presentada en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición del medio de cultivo.

Medio básico		Solución mineral	
Composición	Conc.	Composición	Conc.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g/L	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,5 g/L
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,14 g/L	H ₃ BO ₃	0,15 g/L
EDTA	0,12 g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15 g/L
Solución mineral	4 mL/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,12 g/L
Solución sales fósforo		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,06 g/L
Composición	Conc.	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03 g/L
K ₂ HPO ₄	0,184 g/L	KI	0,03 g/L
KH ₂ PO ₄	0,09 g/L		

Como sustrato (fuente de carbono) se empleó acetato sódico a una concentración de 4,08 g CH₃COONa·3H₂O/L (60 Cmmol/L) y como fuente nitrogenada se utilizó NH₄Cl, para una concentración correspondiente a las siguientes relaciones C/N: 42,8; 30 y 21,4.

3.2.3. SBR estándar.

Se inoculó lodo activo aerobio en un SBR de 1,5 L de volumen útil (Fig. 3.1).

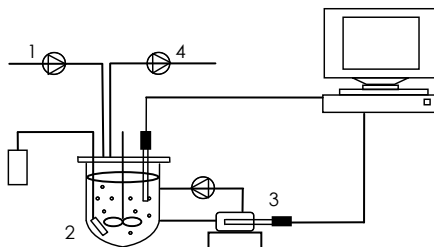


Fig. 3.1. Esquema del SBR aerobio: 1. alimentación, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. efluente.

El SBR fue operado bajo condiciones de alimentación aerobia dinámica (ADF), alternando períodos de exceso y ausencia de sustrato, respectivamente.

Para la operación del SBR se seleccionó un ciclo de 12 horas dividido en tres etapas: reacción aerobia (11 h), decantación (0,8 h) y vaciado de la mitad del reactor (0,2 h) (Fig. 3.2). El medio de cultivo descargado fue reemplazado por medio fresco suministrado durante los dos primeros minutos de la fase aerobia.

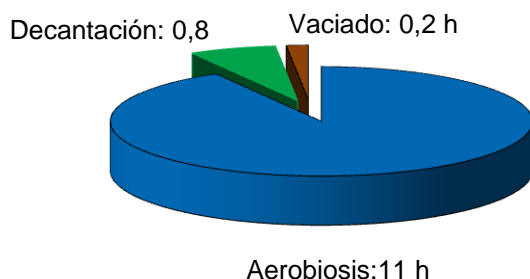


Fig. 3.2. Esquema del ciclo de operación del reactor SBR.

El TRH y el TRS fueron 1 y 10 d, respectivamente. El aire fue suministrado a una velocidad de flujo de 1 vvm. Tanto el pH como la temperatura no fueron controlados en el reactor, pero fueron monitoreados mediante el empleo de sus respectivas sondas. La agitación se mantuvo a 190 rpm.

3.3. Resultados y discusión.

Se decide estudiar varias relaciones C/N para la puesta en marcha del reactor conteniendo el cultivo mixto y así decidir cuál es la óptima para el desarrollo de un cultivo mixto con capacidad acumuladora. Las relaciones C/N bajo estudio fueron: 42,8, 30 y 21,4. Se hicieron seguimientos semanales para comprobar el estado del reactor y observar su evolución, tomando varias muestras a lo largo del ciclo y analizando parámetros como la concentración de PHB, acetato y amonio.

En la Fig. 3.3 se muestra la variación de los rendimientos de acumulación (Y_{STO}) y de crecimiento (Y_{GROWTH}), así como la variación de la velocidad específica de consumo de acetato ($-q_S$) y de amonio ($-q_N$) y de la velocidad específica de producción de polímeros (q_P) a lo largo del tiempo que duró la puesta en marcha.

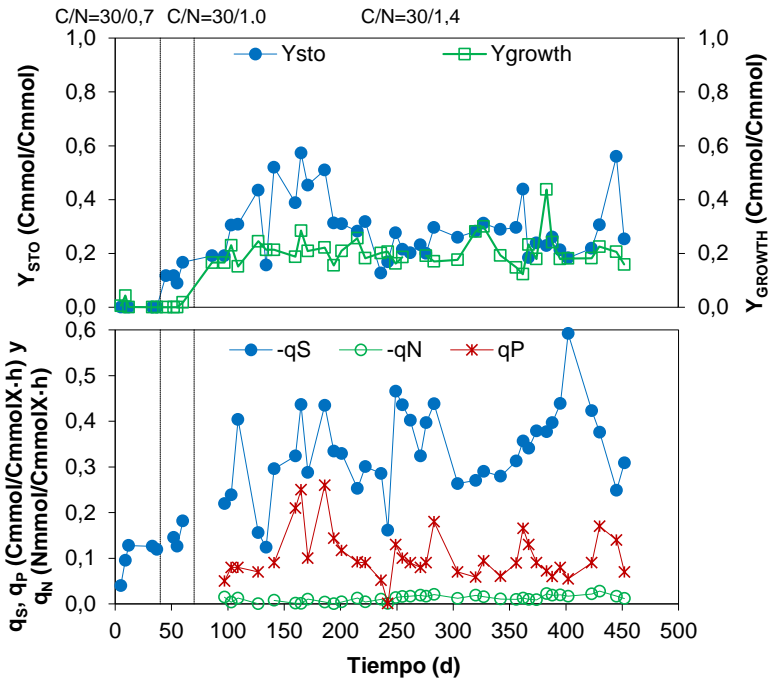


Fig. 3.3. Variación de los rendimientos de almacenamiento (Y_{STO} (●)) y crecimiento (Y_{GROWTH} (□)) y velocidad de consumo de acetato ($-q_S$ (●)), de amonio ($-q_N$ (○)) y velocidad de producción de polímero (q_P (*)) durante la operación del reactor.

Como se puede observar, la relación C/N=42,8 llevó a rendimientos de acumulación nulos, no siendo, por lo tanto, apta para la operación del reactor. La disminución de la relación C/N en el reactor desde 42,8 a 30 lleva a un ligero aumento en el rendimiento de almacenamiento (valor promedio de 0,18 Cmmol HA/Cmmol

AGV), siendo este máximo para una relación C/N de 21,4 para la cual se alcanza un Y_{STO} promedio inicial de 0,44 Cmmol HA/Cmmol AGV, estabilizándose finalmente para un valor promedio de 0,30 Cmmol HA/Cmmol AGV, valor similar a los encontrados en sistemas operados bajo condiciones similares (Serafim *et al.* (2004) y Albuquerque *et al.* (2007)).

La variación de la relación C/N en el reactor llevó también a un aumento de la velocidad de consumo de acetato, desde un valor promedio de 0,10 Cmmol AGV/CmmolX·h para la relación C/N=42,8 a un valor promedio de 0,33 Cmmol AGV/CmmolX·h para la relación C/N=21,4. Este aumento en la velocidad de consumo de acetato se ve reflejado en una disminución en la duración de la fase de *feast* (período de tiempo en el que se consume el sustrato), que pasa de 2,9 h (relación C/N=42,8) a 0,75 h (relación C/N=21,4) (Fig. 3.4). El lento consumo de acetato observado para las relaciones C/N más altas podría ser la causa de la ausencia o baja acumulación de biopolímeros, ya que es necesaria una fase de *famine* (período de tiempo en el que ya no queda sustrato disponible) al menos tres veces mayor que la de *feast*, para asegurar un consumo completo del polímero almacenado en el interior de la célula. De otra forma, podría producirse saturación del polímero en célula, lo que llevaría a bajos rendimientos de almacenamiento, o incluso a la no acumulación de biopolímeros. Dionisi *et al.* (2005), al estudiar el efecto de la velocidad de carga orgánica en la producción de un lodo con alta capacidad acumuladora, observó que a mayores relaciones C/N se producía un aumento de la concentración de la biomasa y una disminución en la velocidad de consumo de sustrato y la velocidad de producción de polímero, siendo insuficiente la extensión de las condiciones de *feast* and *famine* para seleccionar microorganismos con altas velocidades de almacenamiento

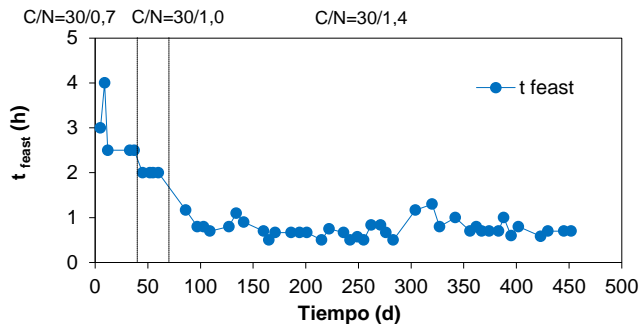


Fig. 3.4. Variación del tiempo de feast para las diferentes relaciones C/N estudiadas.

La velocidad de consumo de amonio siguió una tendencia contraria a la observada para el acetato, ya que la disminución de la relación C/N llevo a una disminución de la misma, por tanto una mayor fracción de sustrato se destina para la acumulación de polímeros. Para las relaciones C/N de 42,8 y 30, el consumo de nitrógeno era tan alto que fue imposible hacer el seguimiento de este parámetro durante el ciclo, ya que en cuanto se alimentaba el pulso de sustrato este era completamente eliminado del medio.

El aumento de la velocidad de consumo de sustrato y por lo tanto la disminución del tiempo de feast observado con la disminución de la relación C/N pudo estar propiciado por un aumento de la concentración de biomasa en el reactor. Como se puede observar en la Fig. 3.5, la concentración de biomasa sufre un incremento desde 2 g SSV/L para una relación C/N de 42,8 a 4,0 g SSV/L para una relación C/N 21,4, estabilizándose finalmente en un valor de concentración de 3 g SSV/L. Esta mayor concentración de biomasa favorece el consumo más rápido de sustrato, debido a la menor relación sustrato/biomasa inicial presente en el sistema, restableciéndose así las condiciones alternas de presencia y ausencia de carbono y favoreciendo por lo tanto el desarrollo de una biomasa con alta capacidad de acumulación. Condiciones similares se encuentran en sistemas operados a menores TRS, en los cuales debido a una mayor purga de biomasa del sistema las relaciones sustrato:biomasa inicial son mayores, los cuales dan lugar a mayores tiempos de feast (Third *et al.* (2003) y Beun *et al.* (2002)).

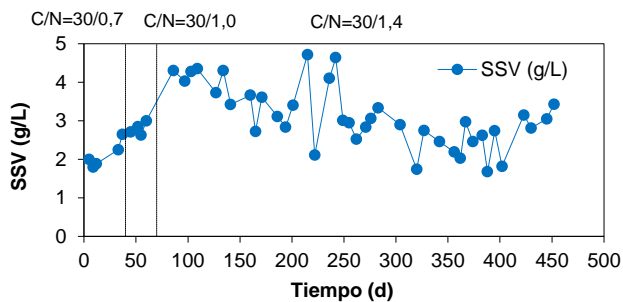


Fig. 3.5. Variación de la concentración de SSV durante la operación del reactor a diferentes relaciones C/N.

3.4. Conclusiones.

Para el enriquecimiento de un cultivo mixto procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas se operó un reactor SBR bajo condiciones ADF empenado ciclos de 12 horas. Se emplean diferentes relaciones C/N (42,8, 30 y 24,1) para determinar la relación óptima para este tipo de procesos. La acumulación de PHA se vio favorecida para las menores relaciones C/N. Las principales conclusiones derivadas de este trabajo son:

- La operación del SBR para una relación de C/N de 42,8 no favoreció la acumulación de PHA debido a un lento consumo de sustrato, dando lugar a tiempos de feast del orden de 3 horas. un alto tiempo de feast pudo efavorecer el crecimiento celular sobre la acumulación de PHA.
- La disminución de la relación C/N a un valor de 21,4 dio lugar a un aumento de la concentración de biomasa que contribuyó el aumento de la velocidad de consumo de sustrato y por tanto a una disminución del tiempo de feast desde 3 horas a 0,8 horas.
- La obtención de un tiempo de feast de 0,75 h indicaba el desarrollo de una biomasa con capacidad de acumulación de PHA, alcanzandose rendimientos de almacenamiento del orden de 0,3 Cmmol HA/Cmmol AGV para la relación de C/N de 21,4.

3.5. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Beun, J. J.; Dircks, K.; van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J. (2002). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Research*, **36**, 1167-1180.
- Dionisi, D.; Majone, M.; Vallini, G.; Di Gregorio, S.; Beccari, M. (2005). Effect of applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **93** (1), 76-88.
- Majone, M.; Masanisso, P.; Carucci, A.; Lindera, K.; Tandoi, V. (1996). Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology*, **34**, 223-232.
- Reis, M. A. M.; Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Ramos, A. M.; Aguiar, F. R.; Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **25**, 377-385.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2), 145-160.
- Third, K. A.; Newland, M.; Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **82** (2), 238-250.

4. *Efecto de la concentración de nutrientes en la
acumulación de PHA*

4.1. Resumen.

En el capítulo anterior se consiguió enriquecer un cultivo mixto en bacterias con capacidad acumuladora mediante el empleo de un sustrato sintético y la variación de la relación C/N. En este capítulo, empleando ese cultivo enriquecido, una vez aclimatado a un agua de cervecera fermentada, se pretende optimizar la etapa de producción de PHA mediante el ajuste de la concentración inicial de nitrógeno así como de la velocidad de flujo de aire.

El agua de cervecera se caracteriza por un alto contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable. La materia orgánica presente en este tipo de agua consiste principalmente en azúcares, almidón soluble, etanol (Parawira, 2005), proteínas y ácidos grasos volátiles (Tanemura *et al.*, 1991). El contenido de nitrógeno y de fósforo es altamente dependiente de los materiales brutos empleados y de la cantidad de levadura presente en el efluente (Simate *et al.*, 2011) aunque de manera general se podría hablar de aguas con un bajo contenido en nutrientes.

El proceso de producción de PHA empleando cultivos mixtos tiene lugar en un proceso en dos etapas aerobias: una etapa mediante la que se consigue el enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras de PHA y una etapa de tipo discontinuo en la que se persigue la saturación de las células en PHA mediante la limitación del crecimiento celular (Cavaillé, *et al.* 2013). Sin embargo, para la producción de PHA partiendo de residuos y/o aguas residuales es necesario incorporar una etapa previa que permita obtener, a partir del material de residuo, ácidos grasos volátiles (precursores de la síntesis de PHA por cultivos mixtos). Es por esto que para desarrollar el trabajo presente en este capítulo recurrimos a un proceso en tres etapas como el sugerido por Majone *et al.* (1999) quienes proponen la combinación de tratamientos anaerobio (fermentación acidogénica) y aerobios (etapas de enriquecimiento y producción de PHA). El proceso emplea lodos activos con alta capacidad acumuladora operados bajo condiciones dinámicas y es alimentado con agua residual con un alto contenido en AGV (efluente acidogénico).

Hasta el momento, la mayor parte de los trabajos descritos en la bibliografía empleando agua residual como sustrato basan su estrategia de operación en este

proceso en tres etapas (Albuquerque *et al.*, 2010; Coats *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2008; Salmiati *et al.*, 2007; Mato *et al.*, 2010; Ben *et al.* 2011).

Para la optimización de la etapa de producción de PHA se plantearon varios ensayos discontinuos en los que se aplicaron diferentes concentraciones de nitrógeno (0; 0,5; 0,7 y 1,2 Nmmol/l) y diferentes velocidades de flujo de aire (0,5; 0,75 y 1,0 vvm).

4.2. Sistema experimental.

4.2.1. Fermentación acidogénica.

La fermentación acidogénica fue llevada a cabo en un reactor continuo de tanque agitado con un volumen útil de 1,6 L (Fig. 4.1a) y un decantador de 0,8 L. Este fue inoculado con biomasa procedente del reactor anaerobio de la planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera situada en Galicia (España). La temperatura de operación fue fijada en 37°C. El reactor fue operado a un TRH de 1,4 d y una VCO de 3300 mgDQO/L·d. El pH fue controlado a un valor de 6,2 mediante la adición de NaOH 2 M

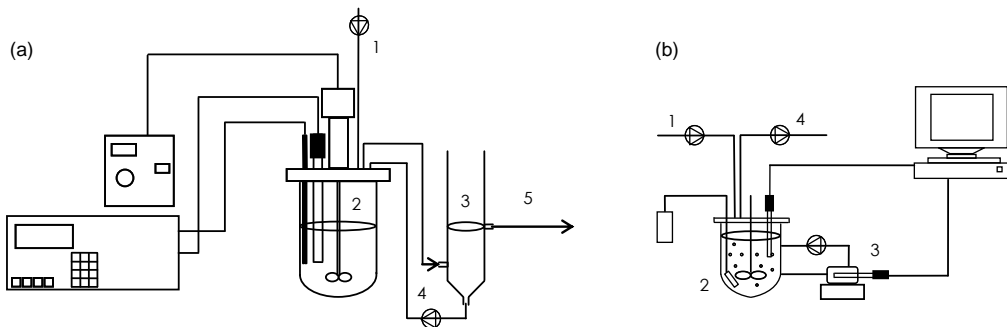


Fig. 4.1. (a) Esquema del reactor anaerobio: 1. influente, 2. tanque de agitación, 3. decantador, 4. recirculación, 5. efluente. (b) Esquema del SBR aerobio: 1. influente, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. efluente

El sistema fue alimentado con agua residual de cervecera, procedente de la misma industria. No se adicionaron nutrientes, ya que estos estuvieron presentes en concentraciones suficientemente altas para el crecimiento celular. El agua residual fue decantada antes de ser introducida en el reactor, con la finalidad de eliminar sólidos inorgánicos procedentes de la etapa de clarificación de la cerveza (tierra de diatomeas). Dada la alta variabilidad de la concentración de materia orgánica de este

tipo de aguas residuales, en ocasiones se requirió la dilución de esta, para así poder mantener una concentración de la DQO más estable en el influente. En la Tabla 4.1 se muestran las características del agua residual empleada en este estudio.

Tabla 4.1. Características del agua residual empleada como influente.

Parámetro	Unidades	Rango de valores
NTK	N mg/L	4-32
PO ₄ ³⁻	P mg/L	8-26
DQO _T	O ₂ mg/L	3000-8800
SST	mg/L	250-470
SSV	mg/L	230-450
AGV	mg DQO/L	500-1500
Etanol	mg DQO/L	1100-6900
Azúcares totales	mg DQO/L	20-1100

4.2.2. Etapa aerobia.

4.2.2.1. Sequencing batch reactor (SBR).

Se inoculó lodo activo aerobio previamente enriquecido en bacterias acumuladoras en un SBR de 1 L de volumen útil. El SBR fue operado bajo condiciones de ADF, alternando cortos períodos de exceso de sustrato y largos períodos de ausencia de sustrato. Para la operación del SBR se seleccionó un ciclo de 12 horas dividido en tres etapas: reacción aerobia (11 h), decantación (0,8 h) y vaciado de la mitad del reactor (0,2 h). El medio descargado fue reemplazado por medio fresco suministrado durante los dos primeros minutos de la fase aerobia. El TRH y el TRS fueron 1 y 10 d, respectivamente. El aire fue suministrado a una velocidad de 1 vvm. Tanto el pH como la temperatura no fueron controlados en el reactor, pero fueron seguidos mediante el empleo de sus respectivas sondas. La agitación se mantuvo a 190 rpm. El reactor fue alimentado con el agua residual fermentada procedente del reactor acidogénico previamente descrito. Dado que esta agua presentó una concentración baja de nutrientes se le añadió amonio ajustando la concentración del mismo a un valor necesario para obtener 1,4 Nmmol/L al comienzo del ciclo. En la Tabla 4.2. se muestran las principales condiciones operacionales del SBR.

4.2.2.2. Ensayos discontinuos aerobios.

El estudio de la optimización de la producción de PHA se llevó a cabo mediante la realización de varios ensayos discontinuos.

El sistema (Fig. 4.1b) constó de un reactor de 0,6 L conectado a un respirómetro. Dentro del respirómetro se introdujo un oxímetro para la determinación del oxígeno disuelto así como de la OUR en cada punto de muestreo. Una bomba peristáltica de alto caudal permitió la recirculación del medio de cultivo entre el reactor y el respirómetro, la cual fue parada de forma controlada para poder medir la OUR. Las condiciones operacionales fijadas en los ensayos fueron similares a las empleadas en el reactor estándar, salvo las variaciones introducidas en los parámetros bajo estudio; concentración de nitrógeno y flujo de aire (Tabla 4.3.). Para cada ensayo, el reactor fue inoculado con lodo procedente del SBR recogido al final del ciclo. Como sustrato se empleó agua residual de cervecera fermentada. El efluente acidogénico se caracterizó por contener principalmente acético, propiónico y butírico. El n-valérico apareció en ocasiones en bajas concentraciones. El amonio fue suministrado con la alimentación a una concentración suficiente para obtener la concentración deseada en el reactor, ya que el agua fermentada carecía de este. Se adicionó también tiourea para inhibir la nitrificación y de esta forma asegurar que el amonio fue solo empleado en el crecimiento celular.

Tabla 4.2. Condiciones operacionales de I S B R

(En paréntesis se muestra la desviación estándar)

Tabla 4.3. Condiciones experimentales fijadas en los ensayos discontinuos

4.3. Resultados y discusión.

4.3.1. Operación del SBR.

El SBR fue operado y controlado hasta que se alcanzó el estado estacionario caracterizado por una concentración de biomasa y un tiempo de feast constantes así como una variación estable de los parámetros de operación (Fig. 4.2).

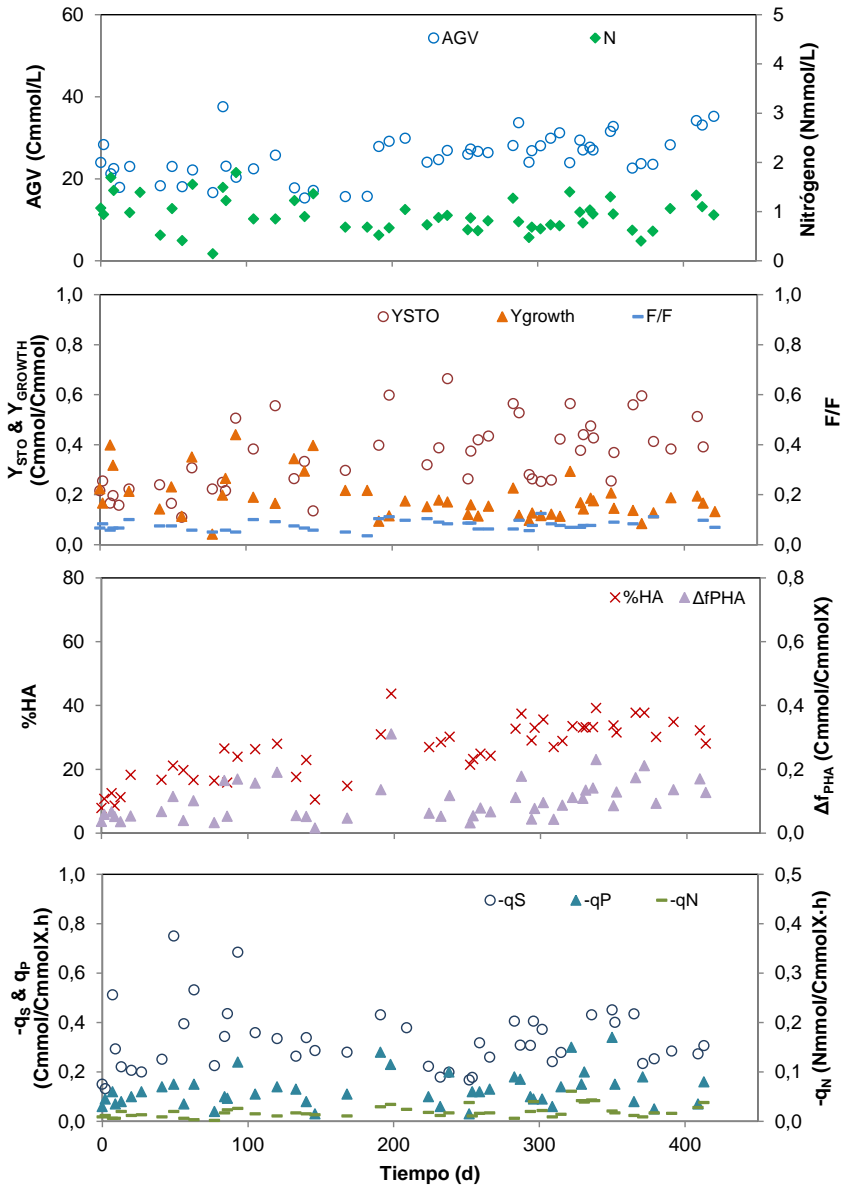


Fig. 4.2. Parámetros de operación obtenidos en el SBR operado bajo condiciones estándar durante el período de aclimatación del lodo al agua de cerveza fermentada.

Periodicamente, a lo largo del ciclo, se determinaron las transformaciones que tenían lugar tanto en compuestos intracelulares como extracelulares. La figura 4.3 muestra un ejemplo de un perfil de concentración típico durante la operación del reactor (después del día 259 de operación). Los AGV fueron completamente consumidos y almacenados como PHA en un corto período de tiempo, restableciéndose el régimen de “feast and famine” (régimen de exceso y carencia de sustrato). El consumo de nitrógeno fue simultáneo al de los AGV, por lo que la acumulación de PHA y el crecimiento celular transcurrieron paralelamente. El oxígeno disuelto (OD) disminuyó inmediatamente después de la adición de sustrato, permaneciendo prácticamente constante durante el período de feast y recuperando su valor inicial (valor de saturación) una vez que el sustrato fue completamente eliminado del medio. El perfil de OUR siguió la tendencia contraria a la del OD (Fig 4.3.).

El final de la fase de feast y el comienzo de la fase de famine fue identificado claramente, por lo tanto, por un brusco descenso del OUR y un aumento repentino de la concentración de OD. Como el nitrógeno fue consumido completamente durante el período de feast (período en el que el sustrato está presente en el medio), se puede suponer que el PHA almacenado fue empleado para mantenimiento celular durante la fase de famine. En el caso de que hubiera algo de crecimiento a partir del PHA almacenado, este tendría lugar a partir del nitrógeno obtenido de células muertas. El PHB podría ser consumido también para la producción de otros componentes celulares que no precisan de nitrógeno para su producción, como es el caso de los exopolisacáridos.

En la fase de famine, el OUR disminuiría lentamente hasta el final del ciclo, momento en el que es alcanzado el valor de respiración endógena.

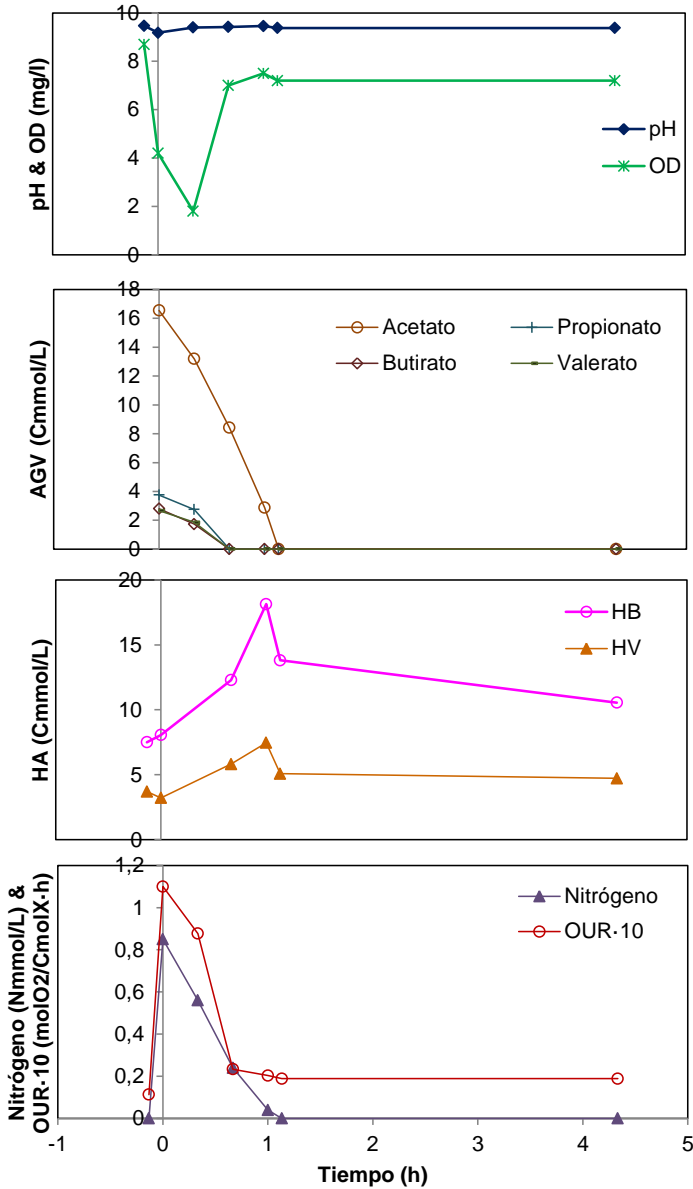


Fig. 4.3. Perfiles de concentración registrados durante un ciclo del SBR.

La operación del SBR durante un período de tiempo largo sometido a condiciones dinámicas de alimentación aerobia permitió seleccionar una biomasa con una capacidad de almacenamiento de 0,4 Cmmol HA/Cmmol AGV (Fig. 4.2.). El contenido de PHA en el lodo fue próximo a 35% el cual fue similar a aquel mencionado por otros autores en la bibliografía (Serafim *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2007).

Una vez el sistema fue estable en el tiempo, se estudió el efecto de varios parámetros en la acumulación de PHA. Los parámetros bajo estudio fueron la concentración de amonio y la velocidad de flujo de aire.

4.3.2. Efecto de la concentración de nitrógeno.

Para estudiar el efecto de la concentración de nitrógeno en la acumulación de PHA se realizaron una serie de ensayos batch con las siguientes concentraciones iniciales de nitrógeno: 0; 0,5; 0,7 y 1,2 Nmmol/L. Las condiciones operacionales de estos ensayos son resumidas en la Tabla 4.3.

En la Fig. 4.4. se pueden observar los perfiles de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción específica de polímero de los diferentes ensayos realizados.

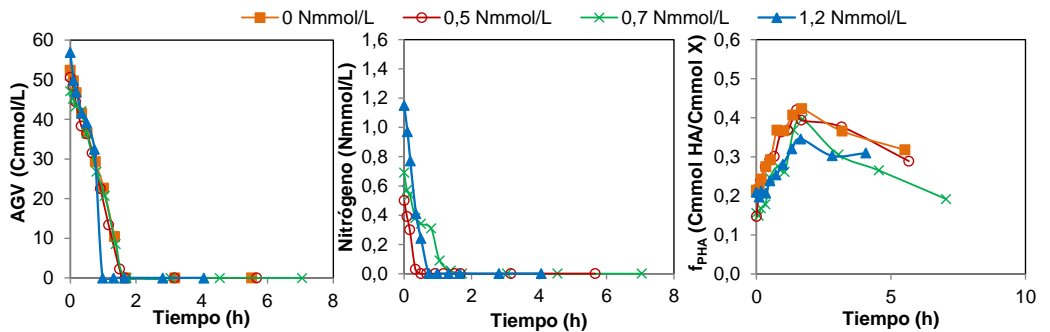


Fig. 4.4. Perfiles de consumo de sustrato y de nitrógeno y de producción de PHA.

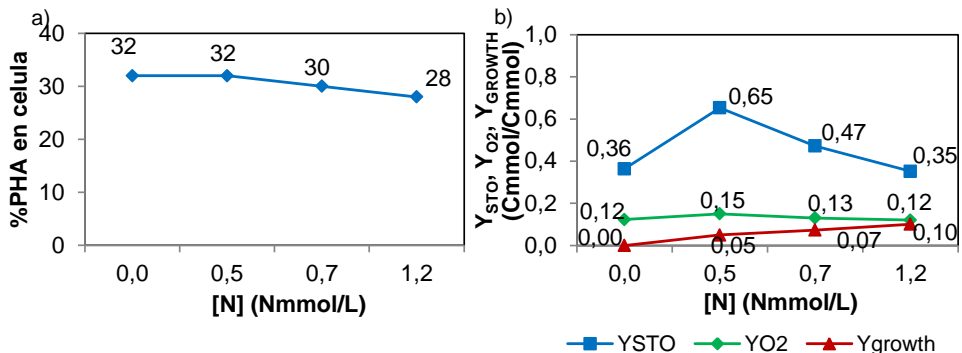


Fig. 4.5. a) Porcentaje de PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.

Como se observa en la Fig. 4.5, el rendimiento de almacenamiento aumentó desde 0,35 hasta 0,65 Cmmol HA/Cmmol AGV con la disminución de la concentración de nitrógeno desde 1,2 a 0,5 Nmmol/L (aumento de la relación C/N desde 42,7 a 100,7). Una posterior reducción de la concentración de nitrógeno a 0 Nmmol/L resultó en la disminución del rendimiento de almacenamiento a 0,36 Cmmol HA/Cmmol AGV, valor similar al obtenido para altas concentraciones de nitrógeno (1,2 Nmmol/L). El contenido de PHA en la célula se mantuvo en valores próximos del 30-32% para concentraciones de nitrógeno en el rango de 0-0,7 Nmmol, disminuyendo al 28% con el aumento de la concentración de nitrógeno a 1,2 Nmmol/L.

Resultados similares a estos fueron obtenidos por Dionisi *et. al.* (2005) quienes observaron que, al limitar la concentración de nitrógeno en el medio (ensayo realizado sin adición de nitrógeno), se almacenaba en las células una menor cantidad de polímero que en aquellos ensayos en los que la cantidad de nitrógeno no estaba limitada. Al analizar las velocidades del proceso, ellos observaron que la velocidad de consumo de sustrato era ligeramente menor en ausencia de nitrógeno que en presencia de nitrógeno. Por otro lado, también observaron que, en las últimas horas del ensayo realizado en ausencia de nitrógeno, la velocidad de producción de polímero decaía, posiblemente, como consecuencia a la saturación de la capacidad acumuladora de la biomasa, mientras que en los ensayos realizados sin limitación de nitrógeno esta se mantenía constante. Ellos concluyeron que en el ensayo realizado sin limitación de nitrógeno, la biomasa generada contribuía en el proceso de producción de PHA lo que permitía que la velocidad de producción de polímero se mantuviera constante.

En este trabajo, como se puede apreciar en la Fig. 4.6., la velocidad específica de consumo de sustrato observada en los diferentes ensayos realizados con distintas concentraciones iniciales de nitrógeno se mantuvo más o menos constante en un valor próximo a 0,3 Cmmol AGV/CmmolX·h, siendo el tiempo de consumo de sustrato de 1,0-1,7 horas (Fig. 4.4.).

El aumento de la concentración de nitrógeno desde 0 a 1,2 Nmmol condujo a una disminución en el valor de velocidad específica de producción de polímero, desde 0,2

Cmmol HA/CmmolX·h hasta 0,12 Cmmol HA/CmmolX·h, mientras que la velocidad específica de consumo de nitrógeno aumentó desde 0 a 0,015 Nmmol/CmmolX·h (Fig. 4.6.).

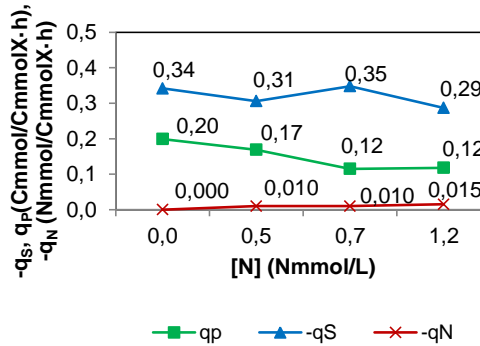


Fig. 4.6. Velocidades de consumo de sustrato, de nitrógeno y de producción de PHA obtenidas para diferentes concentraciones iniciales de nitrógeno.

Es por tanto que, a diferencia de lo observado por Dionisi, en este trabajo el consumo de sustrato no se vio afectado por la concentración inicial de nitrógeno. Si bien cabe destacar que la relación C/N para la cual se obtuvieron los mejores rendimientos en ambos trabajos fue bastante similar, siendo en el trabajo de Dionisi *et al.* (2005) de 104 y en este trabajo de 100. Sin embargo, ya Dionisi *et al.* (2005) en su trabajo hablaba de controversia de los resultados encontrados en la bibliografía con respecto al comportamiento de los diferentes cultivos mixtos frente a ausencia o exceso de nitrógeno en el medio. Así, Jiang *et al.* (2009) no observó ninguna influencia en la síntesis de PHA causada por concentraciones variables de nitrógeno ni de fósforo cuando estudió el efecto de este parámetro en la producción de PHA a partir de residuos de lodo activo. Ellos obtuvieron contenidos de PHA entre el 53,8-56,2% cuando variaron la concentración de nitrógeno entre 2,6 y 12,39 Nmmol/L y de fósforo entre 0,08 y 3,10 Pmmol/L.

Este comportamiento diferente de la biomasa con la variación de un parámetro como puede ser la concentración inicial de nitrógeno puede estar motivado por el uso de diferentes sustratos o incluso por la aplicación de diferentes condiciones operacionales durante la etapa de enriquecimiento del lodo, lo que podría llevar al desarrollo de diferentes comunidades microbianas. Por ejemplo, Johnson *et al.* (2010)

observó una disminución en el contenido de PHA (desde el 88 al 66%) con el aumento de la concentración de nitrógeno cuando empleó acetato como fuente de carbono. Sin embargo, Marang *et al.* (2013), empleando el mismo inóculo que Johnson *et al.* (2010), no observó ninguna influencia en la capacidad de acumulación del lodo motivada por la presencia de altas concentraciones de nitrógeno en el medio (88% de contenido de PHA) al usar butirato como fuente de carbono. El nitrógeno, aunque estuvo limitado en el trabajo realizado por Marang *et al.* (2013), estuvo presente en el medio durante un período de 4,5 horas (más o menos la mitad del ensayo). El efecto de la composición de sustrato en el desarrollo de comunidades microbianas fue estudiado por Jiang *et al.* (2011), quien inoculó dos bioreactores con lodo activo y alimentó a uno de ellos con lactato y al otro con una mezcla de acetato y lactato. Después de un período de aclimatación al sustrato, ellos observaron que el desarrollo de las comunidades microbianas era diferente en los reactores y que éste dependía del tipo de sustrato alimentado.

Por otro lado, el máximo rendimiento de almacenamiento obtenido en este trabajo (0,65 Cmmol HA/Cmmol AGV) es bastante más bajo que el obtenido por Serafim *et al.* (2004) cuando el amonio no fue suministrado al medio (0,83 Cmmol HA/Cmmol X). Asimismo, las velocidades específicas de consumo de sustrato (0,2-0,3 Cmmol AGV/CmmolX·h) son más bajas que las reportadas por otros investigadores trabajando con sustratos sintéticos (0,6-1 Cmmol AGV/CmmolX·h) conteniendo acetato como única fuente de carbono (Serafim *et al.* 2004) o mezcla de AGV (Dionisi *et al.* 2004), pero similares a los valores reportados por otros autores trabajando con aguas residuales o residuos: 0,07-0,19 Cmol AGV/CmolX·h (Bengtsson *et al.*, 2008); 0,26-0,5 Cmmol AGV/CmmolX·h (Albuquerque *et al.*, 2007). Esta diferencia podría ser debido a la mayor complejidad del sustrato empleado (agua residual de cervecera). Es posible que el empleo de agua residual como sustrato pudiera conducir a la obtención de contenidos de PHA y rendimientos de almacenamiento mucho más bajos que aquellos conseguidos con un sustrato sintético como consecuencia del desarrollo de cepas microbianas que no presentan capacidad para acumular polímero como reservas internas. La presencia de materia orgánica diferente a los AGV en el sustrato podría favorecer la presencia de microorganismos no acumuladores.

Este comportamiento ya fue observado por Marang *et al.* (2014) quienes emplearon como sustrato una mezcla de acetato y metanol en una relación 1:1, para simular el impacto que tendría el enriquecimiento de un lodo con un sustrato conteniendo, además de AGV, otra fuente de materia orgánica diferente. El metanol no puede ser usado por los microorganismos para almacenar PHA como reservas internas en los procesos de feast and famine. Es por esto que, en este caso, el metanol fue usado como modelo de sustrato para los compuestos que no dan lugar a la producción de PHA bajo condiciones de feast and famine. Para este estudio, ellos emplearon un cultivo enriquecido en *Plasticumlumans acidivorans* con una alta capacidad de acumulación (84% del contenido de PHA en peso seco de célula). Tras un período de aclimatación del cultivo al sustrato (mezcla de acetato y metanol), observaron el desarrollo de una segunda cepa microbiana dominante, *Methylobacillus flagellatus*, la cual no puede almacenar PHA. Al hacer ensayos batch con este cultivo mixto alimentado con la mezcla de acetato y metanol, el contenido de PHA (52%) fue más bajo en comparación a los obtenidos antes de suministrar metanol al medio. Sin embargo, observaron que la reducción en la capacidad de acumulación del cultivo era debida al crecimiento de la población metilotrófica no acumuladora, ya que la fracción de *Plasticumlumans acidivorans* en el total de la biomasa se reducía significativamente en los experimentos realizados con alta concentración de nitrógeno. En estudios previos ellos habían demostrado que la bacteria *Plasticumlumans acidivorans* era capaz de mantener su capacidad de acumulación incluso cuando altas concentraciones de nutrientes eran aplicadas al medio (Marang *et al.*, 2013).

En este trabajo, el porcentaje de AGV en el efluente fermentado fue del 60-80% de la DQO total del efluente, mientras que el porcentaje de DQO restante se correspondió con etanol que permaneció sin transformarse o que se generó de la fermentación de los azúcares presentes en el agua. Según un estudio realizado por Beccari *et al.* (2002), aunque las bacterias son capaces de almacenar PHB empleando etanol como sustrato, el porcentaje de PHB producido a partir de este sustrato es mucho menor que el producido cuando se emplea acetato como sustrato (un 25% frente al 45% obtenido a partir del acetato), mientras que el crecimiento de la biomasa es mayor. Por otro lado, Beccari *et al.* (2002) también observó que la

velocidad de consumo de sustrato era menor en los ensayos realizados con etanol que en aquellos realizados con acetato, lo que vendría a confirmar la menor velocidad de consumo de sustrato observada en este trabajo con respecto a la observada en otros trabajos empleando acetato como única fuente de carbono.

4.3.3. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto (OD).

El ahorro de poder energético es uno de los objetivos buscados en los procesos aerobios de tratamiento de agua residuales, ya que hace el tratamiento más atractivo económicamente para las industrias. Eso hace que los procesos aerobios de tratamiento de aguas sean optimizados para ser desarrollados a concentraciones de oxígeno cada vez más bajas.

Por otro lado, en el caso del almacenamiento de PHA, una reducción de la concentración del OD (disminución de la velocidad del flujo de aire) limitaría el crecimiento celular lo que llevaría a un aumento de la productividad del proceso.

El efecto de la concentración de oxígeno disuelto fue también estudiado por Third *et al.* (2003) quienes observaron que, al limitar el oxígeno en el medio, el rendimiento de producción de PHB era mayor (0,63-0,68 Cmol PHB/Cmol Ac) que el obtenido bajo condiciones excedentes en oxígeno (0,48-0,49 Cmol PHB/Cmol Ac). Bajo condiciones no limitantes de oxígeno la biomasa empleaba una mayor fracción de sustrato para crecer. Mediante un modelo matemático pudieron observar que para bajas concentraciones de oxígeno, la limitada disponibilidad del ATP limitaba de manera significativa el crecimiento celular siendo la mayor parte del ATP empleado para el transporte de acetato al interior de la célula. Por la contra, altas concentraciones de oxígeno resultaban en un exceso de ATP lo que favorecía el crecimiento celular y, por lo tanto, disminuía el rendimiento de acumulación de PHB.

Para encontrar la velocidad de flujo óptimo de aire para el proceso de almacenamiento de PHA fueron llevados a cabo tres ensayos a 0,5; 0,75 and 1,0 vvm. En la Tabla 4.3. se resumen las condiciones operacionales aplicadas en estos ensayos.

En la Fig. 4.7. se muestran los perfiles de consumo sustrato y nitrógeno y de producción específica de polímero

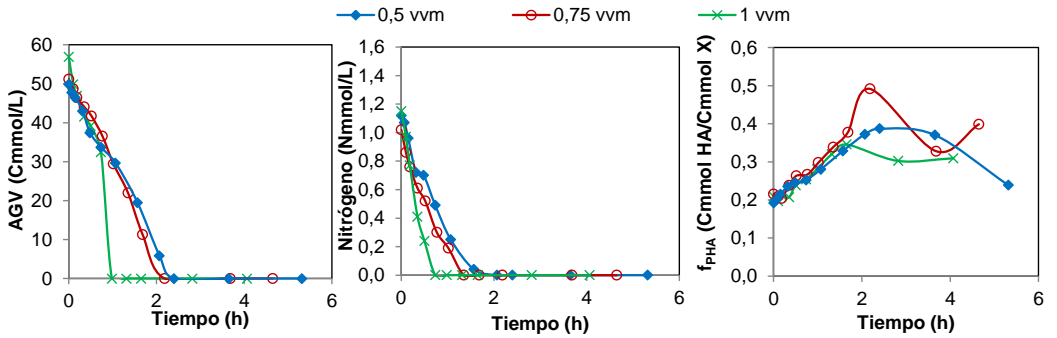


Fig. 4.7. Perfiles de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de polímero

Como muestra la Fig. 4.8, a diferencia de los resultados ya mencionados, el contenido de PHA en célula obtenido fue bastante similar para las tres velocidades de flujo aplicadas, siendo igual o próximo a 30%. Sin embargo, cuando la velocidad de flujo fue controlada a 0,75 vvm se obtuvo un máximo tanto en el rendimiento de almacenamiento (0,49 Cmmol HA/Cmmol AGV) como en la productividad específica del polímero (0,28 Cmmol HA/CmmolX) (Fig. 4.7).

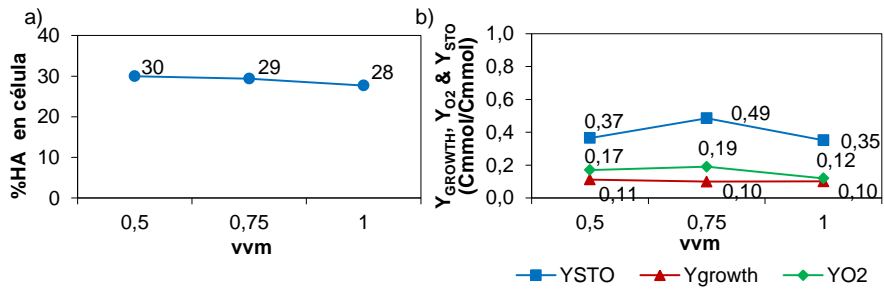


Fig. 4.8. a) Porcentaje de PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes velocidades de flujo de aire

Como se puede apreciar en la Fig. 4.9, la reducción del flujo de aire a un valor de 0.5 vvm afectó a todas las velocidades del proceso, las cuales presentaron un valor más bajo que los obtenidos para velocidades de flujo de aire mayores. Sin embargo, la velocidad de consumo de nitrógeno fue la más afectada; su valor se reduce a aproximadamente la mitad del valor obtenido para velocidades de flujo mayores.

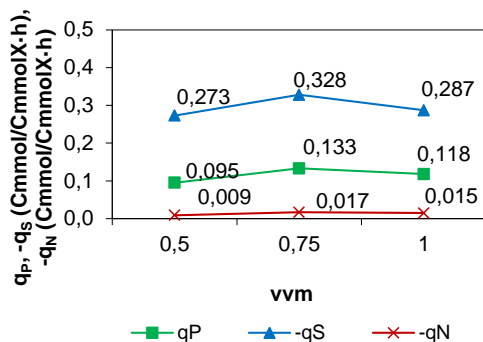


Fig. 4.9. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes velocidades de flujo.

Aunque parece que la reducción de la velocidad del flujo de aire a 0,5 vvm tiene un efecto significativo en el crecimiento celular, a diferencia de lo observado en el trabajo de Third *et al.* (2003), en este trabajo no se observó un aumento de la productividad del sistema cuando se trabajó a concentraciones de oxígeno tan bajas. Estos resultados son muy similares a los encontrados para el efecto de la concentración de nitrógeno, en los cuales, en cuanto el nitrógeno era prácticamente suprimido del medio, la productividad del sistema caía a valores similares a los obtenidos bajo condiciones excedentes de nitrógeno.

El diferente comportamiento de la biomasa observado entre el trabajo desarrollado por Third *et al.* (2003) y este trabajo puede estar motivado por la diferente estrategia seguida en ambos trabajos para el enriquecimiento de la biomasa. Mientras que en este trabajo, para el enriquecimiento del lodo, se ha seguido una estrategia basada en la limitación de los nutrientes (C/N=34) (el nitrógeno es completamente consumido en la etapa de feast), en el trabajo desarrollado por Third *et al.* (2003) el enriquecimiento del lodo estuvo basado en una limitación del carbono (C/N=8). En este trabajo, al limitarse los nutrientes a la etapa de feast tanto las bacterias acumuladoras como las no acumuladoras tienen que competir por los nutrientes y por el carbono durante este período, las bacterias acumuladoras pierden su ventaja competitiva al no poder crecer durante la etapa de famine, de ahí que, en presencia de sustrato y nutrientes, el principal proceso que tiene lugar es el de crecimiento celular. Al limitarse el empleo del polímero durante la

etapa de fame ya que no se emplea para crecimiento celular, este permanece en la célula lo que favorece la saturación celular impidiendo a la célula almacenar altas cantidades de polímero. Esta saturación se puede hacer más pronunciada en ausencia de crecimiento celular (Dionisi *et al.* 2005), lo cual explicaría el bajo rendimiento de acumulación observado para la menor velocidad de flujo de aire estudiada.

4.4. Conclusiones.

Últimamente el interés en la producción de PHA a partir de cultivos mixtos y agua residual ha aumentado considerablemente debido a la reducción del precio de mercado de los PHA que se obtiene con dicho proceso. En este trabajo se alimentó un reactor SBR con objeto de enriquecer un cultivo mixto en bacterias con alta capacidad de acumulación. El proceso fue estable en el tiempo, siendo seleccionado un lodo con capacidad de almacenamiento (rendimiento de almacenamiento de 0,4 Cmmol HA/Cmmol AGV y contenido de PHA de 35%). La manipulación de la concentración de nitrógeno así como de la velocidad de flujo de aire suministrada permitió mejorar el proceso, siendo obtenidos mayores rendimientos de almacenamiento. Los principales logros alcanzados en este trabajo se relatan a continuación:

- La concentración de nitrógeno inicial jugó un papel importante en la mejora del proceso de acumulación de PHA. La limitación de nutrientes en el medio dio lugar a un aumento del rendimiento de almacenamiento, alcanzándose el máximo de 0,65 Cmmol HA/Cmmol AGV cuando el nitrógeno se limitó a 0,5 Nmmol/L. A diferencia de lo esperado, cuando no se adicionó nitrógeno al medio, el rendimiento de almacenamiento cayó hasta valores similares a aquellos obtenidos para altas concentraciones de nitrógeno.
- El control de la velocidad de flujo de aire permitió mejorar el proceso de producción de PHA, siendo obtenido el máximo rendimiento de almacenamiento (0,49 Cmmol HA/Cmmol AGV) cuando el flujo de aire se controló para un valor de 0,75 vvm.

- La etapa de enriquecimiento de la biomasa parece jugar un papel crucial en el proceso. Para el enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras se siguió una estrategia basada en la limitación de nutrientes; los nutrientes se agotan durante la fase de feast. Esta estrategia favorece tanto la competición por el carbono como por el nitrógeno, favoreciendo por lo tanto el crecimiento celular frente a la acumulación de reservas intracelulares cuando se trabaja con condiciones que favorecen el crecimiento celular (por ejemplo altas concentraciones de nutrientes).

4.5. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses, *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Albuquerque, M.G.E.; Torres, C.A.V.; Reis, M.A.M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar cane molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection, *Water Research*, **44** (11); 3419-3433.
- Beccari, M.; Dionisi, D.; Giuliani, A.; Majone, M.; Ramadori, R. (2002). Effect of different carbon sources on aerobic storage by activated sludge, *Water Science & Technology*, **45**(6), 157-168.
- Ben, M.; Mato, T.; Lopez, A.; Vila, M.; Kennes, C.; Veiga, M. (2011). Bioplastic production using wood mill effluents as feedstock, *Water Science & Technology*, **63**(6), 1196-1202.
- Bengtsson, S.; Werker, A.; Christensson, M.; Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, *Bioresource Technology*, **99**, 509-516.
- Cavaillé, L; Grousseau, E.; Pocquet, M.; Lepeuple, A-S; Uribelarrea, J-L; Hernandez-Raquet, G; Paul, E. (2013). Polyhydroxyalkanoate production by direct used of waste activate sludge in phosphorous-limited fed batch culture, *Bioresource Technology*, **49**, 301-309.
- Coats, E. R.; Loge, F. J.; Smith, W. A.; Thompson, D. N.; Wolcott, M. P. (2007). Functional stability of mixed microbial consortium producing PHA from waste carbon source, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **136**, 909-925.
- Dionisi, D.; Majone, M.; Papa, V.; Beccari, M. (2004). Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnology and Bioengineering*, **85**: 569–579.
- Dionisi, D.; Majone, M.; Vallini, G.; Di Gregorio, S.; Beccari, M. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing

- batch reactor operated at high organic load rate, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 1306-1318.
- Jiang, Y.; Chen, Y.; Zheng, X. (2009). Efficient Polyhydroxyalkanoates Production from a Waste-Activated Sludge Alkaline Fermentation Liquid by Activated Sludge Submitted to the Aerobic Feeding and Discharge Process, *Environmental Science and Technology*, **43**, 7734–7741.
- Jiang, Y.; Marang, L.; Kleerebezem, R.; Muyzer, G.; van Loosdrecht, M. C.M. (2011). Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture, *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, 2022–2035. doi: 10.1002/bit.23148.
- Johnson, K.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs, *Water Research*, **44**, 2141-2152.
- Majone, M.; Ramadori, R.; Beccari, M. (1999). Biodegradable polymers from waste by using activated sludges enriched by aerobic periodic feeding, *AIDIC Conf Ser*, **4**, 163-170.
- Marang, L.; Jiang, Y.; van Loosdrecht, M.C.M.; Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production, *Bioresource and Technology*, **142**, 232–239. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.031
- Marang, L.; Jiang, Y.; van Loosdrecht, M. C.; Kleerebezem, R. (2014). Impact of non-storing biomass on PHA production: an enrichment culture on acetate and methanol, *International journal of biological macromolecules*, **71**, 74-80.
- Mato, T.; Ben, M.; Kennes, C.; Veiga, M. (2010). Valuable product production from wood mill effluents, *Water Science & Technology*, **62**(10), 2294-2300.
- Parawira, W.; Kudita, I.; Nyandoroh, M.G.; Zabulla, R. (2005). A study of industrial anaerobic treatment of opaque beer brewery wastewater in a tropical climate using a full-scale UASB reactor seeded with activated sludge, *Process Biochemistry*, **40**, 593-599.
- Salmiati, Z.; Ujang, M. R.; Salim, M. F.; Din, Md and Ahmad, M. A. (2007). Intracellular biopolymer productions using mixed microbial cultures from fermented POME, *Water Science and Technology*, **56** (8), 179-185.

- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2), 145-160.
- Simate, G. S.; Cluett, J.; Iyuke, S. E.; Musapatika, E. T.; Ndlovu, S.; Walubita, L.F.; Alvarez, A. E. (2011). The treatment of brewery wastewater for reuse: state of the art, *Desalination*, *273*, 235–247
- Tanemura, K.; Kida, D.; Iwasaki, K.; Sonoda, Y. (1991). Operation conditions for anaerobic treatment of wastewater from a beer brewery, *Journal of fermentation and bioengineering*, **73** (4), 332-335.
- Third, K. A.; Newland, M.; Cord-Rowisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, **82**, 238-250.

*5. Optimización de la acumulación de PHA
variando la concentración de sustrato, el pH
y la temperatura*

5.1. Resumen.

En este capítulo, siguiendo la estrategia planteada en el capítulo anterior, se busca optimizar la etapa de producción de PHA mediante el ajuste de varios parámetros operacionales como son la variación de la concentración de sustrato, el pH y la temperatura.

Se sabe que un ajuste de la concentración de sustrato en la etapa de producción de PHA puede llevar a una mejora de la productividad del sistema, sin embargo la adición de concentraciones de sustrato muy altas puede resultar en la inhibición del mismo. Serafim *et al.* (2004) observó que aumentando la concentración de sustrato hasta 90 Cmmol/L conseguía una mejora del proceso, mientras que para la aplicación de concentraciones mayores (160 Cmmol/L) se observaba una inhibición por sustrato. Albuquerque *et al.* (2007) también observó una mejoría del proceso con el aumento de la carga orgánica, sin embargo la concentración máxima soportada (60 Cmmol/L) era menor a la observada por Serafim *et al.* (2004), lo cual fue atribuido al empleo de un sustrato real (melazas) en lugar del sustrato sintético (acetato) empleado por Serafim *et al.* (2004).

En la bibliografía se pueden encontrar varios trabajos referidos al estudio del efecto del pH en el proceso de producción de PHA usando cultivos mixtos sometidos a condiciones dinámicas o condiciones anaerobias/aerobias. Sin embargo, aunque todos coinciden en que condiciones de pH alcalinos dan lugar a mayores rendimientos de acumulación, no se ha definido un rango de pH para el cual el proceso sea óptimo.

Serafim *et al.* (2004) estudió el efecto del pH en el proceso de producción de PHA usando valores de pH neutro (7,0) y básico (8,3) y comparó los resultados obtenidos con los alcanzados en un ensayo desarrollado sin control de pH. Ellos observaron que los intentos por controlar el pH resultaron en una disminución de la cantidad de PHB almacenado. Los máximos valores de contenido de PHB en lodo que obtuvieron cuando el pH fue controlado a 7,0 y a 8,3 fueron, respectivamente, 27,5 y 39,8 %, mientras que en el ensayo realizado sin control de pH alcanzaron un 47,5% de acumulación.

Dionisi *et al.* (2005) estudió el efecto de los valores de pH en el rango de 4,5 a 10,5 en el proceso de producción de PHA. Ellos observaron que para el rango de pH entre 6,5 y 9,5 la biomasa mostraba una actividad significativa mientras que para un pH de 5,5 la actividad celular era muy baja, siendo casi inexistente a los valores de pH más extremos estudiados (4,5 y 10,5). Asimismo, ellos también observaron que el rendimiento de producción de polímero apenas se vio afectado por el valor de pH en el rango de 6,5 a 8,5, siendo alcanzado su máximo valor para un pH de 8,5 y permaneciendo a un valor suficientemente alto a pH de 9,5.

Villano *et al.* (2010) observaron que el máximo contenido de polímero en biomasa obtenido a valores de pH de 7,5 y 8,5 era similar (34 y 38%, respectivamente), mientras que para valores de pH más alcalinos (9,5) el rendimiento caía a valores próximos al 24%. Ellos también observaron una tendencia similar con el rendimiento de almacenamiento calculado para el máximo contenido de polímero en la biomasa, el cual disminuyó desde 0,32 a 0,27 g DQO (HA)/g DQO (AGV) con el aumento de pH.

Por otro lado, Chua *et al.* (2003) al estudiar el efecto del pH en la producción de PHA mediante un proceso aerobio/anaerobio observó que la producción de PHA obtenida era mayor cuando el pH se controlaba a valores alcalinos (8 y 9) que cuando este se controlaba a valores neutros (6 y 7) a pesar de haber realizado el enriquecimiento de lodo a un valor de pH de 7.

El efecto de la temperatura en la etapa de producción de polímeros fue estudiado por Johnson *et al.* (2010) quienes observaron que el control de la temperatura en la etapa de producción tan solo influía en las velocidades del proceso pero no en la máxima capacidad de acumulación del cultivo mixto.

Aunque muchos de estos parámetros ya fueron estudiados por otros autores, los resultados no son concluyentes. Asimismo, el empleo de un residuo o un agua residual puede influir en el proceso de tratamiento de tal forma que la tendencia observada para un residuo o un agua residual en particular no tiene por qué reproducirse para otro. Es por esto que, aunque de una manera general, el

comportamiento pueda ser similar, es necesario estudiar cada caso en concreto para determinar los valores óptimos para cada uno.

5.2. Sistema experimental.

5.2.1. Fermentación acidogénica.

La fermentación acidogénica fue llevada a cabo en un reactor continuo de tanque agitado con un volumen útil de 1,6 L (Fig 5.1a) y un decantador de 0,8 L. Este fue inoculado con biomasa procedente del reactor anaerobio de la planta de tratamiento de agua residual de una industria cervecera situada en Galicia (España). La temperatura de operación fue fijada en 37°C. El reactor fue operado a un TRH de 1,4 d y una VCO de 3300 mg DQO/L-d. El pH se controló para un valor de 6,2 mediante la adición de NaOH 2M.

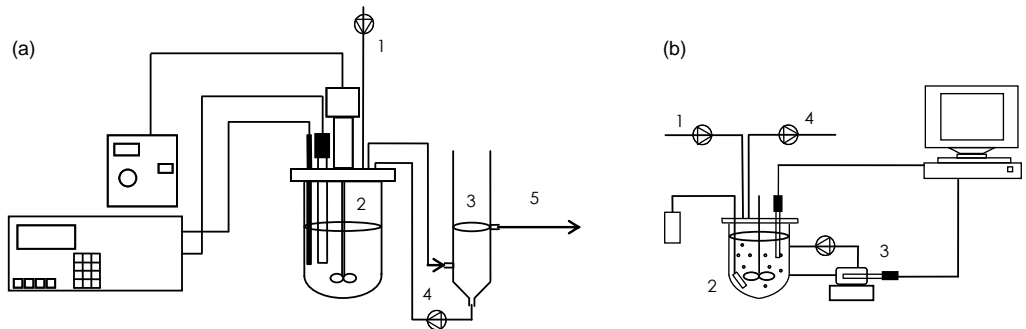


Fig. 5.1. (a) Esquema del reactor anaerobio: 1. influente, 2. tanque de agitación, 3. decantador, 4. recirculación, 5. efluente. (b) Esquema del SBR aerobio: 1. influente, 2. vaso de reacción, 3. respirómetro, 4. Efluente.

El sistema fue alimentado con agua residual de cervecera, procedente de la misma industria. No se adicionaron nutrientes, ya que estos estuvieron presentes en concentraciones suficientemente altas para el crecimiento celular. El agua residual fue decantada antes de ser introducida en el reactor, con la finalidad de eliminar sólidos inorgánicos procedentes de la etapa de clarificación de la cerveza (tierra de diatomeas). Dada la alta variabilidad de la concentración de materia orgánica de este tipo de aguas residuales, en ocasiones se requirió la dilución de esta, para así poder mantener una concentración de DQO más estable en el influente.

5.2.2. Etapa aerobia.

5.2.2.1. Sequencing Batch Reactor (SBR).

Se inoculó lodo activo aerobio previamente enriquecido en bacterias acumuladoras en un SBR de 1 L de volumen útil. El SBR fue operado bajo condiciones de alimentación aerobia dinámica (ADF), alternando cortos períodos de exceso (feast) de sustrato y largos períodos de ausencia de sustrato (famine). Para la operación del SBR se seleccionó un ciclo de 12 horas dividido en tres etapas: reacción aerobia (11 h), decantación (0,8 h) y vaciado de la mitad del reactor (0,2 h). El medio descargado fue reemplazado por medio fresco suministrado durante los dos primeros minutos de la fase aerobia. El TRH y el TRS fueron 1 y 10 d, respectivamente. El aire fue suministrado a un flujo de 1 vvm. Tanto el pH como la temperatura no fueron controlados en el reactor, pero fueron monitorizados mediante el empleo de sus respectivas sondas. La agitación se mantuvo a 190 rpm. El reactor fue alimentado con el agua residual fermentada procedente del reactor acidogénico previamente descrito. Dado que esta agua presentó una concentración baja de nutrientes se le añadió nitrógeno ajustando la concentración del mismo a un valor necesario para obtener 1,4 Nmmol/L al comienzo del ciclo. En la Tabla 5.1. se muestran las principales condiciones operacionales del SBR.

5.2.2.2. Ensayos discontinuos aerobios.

El estudio de la optimización de la producción de PHA se llevó a cabo mediante la realización de varios ensayos discontinuos.

El sistema (Fig 5.1b) constó de un reactor de 0,6 L conectado a un respirómetro. Dentro del respirómetro se introdujo un oxímetro para la determinación del oxígeno disuelto así como de la OUR en cada punto de muestreo. Una bomba peristáltica de alto caudal permitió la recirculación del medio de cultivo entre el reactor y el respirómetro, la cual fue parada de forma controlada para poder medir la OUR. Las condiciones operacionales fijadas en los ensayos fueron similares a las empleadas en el reactor estándar (Tabla 5.2). Para cada ensayo, el reactor fue inoculado con lodo procedente del reactor estándar recogido al final del ciclo.

Tabla 5.2. Condiciones operacionales aplicadas en los ensayos discontinuos

(En paréntesis se muestra la desviación estándar)

Tabla 5.1. Condiciones operacionales del SBR

El efluente acidogénico empleado como sustrato se caracterizó por contener principalmente acético, propiónico y butírico. El n-valérico apareció en ocasiones en bajas concentraciones. El nitrógeno fue suministrado con la alimentación a una concentración suficiente para obtener la concentración deseada en el reactor, ya que el agua fermentada carecía de este. Se adicionó también tiourea para de esta forma inhibir la nitrificación y asegurar que el nitrógeno era solo empleado en el crecimiento celular. En los ensayos en los que se estudió el efecto de la concentración de sustrato se adicionaron AGV al medio, manteniéndose las proporciones de los ácidos presentes en el efluente acidogénico.

5.3. Resultados y discusión.

5.3.1. Operación del SBR.

El SBR fue operado y controlado hasta que se alcanzó el estado estacionario caracterizado por una concentración de biomasa y un tiempo de feast constantes así como una variación estable de los parámetros de operación (Fig. 5.2).

Periodicamente, a lo largo del ciclo, se determinaron las transformaciones que tenían lugar tanto en compuestos intracelulares como extracelulares. Los AGV fueron completamente consumidos y almacenados como PHA en un corto período de tiempo, restableciéndose el régimen de “feast and famine” (régimen de exceso y carencia de sustrato). El consumo de nitrógeno fue simultáneo al de los AGV, por lo que la acumulación de PHA y el crecimiento celular transcurrieron paralelamente. El oxígeno disuelto (OD) disminuyó inmediatamente después de la adición de sustrato, permaneciendo prácticamente constante durante el período de feast y recuperando su valor inicial (valor de saturación) una vez que el sustrato fue completamente eliminado del medio. El perfil de OUR siguió la tendencia contraria a la del OD.

El final de la fase de feast y el comienzo de la fase de famine fue identificado claramente, por lo tanto, por un brusco descenso del OUR y un aumento repentino de la concentración de OD. Como el nitrógeno fue consumido completamente durante el período de feast (período en el que el sustrato está presente en el medio), se puede suponer que el PHA almacenado fue empleado para mantenimiento celular durante la fase de famine. En el caso de que hubiera algo de crecimiento a partir del PHA

almacenado, este tendría lugar a partir del nitrógeno obtenido de células muertas. El PHB podría ser consumido también para la producción de otros componentes celulares que no precisan de nitrógeno para su producción, como es el caso de los exopolisacáridos.

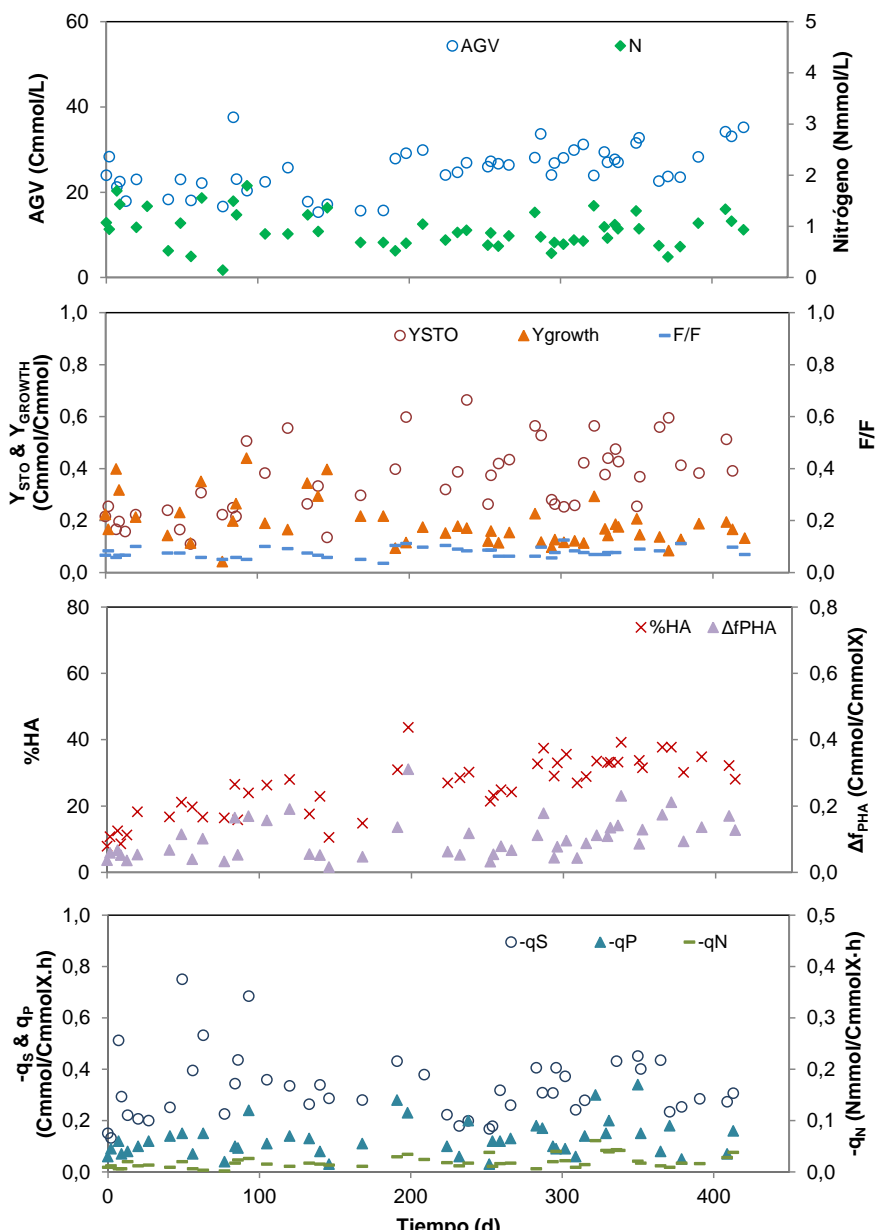


Fig. 5.2. Parámetros de operación obtenidos en el SBR operado bajo condiciones estándar durante el período de aclimatación del lodo al agua de cerveza fermentada.

En la fase de fame, el OUR disminuiría lentamente hasta el final del ciclo, momento en el que es alcanzado el valor de respiración endógena.

La operación del SBR durante un período de tiempo largo sometido a condiciones dinámicas de alimentación aerobia permitió seleccionar una biomasa con una capacidad de almacenamiento de 0,4 Cmmol HA/Cmmol AGV (Fig. 5.2.). El contenido de PHA en el lodo fue próximo a 35% el cual fue similar a aquel mencionado por otros autores en la bibliografía (Serafim et al., 2004; Albuquerque et al., 2007).

Una vez el sistema fue estable en el tiempo, se realizaron varios ensayos discontinuos para estudiar el efecto de varios parámetros en la acumulación de PHA. Los parámetros bajo estudio fueron la concentración de sustrato alimentado y el efecto de parámetros de operación como son el pH y la temperatura.

5.3.2. Efecto de la concentración de sustrato.

En este apartado nos centramos en el estudio del efecto de la concentración de sustrato en la acumulación de PHA, usando una concentración de nitrógeno alta (1,15-1.3 Nmmol/L). Para la realización del mismo se escogen tres concentraciones de AGV comprendidas entre 55 y 110 Cmmol/L (57, 79 y 109 Cmmol/L).

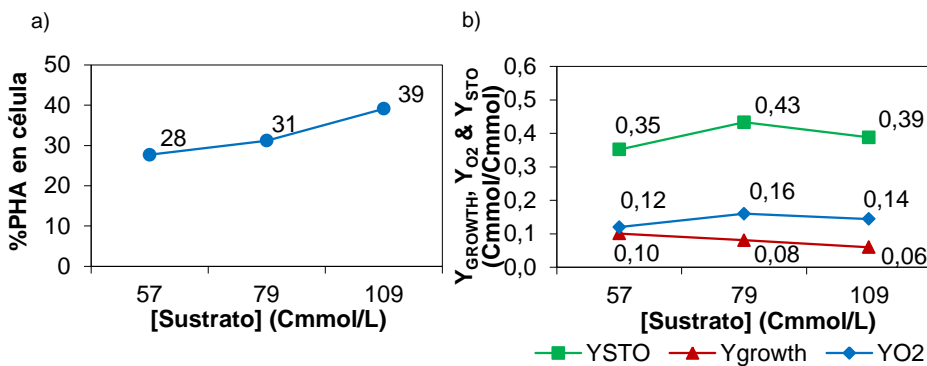


Fig. 5.3. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes concentraciones de sustrato.

En la Fig. 5.3. se muestra la variación del contenido de PHA en la célula así como el rendimiento de almacenamiento para cada una de las concentraciones de AGV estudiadas. Como se puede observar, tanto el contenido de PHA en célula (Fig. 5.3.)

como la producción específica de polímero (Fig. 5.5.) aumentaron directamente con el incremento de la concentración de sustrato (28% y 0,14 Cmmol HA/CmmolX y 39% y 0,43 Cmmol HA/CmmolX para 57 y 109 Cmmol/L, respectivamente). Sin embargo, el rendimiento de almacenamiento solo aumentó desde 0,35 a 0,43 Cmmol HA/Cmmol AGV con el aumento de la concentración de sustrato desde 57 a 79 Cmmol/L, cayendo a un valor de 0,39 Cmmol HA/Cmmol AGV con el posterior incremento a 109 Cmmol/L.

El rendimiento de respiración presentó valores similares para las tres concentraciones de AGV probadas, mientras que el rendimiento de crecimiento celular disminuyó su valor desde 0,1 a 0,06 Cmmol X/Cmmol AGV con el aumento de la concentración de sustrato.

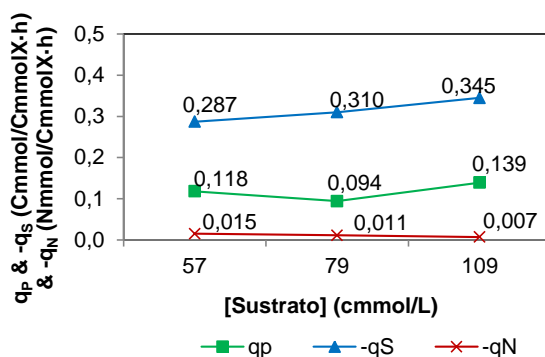


Fig. 5.4. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes concentraciones de sustrato.

Como se puede apreciar en la Fig. 5.4., la velocidad específica de consumo de sustrato aumentó con el aumento de la concentración de AGV. La velocidad específica de consumo de nitrógeno y la velocidad específica de producción de polímero se vieron también afectadas por la concentración de sustrato. De esta manera, el aumento de la concentración de sustrato condujo a un aumento de la velocidad específica de producción de polímero y a un descenso en la velocidad específica de consumo de nitrógeno. Es por esto que, se puede afirmar que bajas concentraciones de sustrato parecieron favorecer el crecimiento celular.

En el ensayo desarrollado a una concentración de sustrato de 57 Cmmol/L, tanto el nitrógeno como el carbono fueron consumidos prácticamente al mismo tiempo, por lo que el sustrato fue usado simultáneamente tanto en el proceso de crecimiento celular como en el proceso de acumulación de reservas internas. En los ensayos realizados con concentraciones de sustrato de 79 y 109 Cmmol/L, el nitrógeno fue eliminado del medio en la mitad de tiempo que el carbono. Una vez que el nitrógeno fue completamente consumido, el proceso de crecimiento celular cesó, dejando carbón disponible para el proceso de acumulación de reservas internas.

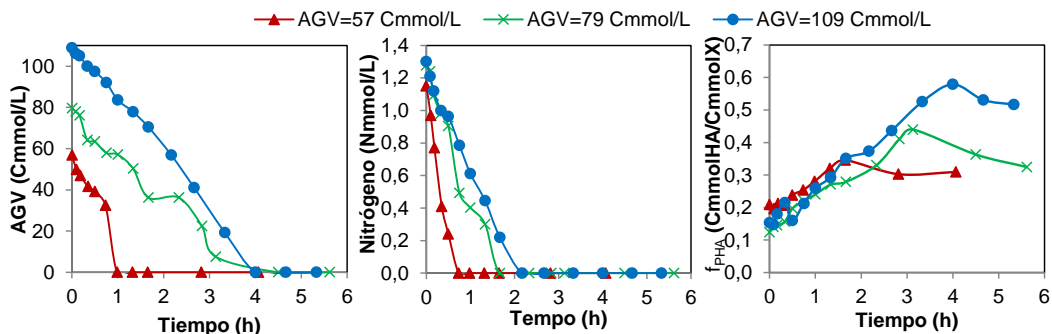


Fig. 5.5. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.

Aunque algunos autores observaron inhibición por sustrato al alimentar altas concentración de AGV en un solo pulso, en este trabajo no fue apreciado.

Serafim *et al.* (2004) observó al aumentar la concentración de acetato alimentado desde 90 a 180 Cmmol/L una disminución del rendimiento de almacenamiento (desde 0,79 a 0,70 Cmmol HA/Cmmol AGV). Al analizar las velocidades del sistema, ellos observaron una lenta velocidad de almacenamiento de polímero durante las primeras horas del ensayo realizado con una concentración de sustrato de 180 Cmmol/L.

Albuquerque *et al.* (2007), usando melazas fermentadas como sustrato, observó un aumento del rendimiento de almacenamiento desde 0,44 a 0,59 Cmmol HA/Cmmol AGV cuando la concentración de sustrato fue reducida desde 91 a 61 Cmmol/L. Aunque ellos no constataron una variación en la velocidad de consumo de sustrato ni en la velocidad de producción de polímero, sí que observaron que los AGV no eran

inmediatamente consumidos después de la adición del pulso de sustrato, sino que había un período de retraso en el que los AGV fueron apenas consumidos.

Ninguna de las evidencias observadas por estos autores fue observada en este trabajo. Sin embargo, sí se apreció que la velocidad de acumulación de polímero disminuyó ligeramente en las últimas horas del período de feast, coincidiendo con la desaparición del nitrógeno del medio (Fig. 5.5.). Este comportamiento podría estar indicando la saturación de la capacidad de la biomasa para almacenar polímero. Este comportamiento también fue observado por Dionisi *et. al.* (2005) cuando estudió el efecto de la concentración de nitrógeno en el proceso de almacenamiento de PHA.

5.3.3. Efecto de la temperatura.

En este apartado se pretendió estudiar el efecto de la temperatura en el proceso de almacenamiento de PHA, para ello se realizaron dos ensayos: a 15 °C (baja temperatura) y a 30°C (alta temperatura). Los resultados obtenidos en estos ensayos con control de temperatura fueron contrastados con los de un ensayo realizado sin control de temperatura (la temperatura fluctuó libremente desde un valor inicial de 15°C coincidiendo con la descarga de medio refrigerado en el reactor a una temperatura final de 25-28°C).

El control de la temperatura a 15 y 30°C resultó en una disminución de la cantidad de PHA almacenada con respecto al ensayo realizado sin control de temperatura. Los valores de contenido de PHA en lodo alcanzados a 15 y 30°C fueron 23 y 19%, respectivamente; los cuales fueron más bajos que el obtenido cuando la temperatura fluctuó libremente (29%) (Fig. 5.6.).

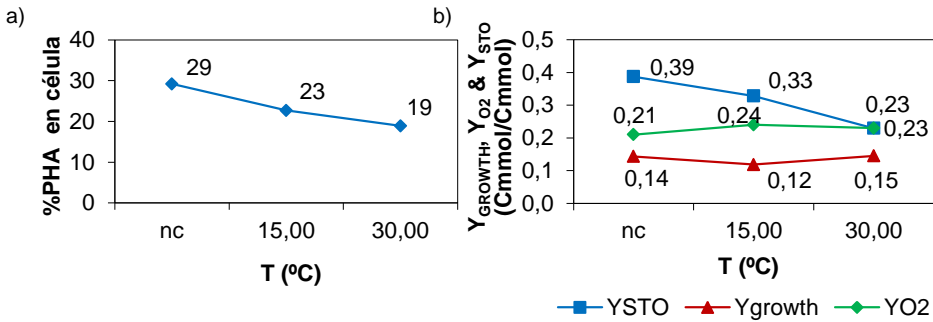


Fig. 5.6. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes temperaturas.

De la misma manera, el máximo rendimiento de almacenamiento fue alcanzado cuando la temperatura no se controló (0,39 Cmmol HA/Cmmol AGV). El control de temperatura a 15°C (0,33 Cmmol HA/Cmmol AGV) permitió obtener un rendimiento de almacenamiento más alto que a 30°C (0,23 Cmmol HA/Cmmol AGV).

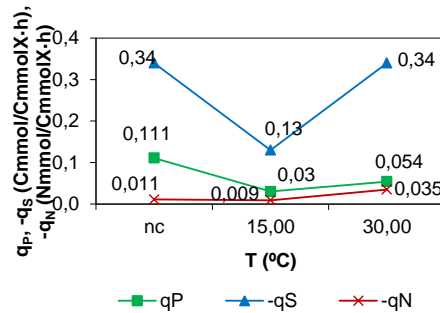


Fig. 5.7. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes temperaturas.

Las velocidades específicas ($-q_S$, q_P , $-q_N$) del proceso se vieron afectadas a bajas temperaturas (15°C), siendo mucho más bajas que aquellas obtenidas a 30°C o sin control de temperatura (Fig. 5.7.). En el ensayo sin control de temperatura así como en el realizado a 30°C se observó la misma velocidad específica de consumo de sustrato. Sin embargo el control de temperatura a 30°C llevó a un incremento de la velocidad específica de consumo de nitrógeno así como a una disminución de la velocidad específica de producción de polímero con respecto al ensayo realizado sin control de temperatura. A las vista de los hechos se puede concluir que altas temperaturas (30°C) beneficiaron el crecimiento celular. (Fig. 5.7.). Como se muestra en la Fig. 5.8., cuando la temperatura no fue controlada, tanto el nitrógeno como el sustrato fueron consumidos simultáneamente, sin embargo, en el ensayo desarrollado

a 30°C, el nitrógeno fue consumido mucho más rápido que el carbono, siendo de esta manera dirigida una mayor fracción de carbono hacia el proceso de crecimiento celular en las primeras horas del período de feast.

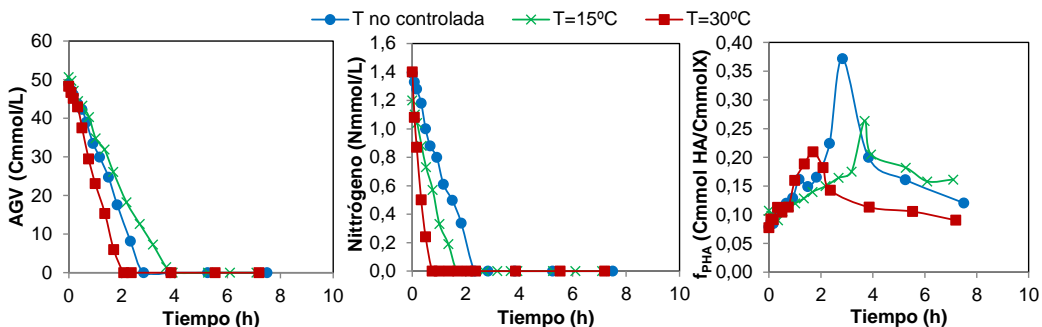


Fig. 5.8. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.

Johnson *et al.* (2010a) estudió los efectos de la temperatura a corto y largo plazo en la producción de PHA empleando cultivos mixtos. Ellos observaron que los cambios de temperatura a corto plazo solo influían en las velocidades de reacción pero no en la máxima capacidad de acumulación del cultivo mixto (el rendimiento de almacenamiento permanecía prácticamente constante para valores de 0,5 Cmol HA/Cmol AGV en los ensayos realizados a diferentes valores de temperatura). Por otro lado, los cambios de temperatura a largo plazo conducían a la adaptación celular del lodo modificando tanto las velocidades de reacción como la capacidad acumuladora del lodo.

Estos resultados son contrarios a los resultados descritos en este trabajo ya que, el estudio del efecto de la temperatura a corto plazo no solo se afectó a las velocidades específicas del proceso, sino que también afectó a la capacidad acumuladora del lodo. Esta diferencia observada entre los resultados obtenidos en este trabajo y los observados por Johnson *et al.* (2010a) podría ser debido a las diferentes condiciones operacionales aplicadas durante la etapa de enriquecimiento del lodo. A diferencia de Johnson *et al.* (2010a) quienes trabajaron bajo condiciones de limitación de carbono (los nutrientes no estaban limitados en el medio) durante la etapa de enriquecimiento del lodo, en este trabajo el reactor fue operado bajo una

limitación de nitrógeno. La relación C/N usada en este trabajo para operar el SBR de enriquecimiento fue de 30/1,4, mientras que Johnson *et al.* (2010a) empleó una relación C/N de 54/6,75. Johnson *et al.* (2010b) observó que bajo condiciones limitantes de carbono la competencia en el SBR se basaba en la velocidad de consumo de sustrato conduciendo a altas velocidades específicas de consumo de sustrato, mientras que bajo condiciones limitantes de nitrógeno la competencia era basada en la velocidad específica de nitrógeno la cual se observó que aumentaba. Es posible que las condiciones aplicadas al SBR de enriquecimiento estuvieran seleccionando una biomasa cuya respuesta principal fuese el crecimiento celular en lugar de la acumulación de reservas. Es por esto que, cuando son aplicadas condiciones favorables al crecimiento (como pueden ser altas temperaturas) en la etapa de producción de PHA se vea potenciado el crecimiento celular.

5.3.4. Efecto del pH.

Los procesos biológicos tienen un valor de pH para el cual el rendimiento del proceso es óptimo. En general, el pH óptimo depende de los microorganismos que desarrollan el proceso. Por este motivo, el pH es uno de los parámetros clave en los procesos empleando lodos activos, permitiendo en muchos casos incrementar la actividad de unos microorganismos frente a otros.

Es por esto que en esta parte del trabajo se plantea el estudio del efecto de este parámetro tratando de determinar si el control de pH a un valor neutro o básico favorecería la producción de PHA. Para ello dos ensayos a diferentes valores de pH (7 y 9) son realizados. Los resultados derivados de estos ensayos fueron comparados con los obtenidos en un ensayo desarrollado sin control de pH (el pH varió libremente comenzando en un pH próximo a 8 justo después de la adición del pulso de sustrato y aumentando hasta un valor próximo a 10 al final de la fase de *feast*). Las variaciones en el contenido de PHA en célula y del rendimiento de almacenamiento con el valor de pH son representadas en la Fig. 5.9.

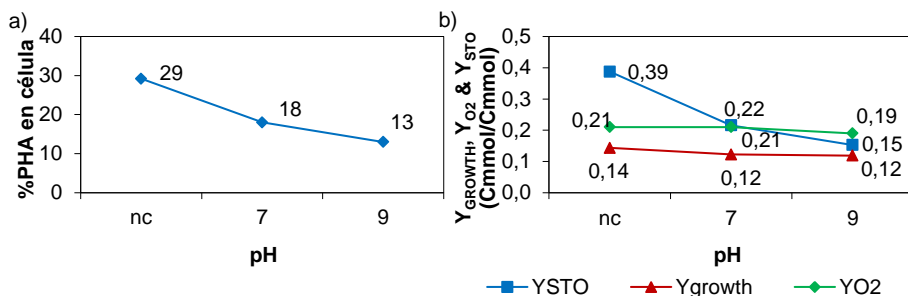


Fig. 5.9. a) %PHA en célula y b) Y_{STO} , Y_{O_2} y Y_{GROWTH} obtenidos para diferentes valores de pH.

Los dos intentos por controlar el pH resultaron en una disminución de la cantidad de PHA almacenada. El contenido de PHA obtenido para un valor de pH de 7 y 9 fueron, respectivamente, 18 y 13%, los cuales fueron mucho más bajos que el valor observado en el ensayo realizado sin control de pH (29%). El rendimiento de acumulación de polímero fue mayor en el ensayo sin control de pH (0,39 Cmmol HA/Cmmol AGV) que en los ensayos con control de pH a 7 (0,22 Cmmol HA/Cmmol AGV) y 9 (0,15 Cmmol HA/Cmmol AGV). Los rendimientos de crecimiento y de respiración mostraron valores similares en los tres ensayos (Fig. 5.9.).

Todas las velocidades específicas ($-q_S$, q_P , $-q_N$) fueron más bajas a pH 9 que a pH 7,0 (Fig. 5.10.), a pesar de la mayor concentración de biomasa activa inicial presente en el ensayo realizado a pH 9,0 (66 y 81 CmmolX/L a pH 7 y 9, respectivamente). Este hecho podría indicar una disminución de la actividad celular causada por el alto valor de pH. Este valor es ligeramente más bajo que los valores encontrados por Dionisi *et al.* (2005) (10,5) y Villano *et al.* (2010) (9,5), sin embargo, estos autores desarrollaron sus trabajos empleando un medio sintético, mientras que en este trabajo se usó un agua residual.

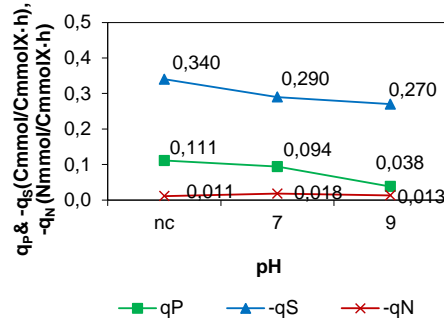


Fig. 5.10. Velocidades de consumo de sustrato y nitrógeno y de producción de HA obtenidas para diferentes valores de pH.

La mayor velocidad específica de consumo de nitrógeno (0,018 Nmmol/CmmolX·h) y la menor velocidad específica de producción de polímero (0,094 Cmmol HA/CmmolX·h) observadas para el ensayo realizado a un valor de pH 7,0 con respecto de aquel sin control de pH (0,011 Nmmol/CmmolX·h y 0,111 Cmmol HA/CmmolX·h) indican que el crecimiento celular se vio favorecido a pH neutro (Fig. 5.10.). Como se puede observar en la Fig. 5.11, cuando el pH no fue controlado o se controló a un valor de 9 el consumo de carbono y el de nitrógeno fue simultáneo. En el ensayo desarrollado a un valor de pH de 7, el nitrógeno fue consumido dos veces más rápido que el carbono, sin embargo, la velocidad de producción específica de polímero permaneció prácticamente constante cuando esta es comparada con la observada en el ensayo realizado sin control de pH.

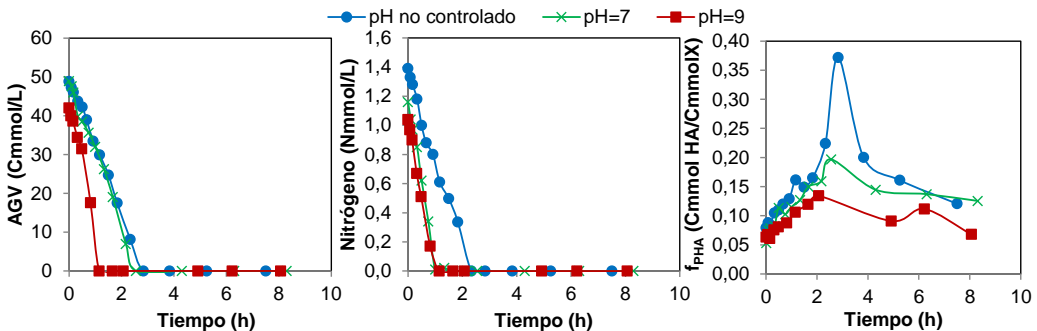


Fig. 5.11. Perfiles del consumo de sustrato y nitrógeno y de la producción específica de polímero.

Este aumento en la velocidad de crecimiento celular con el pH pudo estar promovido como consecuencia de la estrategia seguida en la etapa de selección del lodo. Durante la etapa de enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras, el

nitrógeno adicionado al medio fue completamente consumido en el período de feast, por lo que durante el período de famine, el polímero almacenado fue usado solo en procesos de mantenimiento celular. Este hecho hace que las bacterias con capacidad acumuladora pierdan su ventaja competitiva frente a las bacterias sin capacidad acumuladora. Ambos grupos de bacterias tienen que competir por el carbono y el nitrógeno durante el período de feast para poder crecer. Esta estrategia para seleccionar el lodo podría estar favoreciendo el desarrollo de una biomasa con una mayor respuesta hacia el crecimiento celular que hacia la acumulación de reservas internas (Johnson *et al.* 2010b).

5.4. Conclusiones.

En este trabajo se llevó a cabo el enriquecimiento de un cultivo mixto en un SBR alimentado con agua residual de cervecera fermentada. El proceso fue estable en el tiempo, permitiendo obtener un lodo selectivo con alta capacidad acumuladora (rendimiento de almacenamiento de 0,4 Cmmol HA/Cmmol AGV y contenido de PHA en célula del 35%). La manipulación de los diferentes parámetros (concentración de sustrato, pH, temperatura,) en la etapa de producción de PHA permitió optimizar el proceso, siendo obtenidos mayores contenidos de HA en célula así como mayores rendimientos de almacenamiento. Los principales logros de este trabajo son resumidos a continuación:

- El aumento de la concentración de sustrato alimentado desde 57 a 109 Cmmol/L condujo a un aumento del contenido de PHA en célula desde el 28 al 39%. El rendimiento de almacenamiento, sin embargo, solo mejoró con el aumento de la concentración de sustrato alimentado desde 57 a 79 Cmmol/L, siendo alcanzados valores de 0,35 y 0,43 Cmmol HA/Cmmol AGV a 57 y 79 Cmmol/L, respectivamente. El bajo rendimiento de almacenamiento obtenido para la concentración de sustrato más alta (0,39 Cmmol HA/Cmmol AGV) podría ser debido a una saturación en la capacidad acumuladora de la biomasa.
- La operación a altas temperaturas (30 °C) favoreció el crecimiento celular frente al almacenamiento de PHA. El control de la temperatura a valores más bajos (15°C) permitió la mejora del proceso con respecto a la operación a

30°C. Sin embargo, los mejores resultados fueron alcanzados cuando la temperatura no se controló (variando desde 15 a 25-28 °C).

- El control de pH no favoreció el proceso de producción de PHA, siendo obtenidos contenidos de PHA y rendimiento de almacenamiento más bajos cuando el pH se controló a un valor de 7 (18% y 0,22 Cmmol HA/Cmmol AGV) o 9 (13% y 0,15 Cmmol HA/Cmmol AGV) que cuando se dejó variar libremente (29% y 0,39 Cmmol HA/Cmmol AGV). El descenso de las velocidades del proceso durante el ensayo realizado a pH 9 podría indicar una inhibición celular causado por el alto valor de pH. El control del pH a un valor neutro (7) llevó a un ligero aumento de la velocidad de crecimiento de la biomasa.
- La etapa de enriquecimiento de la biomasa parece jugar un papel crucial en el proceso. Para el enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras se siguió una estrategia basada en la limitación de nutrientes; los nutrientes se agotan durante la fase de feast. Esta estrategia no solo no favorece la competición por el carbono sino que favorece la competición por el nitrógeno lo que favorece el crecimiento celular frente a la acumulación de reservas. Es por esto que al aplicar condiciones favorables al crecimiento como pueden ser valores de pH neutros (valor de pH 7) o altas temperaturas (30°) se observa un aumento en la velocidad de consumo de nitrógeno junto a una disminución en la velocidad de producción de polímero.

5.5. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Chua, A. S. M.; Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, **37**, 3602-3611.
- Dionisi, D.; Beccari, M.; Di Gregorio, S.; Majone, M., Papini, M. P. and Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by enrichment microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 1306-1318.
- Johnson, K.; Van Geest, J.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures". *Water Research*, **44**, 1689-1700.
- Johnson, K.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2010)b. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at shorts SRTs. *Water Research*, **44**, 2141-2152.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2), 145-160.
- Third, K. A.; Newland, M.; Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, **82** (2), 238-250.
- Villano, M.; Beccari, M.; Dionisi, D.; Lampis, S.; Miccheli, A.; VAllini, G.; Majone, M. (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by

mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochemistry*, **45**, 714-72.

6. Efecto de la VCO en el enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras

6.1. Resumen.

En los capítulos anteriores se pudo observar la importancia de la etapa de enriquecimiento del lodo, ya que esta ejerce una gran influencia en los parámetros operacionales óptimos que deben ser aplicados durante la etapa de producción de polímeros.

El ajuste de las condiciones operacionales es un factor clave en la selección de una biomasa con alta capacidad de acumulación. La relación C/N/P, la longitud del ciclo, el TRS, la VCO, el pH entre otros factores pueden regular la respuesta de acumulación frente a la respuesta de crecimiento en un cultivo seleccionado bajo condiciones ADF (Johnson *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011; Chua *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2010; Oehmen *et al.*, 2014).

En este caso, se intentó mejorar la capacidad de acumulación de un cultivo mixto mediante la variación de la VCO en la etapa de enriquecimiento del lodo siendo aplicadas condiciones favorables y desfavorables al crecimiento.

La decisión de estudiar el proceso bajo condiciones limitantes y no limitantes del crecimiento surge como una necesidad ante los dispares resultados encontrados en la bibliografía. De esta forma se encuentran trabajos en los cuales se obtienen buenos resultados mediante la aplicación de condiciones limitantes de nutrientes esenciales en la etapa de enriquecimiento del lodo (Serafim *et al.*, 2004 y Basak *et al.*, 2011), mientras que en otros casos se observa una gran mejoría del proceso cuando los nutrientes no son limitados en el medio durante esta etapa (Albuquerque *et al.*, 2010 y Johnson *et al.*, 2009).

Las condiciones limitantes del crecimiento se caracterizaron por la limitación de nutrientes (altas relaciones C/N/P) y la operación del reactor sin control de temperatura (la temperatura varió libremente desde 15°C después de la adición del pulso de sustrato hasta 25-28°C al final del ciclo) mientras que las condiciones no limitantes del crecimiento celular se basaron en el control de la temperatura del reactor a 30°C y la aplicación de condiciones limitantes de carbono (bajas relaciones C/N/P).

6.2. Sistema experimental.

6.2.1. Fermentación acidogénica.

La fermentación acidogénica fue llevada a cabo en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) con un volumen útil de 1,6L y un decantador de 0,8L. El reactor fue inoculado con biomasa procedente del reactor anaerobio de la planta depuradora de una industria productora de cerveza. La temperatura del reactor se controló para un valor de 37°C. El TRH se fijó en 0,9 d resultando en una VCO promedio de 4900 mg DQO/L·d. El pH se controló para un valor de 6,2 mediante la adición de NaOH 2M.

El sistema fue alimentado con agua residual de cervecera. La adición de nutrientes no fue necesaria ya que estuvieron presentes en el agua residual en una concentración suficientemente alta para el crecimiento de la biomasa. El agua residual fue decantada antes de ser introducida en el reactor para de esta manera eliminar los sólidos inorgánicos procedentes de la etapa de clarificación del proceso productivo de la cerveza (tierras de diatomeas).

Los principales productos de la fermentación fueron los AGV (acetato, propionato, butirato y n-valerato), correspondiéndose con el 60% de la conversión de la DQO total del influente en AGV. El efluente fue recogido por desborde y filtrado a través de un filtro con tamaño de poro de 1 μ m de diámetro. El efluente clarificado fue mantenido refrigerado a 4°C para posteriormente ser empleado como alimento en la etapa de selección de un cultivo acumulador de PHA.

6.2.2. Sequencing batch reactor (SBR).

Un cultivo activo enriquecido en bacterias acumuladoras y aclimatado a un agua residual de cervecera fermentada fue inoculado en un reactor SBR de 1 L de volumen útil. El SBR fue operado bajo condiciones ADF, alternando cortos y largos períodos de exceso y ausencia de sustrato, respectivamente. Se aplicó un ciclo de 12 horas el cual consistió en tres etapas: reacción aerobia (11 horas), decantación (0,8 hora) y descarga de efluente (0,2 horas). El medio descargado fue sustituido por medio fresco durante los dos primeros minutos de la etapa aerobia. Los TRH y TRS fueron 1 y 6 d, respectivamente. El aire fue suministrado a un flujo de 1 vvm. No se controló el pH en el reactor, sin embargo se siguió su evolución mediante el empleo de una sonda de pH. El reactor fue alimentado con agua residual fermentada procedente del

reactor acidogénico previamente descrito, al cual se le adicionó nitrógeno y en ocasiones AGV para obtener la concentración deseada al comienzo del ciclo. La nitrificación fue inhibida mediante la adición de tiourea.

En la operación del reactor bajo condiciones limitantes del crecimiento, la temperatura no fue controlada fluctuando desde valores próximos a 15°C después de alimentar el pulso de sustrato hasta valores en torno a 25-28°C al final del ciclo. Las concentraciones de AGV empleadas en estos ensayos fueron 20, 30 y 40 Cmmol/L resultando en valores de VCO de 40, 60 y 80 Cmmol/L-d. La relación C/N se mantuvo próxima a 14. No se adicionó fósforo al medio estando presente en el efluente acidogénico para una concentración de 0,16 Pmmol/L. Los parámetros operacionales empleados durante el ensayo se describen en detalle en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Parámetros operacionales del reactor SBR estándar operado a diferentes VCO bajo condiciones limitantes del crecimiento celular.

VCO	F/F	X	C ₀	N ₀	C/P	N/P	%			
		Cmmol/L	Cmmol/L	Nmmol/L			HAc	HPr	HBu	HVal
40 Cmmol/L-d	0,19 (0,08)	35 (10)	20 (9)	1,6 (0,7)	251(106)	20 (9)	52 (8)	13 (4)	19 (3)	16 (4)
60 Cmmol/L-d	0,31 (0,07)	77 (23)	29 (3)	1,6 (0,6)	360 (40)	21 (7)	55 (2)	13 (5)	18 (2)	13 (3)
80 Cmmol/L-d	0,31 (0,09)	62 (17)	41 (6)	2,7 (0,4)	517 (75)	34 (5)	57 (3)	15 (5)	14 (2)	13 (1)

(F/F ratio: relación feast and famine; X₀: biomasa active inicial; C₀: concentración de carbono inicial; N₀ concentración de nitrógeno inicial; C/P: relación carbono/nitrógeno; N/P: relación nitrógeno/fósforo).

En la operación del reactor bajo condiciones no limitantes del crecimiento, la temperatura del reactor fue controlada y mantenida a 30°C con la ayuda de un baño termostático. Las concentraciones de AGV empleadas en este ensayos fueron 50, 60 y 70 Cmmol/L resultando en valores de VCO de 100, 120 y 140 Cmmol/L-d. La relación C/N/P se mantuvo próxima a 15/1,5/1. Los parámetros operacionales empleados durante el ensayo se describen en detalle en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Parámetros operacionales del reactor SBR estándar operado a diferentes VCO bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular.

VCO	F/F	X	C ₀	N ₀	P ₀	C/P	N/P	%			
		Cmmol/L	Cmmol/L	Nmmol/L	Pmmol/L			HAc	HPr	HBu	HVal
100 Cmmol/L·d	0,13 (0,05)	69 (12)	50 (3)	8 (1)	5 (0,6)	11 (1)	2 (0,3)	63 (2)	12 (2)	13 (3)	12 (1)
120 Cmmol/L·d	0,10 (0,07)	144 (38)	58 (3)	8 (2)	4 (0,5)	15 (3)	2 (0,3)	64 (3)	10 (1)	14 (2)	12 (2)
140 Cmmol/L·d	0,12 (0,04)	98 (13)	71 (3)	8 (1)	4 (0,5)	16 (2)	2 (0,2)	63 (3)	10 (2)	14 (2)	13 (1)

(F/F ratio: relación feast and famine; X₀: biomasa active inicial; C₀: concentración de carbono inicial; N₀ concentración de nitrógeno inicial; C/P: relación carbono/nitrógeno; N/P: relación nitrógeno/fósforo).

Para comprobar la capacidad acumuladora del lodo, una vez que la operación del reactor fue estable en el tiempo, éste se alimentó en modo discontinuo. Estos ensayos fueron realizados sin la adición de amonio ni de fósforo y con una concentración inicial de sustrato de 50 Cmmol/L. Las condiciones operacionales empleadas fueron las mismas que aquellas usadas durante la operación del SBR estándar.

6.3. Resultados y discusión.

6.3.1. Condiciones limitantes del crecimiento celular.

6.3.1.1. Etapa de enriquecimiento del lodo.

Para estudiar el efecto de la VCO en la etapa de enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras, inicialmente, la concentración de sustrato fue fijada en 20 Cmmol/L (40 Cmmol/L·d), posteriormente se incrementó hasta 40 (80 Cmmol/L·d) y finalmente se disminuyó a 30 Cmmol/L (60 Cmmol/L·d).

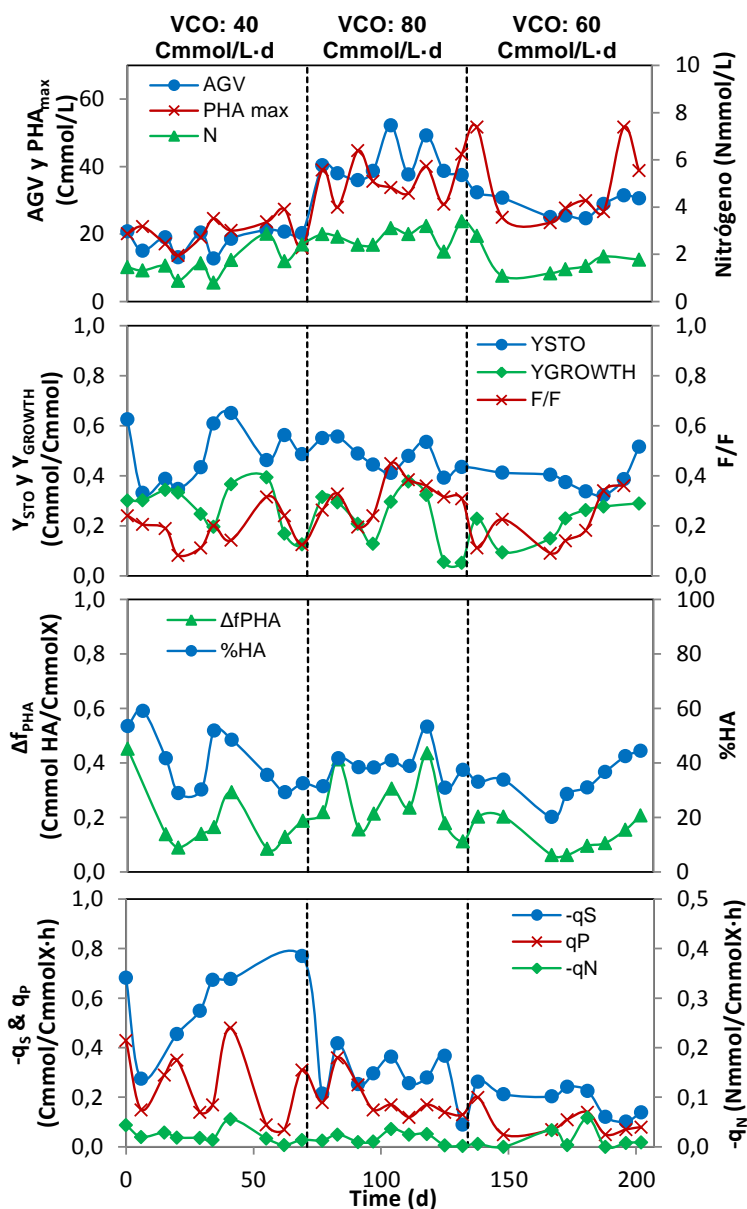


Fig. 6.1. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).

La evolución del reactor operado bajo diferentes velocidades de carga orgánica fue controlada en el tiempo y para ello se realizaron seguimientos semanales de los ciclos del SBR. Los parámetros analizados fueron el consumo de AGV y de nitrógeno,

así como la producción de PHA y de biomasa. El rendimiento de acumulación y de crecimiento y las velocidades del proceso (velocidad de consumo de sustrato y nitrógeno, y velocidad de producción de polímero) fueron calculados para la fase de feast de cada uno de los ciclos del SBR (Fig. 6.1.).

Como se muestra en la Fig. 6.1., el incremento de la VCO desde 40 Cmmol/L a 80 Cmmol/L-d llevó a un aumento en la relación feast/famine (F/F) desde un valor promedio de 0,19 a un valor promedio de 0,31, a pesar del aumento de la concentración de biomasa observado con el aumento VCO (desde 1,37 g/l a 2,25 g/l). La posterior disminución de la VCO hasta 60 Cmmol/L-d no afectó a la relación F/F manteniéndose en valores similares a los obtenidos a 80 Cmmol/L-d (valores oscilando entre 0,2 y 0,4). Sin embargo, las variaciones observadas en la relación F/F parecieron no afectar a la capacidad acumuladora del lodo ya que tanto el rendimiento de almacenamiento como el contenido de PHA por peso seco de célula se mantuvieron en valores similares para las diferentes VCO estudiadas. El rendimiento de almacenamiento y el contenido de PHA por peso seco de célula observados en todos los períodos fueron próximos a 0,4-0,5 Cmmol HA/Cmmol AGV y 34-46%, respectivamente (Fig. 6.1.).

La velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_s$) y la velocidad específica de producción de polímero fueron máximas cuando se operó a una VCO de 40 Cmmol/L-d (valores promedio de 0,62 Cmmol AGV/CmmolX·h y 0,29 Cmmol HA/CmmolX·h, respectivamente). La velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) presentó valores similares y cercanos a 0,02 Nmmol/CmmolX·h para las tres VCO ensayadas.

6.3.1.2. Ensayos batch.

Una vez que la operación del reactor fue estable en el tiempo se realizaron varios ensayos batch para de esta manera determinar el potencial acumulador del cultivo enriquecido. Para la realización de estos ensayos no se adicionaron nutrientes en el medio, siendo estos proporcionados por el efluente acidogénico; el nitrógeno adicionado durante la operación del SBR fue completamente consumido durante la fase de feast. La concentración de nitrógeno durante los ensayos batch fue del orden de 0,13-0,83 Nmmol/L.

En la Tabla 6.3 se muestran los resultados más relevantes obtenidos en los ensayos realizados con lodo enriquecido bajo condiciones limitantes del crecimiento celular.

Tabla 6.3. Resultados más relevantes obtenidos en los fedbatchs.

Condiciones	HA	Δf_{PHA}	Y_{STO}	Y_{GROWTH}	% Composición polímero	
	%	CmmolHA/CmmolX	CmmolHA/Cmmol	Cmmol/Cmmol	HB	HV
40 Cmmol/L·d	57 (3)	0,57 (0,06)	0,24 (0,09)	0,02 (0,01)	78 (3)	22 (3)
60 Cmmol/L·d	37 (3)	0,27 (0,10)	0,34 (0,03)	0,01 (0,01)	86 (3)	14 (3)
80 Cmmol/L·d	42 (3)	0,38 (0,01)	0,42 (0,06)	0,05 (0,01)	73 (3)	27 (3)

(Δf_{PHA} : producción específica de polímero; Y_{STO} : rendimiento de producción de polímero; Y_{GROWTH} : rendimiento de crecimiento). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Como se puede apreciar en la Tabla 6.3, los mejores resultados, en cuanto al contenido de PHA en célula se refiere, son obtenidos cuando la VCO fue fijada en 40 Cmmol/L·d (57%). El posterior aumento de la VCO a 80 y 60 Cmmol/L llevó a una reducción en el valor de este parámetro a valores del 42 y el 37%, respectivamente. La máxima producción específica de polímero (Δf_{PHA}) (0,57 Cmmol HA/CmmolX) fue también obtenida con el lodo enriquecido para una VCO de 40 Cmmol/L·d (Tabla 6.3).

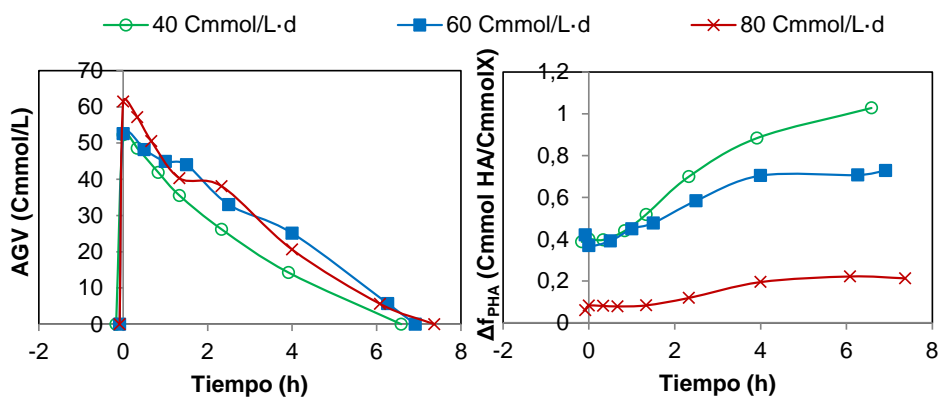


Fig. 6.2. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero.

En la Fig. 6.2. se muestran los perfiles de consumo de sustrato y de la fracción de polímero en la biomasa obtenidos durante los ensayos batch realizados con lodo seleccionado bajo diferentes VCO y operado bajo condiciones limitantes del

crecimiento celular. Como se puede observar, en todos los casos, el consumo de sustrato fue muy lento (un solo pulso de sustrato con una concentración de 50 Cmmol-AGV/L duró 7 horas), lo cual hizo imposible alimentar más de un pulso (alimentación por pulsos) para de esta manera poder aumentar la productividad del proceso. Por otro lado, en las primeras horas del batch, se observó una velocidad de producción de polímero lenta, la cual pudo ser debida a la saturación de la célula en polímero. Como se puede apreciar en la Fig. 6.2., la fracción de PHA en la célula al comienzo del ensayo era alta (valores próximos a 0,4 Cmmol HA/CmmolX) en los ensayos realizados con biomasa seleccionada a VCO de 40 y 60 Cmmol/L-d.

En todos los ensayos, se obtuvieron copolímeros de hidroxibutirato y hidroxivalerato (P(HB:HV)) con composiciones en el rango de 73:27 a 86:14 (%HB:%HV).

6.3.2. Condiciones no limitantes del crecimiento celular.

6.3.2.1. Etapa de enriquecimiento del lodo.

Para estudiar el efecto de la VCO en la etapa de enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras bajo condiciones no limitantes del crecimiento, se comenzó a controlar la temperatura a 30°C y se disminuyó la relación C/N/P hasta alcanzar un valor 15/1,5/1.

El aumento de temperatura y la mayor presencia de nutrientes en el medio llevó al aumento de las velocidades específicas del proceso por lo que se decidió fijar la concentración de sustrato en un valor más alto que los aplicados para el ensayo realizado bajo condiciones desfavorables para el crecimiento celular. La concentración de sustrato fue fijada en 50 Cmmol/L (100 Cmmol/L-d) y posteriormente se incrementó hasta 60 (120 Cmmol/L-d) y 70 Cmmol/L (140 Cmmol/L-d).

La operación del reactor empleando diferentes velocidades de carga orgánica fue seguida en el tiempo mediante el análisis semanal del consumo de AGV y de nitrógeno, así como la producción de PHA y de biomasa a lo largo del ciclo del SBR. Con los datos obtenidos en la fase de feast se calcularon los rendimientos de

acumulación y de crecimiento, así como las velocidades del proceso (velocidad de consumo de sustrato y nitrógeno, y velocidad de producción de polímero) (Fig. 6.3).

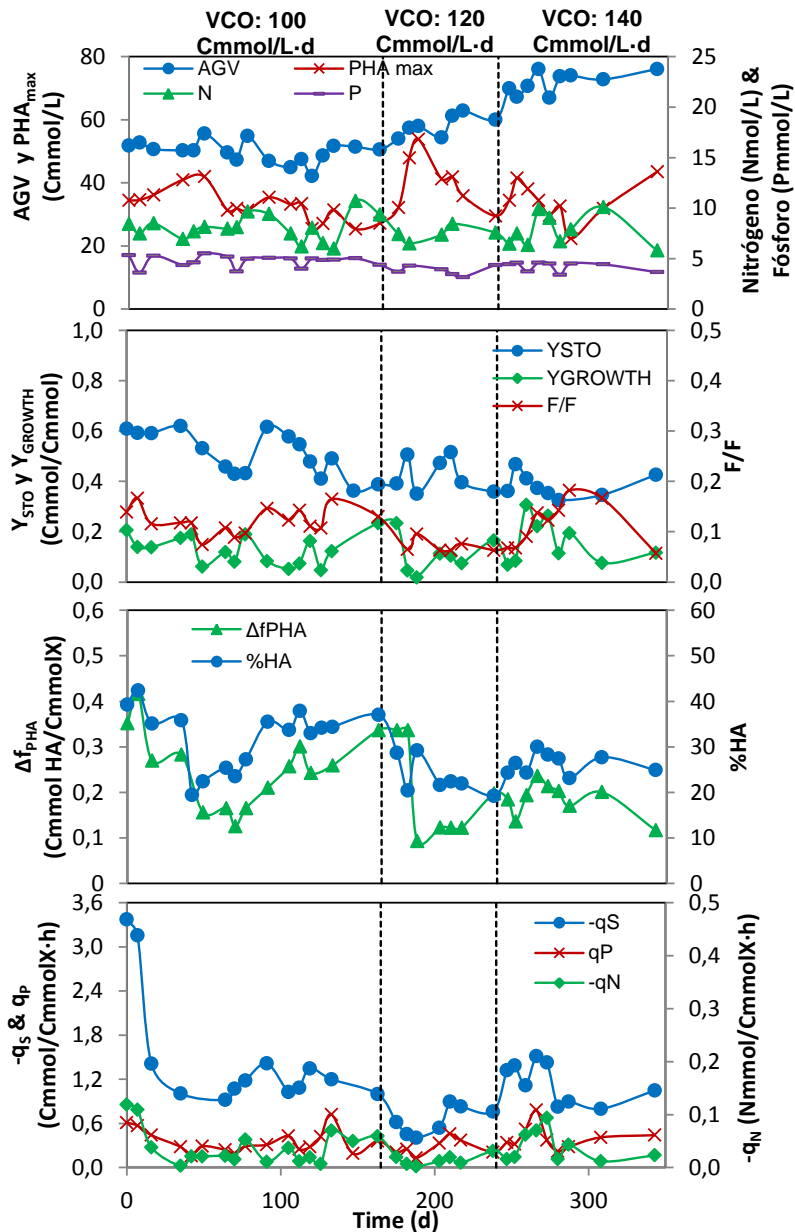


Fig. 6.3. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).

Como se muestra en la Fig. 6.3., el incremento de la VCO desde 100 Cmmol/L-d a 140 Cmmol/L-d, a diferencia del ensayo realizado bajo condiciones desfavorables al crecimiento, no resultó en un aumento en la relación feast/famine (F/F) la cual se mantuvo por debajo de 0,2. Sin embargo, se observó una disminución del rendimiento de almacenamiento y una disminución del contenido de PHA en célula con el aumento de la velocidad de carga orgánica desde 100 a 140 Cmmol/L-d (Fig. 6.3).

La velocidad específica de consumo de sustrato y la velocidad específica de producción de polímero fueron mayores que las observadas bajo condiciones limitantes del crecimiento, siendo bastante similares para las tres VCO estudiadas. La velocidad específica de consumo de nitrógeno presentó valores similares, oscilando entre 0,01 y 0,05 Nmmol/CmmolX-h, para las tres concentraciones de sustrato ensayadas (Fig. 6.3).

6.3.2.2. Ensayos batch.

Para poder determinar el potencial acumulador del cultivo enriquecido se realizaron varios ensayos batch. Durante la realización de estos ensayos no se adicionaron nutrientes al medio. El nitrógeno presente en estos ensayos procedió del excedente de nutrientes del ciclo anterior presente en el reactor, situándose su concentración en el rango 1,6-3,8 Nmmol/L.

Las mayores velocidades de consumo de sustrato observadas en la etapa de enriquecimiento del lodo bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular nos permitieron realizar ensayos batch con la adición de sustrato en varios pulsos para de esta manera incrementar la productividad del proceso.

En la Fig. 6.4. se muestran los perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero observados en los ensayos batch realizados con el lodo seleccionado a diferentes VCO y operado bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular. La saturación de la capacidad de acumulación de las células, en todos los casos, fue indicado por una disminución de la velocidad de consumo de sustrato. Como se puede apreciar en la Fig 6.4., el consumo de sustrato en el último pulso realizado en los ensayos batch duró aproximadamente el doble que los otros pulsos.

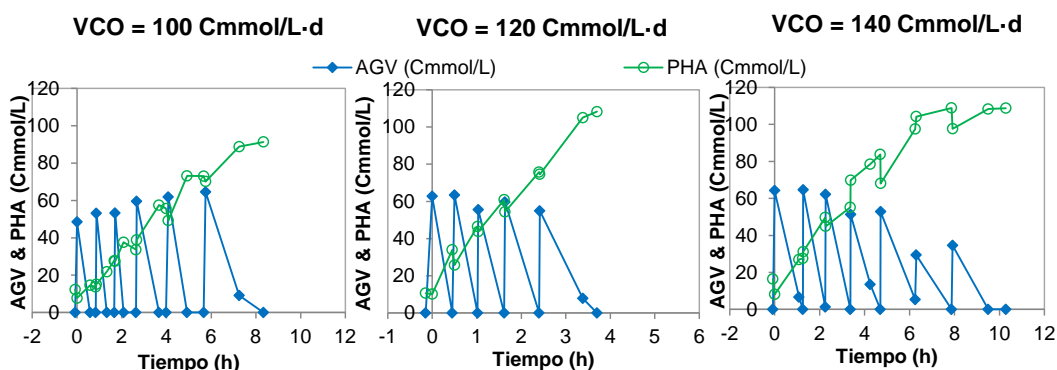


Fig. 6.4. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero observados en los ensayos batch.

Tabla 6.4. Resultados más relevantes obtenidos en los ensayos batch.

Condiciones	HA	Δf_{PHA}	Y_{STO}	Y_{GROWTH}	Composición polímero	
	%	CmmolHA/CmmolX	CmmolHA/Cmmol	Cmmol/Cmmol	%HB	%HV
100 Cmmol/L-d	60 (7)	1,214 (0,29)	0,25 (0,05)	0,03 (0,01)	67 (7)	33 (7)
120 Cmmol/L-d	42 (4)	0,592 (0,11)	0,28 (0,05)	0,03 (0,00)	67 (1)	33 (1)
140 Cmmol/L-d	33 (4)	0,705 (0,11)	0,29 (0,03)	0,03 (0,01)	76 (1)	24 (1)

(Δf_{PHA} : producción específica de polímero; Y_{STO} : rendimiento de producción de polímero; Y_{GROWTH} : rendimiento de crecimiento). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Como se puede apreciar en la Tabla 6.4, los mejores resultados, en cuanto al contenido de PHA en célula se refiere, son obtenidos cuando la VCO fue fijada en 100 Cmmol/L-d (60%). El posterior aumento de la VCO a 120 y 140 Cmmol/L llevó a una reducción en el valor de este parámetro a valores del 42 y el 33%, respectivamente. La máxima producción específica de polímero (Δf_{PHA}) (1,214 Cmmol HA/CmmolX) fue también obtenida con el lodo enriquecido para una VCO de 100 Cmmol/L-d (Tabla 6.4).

En todos los ensayos, se obtuvieron copolímeros de hidroxibutirato y hidroxivalerato (P(HB:HV)) con composiciones en el rango de 67:33 a 76:24 (%HB:%HV).

6.3.3. Discusión.

El ajuste de las condiciones operacionales es un factor clave en la etapa de selección de una biomasa con alta capacidad de acumulación. En este caso, se

intentó mejorar la capacidad de acumulación de un cultivo mixto mediante la variación de la VCO siendo aplicadas condiciones favorables y desfavorables al crecimiento.

En este trabajo se observó que el aumento de la VCO no favoreció la capacidad de acumulación de los microorganismos tanto para condiciones desfavorables al crecimiento como para condiciones favorables al crecimiento. En ambos casos los mejores resultados en cuanto a acumulación de PHA se refiere fueron alcanzados a la menor VCO aplicada (40 Cmmol/L·d y 100 Cmmol/L·d, respectivamente).

Durante la operación del reactor bajo condiciones no favorables al crecimiento celular, se observa un aumento en la fase de feast con el aumento de la VCO desde 40 a 80 Cmmol/L·d, sin embargo, este no fue significativo para alterar el régimen de feast and famine (el aumento en la relación F/F solo fue del 10%). Dionisi *et al.* (2006), tras estudiar el efecto de la velocidad de carga orgánica mediante el aumento de la concentración de sustrato, observó que la extensión de la fase de feast en el ciclo era determinante a la hora de seleccionar una biomasa con capacidad acumuladora. De esta forma ellos observaron que relaciones F/F menores a 0,29 daban lugar a altas respuestas de acumulación, mientras que a relaciones F/F mayores a 1 se favorecía el crecimiento celular y la biomasa perdía su capacidad acumuladora. La operación del sistema para relaciones intermedias (valores entre 0,29 y 1) daba lugar a un sistema inestable con una respuesta trasiente. Villano *et al.* (2010) estudiando el efecto del a VCO mediante la modificación del TRH fueron capaces de obtener un sistema estable y con una alta productividad para relaciones F/F de 0,6. En este trabajo, la máxima relación F/F observada es de 0,4, la cual se sitúa entre los valores obtenidos como valores umbrales por estos autores para obtener una alta respuesta de acumulación y en ningún momento sobrepasa el valor de 1, valor para el cual se perdería la respuesta de acumulación de la biomasa. Es por esto que se descarta el aumento de la relación F/F como la causa de la disminución de la capacidad acumuladora de los microorganismos.

Otra de las causas que podría afectar a la capacidad de acumulación de la biomasa podría ser la carencia de nutrientes. Durante el ensayo no se adicionó fósforo al medio ya que este estaba presente en el agua residual, sin embargo su concentración era baja (0,16 Pmmol/L) resultando en relaciones C/N/P altas. Dado

que el fósforo no estuvo disponible durante la fase de famine, los organismos acumuladores de PHA no fueron capaces de usar el PHA almacenado para crecer durante la fase de famine, limitando su ventaja competitiva. Además, bajo estas condiciones, el sistema no solo fue operado bajo una competición estricta por el carbono sino que también tuvo lugar una competición por los nutrientes durante la fase de feast lo que podría estar favoreciendo el crecimiento celular frente a la acumulación de reservas intracelulares. Johnson *et al.* (2010) encontraron que una estrategia operacional que limita el carbono es más favorable para el enriquecimiento del lodo en bacterias acumuladoras de PHA a largo plazo que aquella que se basa en la limitación de nutrientes.

El aumento de la concentración de la VCO desde 40 Cmmol/L-d a 80 Cmmol/L llevó a una disminución de la velocidad de consumo de sustrato y de la velocidad específica de producción de polímero las cuales permanecieron bajas con la posterior disminución de la VCO a 60 Cmmol/L-d (Fig. 6.1.) La ausencia de nutrientes durante el período de famine contribuyó a que el polímero no fuese totalmente consumido durante este período permaneciendo en la célula, lo cual condujo a la saturación de la capacidad de almacenamiento de la biomasa. En todos los ensayos batch desarrollados con la biomasa seleccionada bajo condiciones limitantes del crecimiento, se pudo apreciar una velocidad de producción de polímero lenta en las primeras horas del test (Fig. 6.2.).

Este comportamiento de la biomasa fue también observado por Albuquerque *et al.* (2007) cuando intentaron operar un reactor alimentado con melazas empleando una relación de C/N/P de 75/1,4/0,32 Cmmol/Nmmol/Pmmol. Ellos observaron, tras 10 días de operación del reactor, una caída en el rendimiento de acumulación hasta la mitad de su valor y una disminución en la acumulación de polímero en la biomasa lo que resultó en una disminución de la velocidad de consumo de sustrato y, como consecuencia, en un aumento en la relación de feast/famine. El aumento del período de feast contribuyó a que la biomasa comenzase a consumir la fracción orgánica presente en el sustrato diferente a los AGV, acortando la longitud de la fase de famine. En esta situación, el régimen de feast and famine se vió comprometido. Ellos fueron capaces de corregir este problema aumentando la concentración de nitrógeno en la alimentación desde 1,4 Nmmol/L a 2,5 Nmmol/L.

En este trabajo, a diferencia del trabajo de Albuquerque *et al.* (2007), el porcentaje AGV en el agua residual de cervecera fermentada fue del 60-80% de la DQO del efluente acidogénico, por lo que la fracción orgánica presente en el sustrato fue consumido en un corto período de tiempo, restableciéndose el régimen de feast and famine, lo cual nos permitió seleccionar una biomasa con una capacidad acumuladora estable en el tiempo.

Otros autores que fueron capaces de seleccionar una biomasa con una capacidad de almacenamiento estable en el tiempo a pasar de usar una estrategia de enriquecimiento basada en la limitación de nutrientes fueron Serafim *et al.* (2004), Lemos *et al.* (2006), Basak *et al.* (2010) e Ince *et al.* (2012). Sin embargo, todos ellos usaron un sustrato sintético conteniendo acetato como única fuente de carbono. Además la VCO aplicada por estos autores fue lo suficientemente baja (50-60 Cmmol/L-d) para que la biomasa pudiese consumir durante la fase de famine todo el polímero almacenado en procesos de mantenimiento celular. En este trabajo, los mejores resultados fueron observados para la VCO más baja aplicada (40 Cmmol/L-d), la cual fue del orden de las aplicadas por estos autores. Los peores resultados obtenidos en este estudio con la biomasa seleccionada a la VCO de 60 Cmmol/L-d, podría ser debido al empleo de un sustrato más complejo.

En el caso del reactor operado bajo condiciones favorables al crecimiento (bajas relaciones C/N/P y altas temperaturas), el aumento de la VCO no afectó al régimen de feast and famine, dado que la relación F/F se mantuvo constante. Asimismo, durante la operación del reactor bajo estas condiciones, aplicándose diferentes VCO, las velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de polímero se mantuvieron en valores altos. Por otro lado, a pesar de las altas concentraciones de nutrientes presentes en el medio, no se observó un aumento de la velocidad específica de consumo de nitrógeno, la cual se mantuvo en valores del orden de los alcanzados durante la operación del reactor bajo condiciones limitantes de nutrientes. Este comportamiento del reactor viene a confirmar la teoría propuesta por Johnson *et al.* (2010) quienes afirmaban que la exposición de condiciones no limitantes del crecimiento celular favorecía la acumulación de reservas intracelulares, lo que se veía reflejado en bajos consumos específicos de nutrientes a pesar de las altas concentraciones de nutrientes presentes en el medio.

Sin embargo, a pesar de la mejoría del sistema observada al ser operado bajo condiciones no limitantes del crecimiento, no se observó un aumento de la capacidad acumuladora del lodo con el aumento de la VCO. Los mejores resultados alcanzados en cuanto a contenido de PHA en peso seco de célula (60%) fueron obtenidos con el lodo seleccionado a la menor VCO ensayada (100 Cmmol/L.d).

Albuquerque *et al.* (2010) consiguieron mejorar la productividad de PHA mediante el ajuste de la concentración de sustrato en la etapa de enriquecimiento del lodo, llegando a obtener un %PHA tan alto como el 74%, el contenido más alto indicado hasta el momento para un cultivo mixto alimentado con un sustrato complejo (melazas). Ellos observaron que el cambio en la concentración de sustrato en la alimentación conducía a un cambio en la población microbiana. La operación del reactor con una concentración de sustrato de 45 Cmmol/l conducía a un aumento del porcentaje de bacterias acumuladoras, mientras que la operación con una carga orgánica más baja y más alta de sustrato (30 y 60 Cmmol/L) favorecía el desarrollo de una considerable fracción de organismos no acumuladores. Ellos explicaron esta reducción en la capacidad acumuladora de la flora bacteriana como consecuencia de la desaparición del fósforo y el magnesio del medio debido a la precipitación de estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) como consecuencia del elevado pH del medio.

No obstante, en este trabajo, durante la operación del reactor bajo condiciones favorables al crecimiento, a pesar de que no se hizo un seguimiento del magnesio ni del fósforo durante el ciclo del reactor, se puede descartar la desaparición de nutrientes esenciales del medio como consecuencia de la precipitación de estruvita, ya que el polímero fue consumido prácticamente en su totalidad durante la fase de famine. En la operación del reactor bajo condiciones limitantes del crecimiento, el polímero no era consumido por completo durante la fase de famine debido a la ausencia de nutrientes que impedían que las bacterias pudieran crecer empleando el polímero como fuente de carbono, lo que hacía que se obtuvieran fracciones de polímero en la biomasa tan altas como 0,4-0,6 Cmmol HA/Cmmol X al comienzo de los ciclos. Sin embargo durante la operación del reactor bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular, esta fracción se mantuvo en valores constantes y tan bajos como 0,1 Cmmol HA/Cmmol X para todas las VCO estudiadas.

Un hecho similar fue observado por Oehmen *et al.* (2014) quienes estudiaron el impacto del pH en el cultivo mixto mediante la operación del reactor de enriquecimiento sin control de pH (oscilando entre 8-9) y controlando el pH a un valor de 8. El objetivo de estos autores era evaluar el incremento de la productividad del sistema si se evitaba tanto la precipitación de estruvita como la limitación del crecimiento celular que tenía lugar como consecuencia de los elevados pHs alcanzados al final del período de feast. Ellos observaron que, si bien la productividad de PHA era mayor en el lodo seleccionado con control de pH (se conseguían alcanzar los mismos niveles de PHA a pesar de que se duplicaba la producción de biomasa) el porcentaje máximo de PHA y los rendimientos de almacenamiento obtenidos con ambos lodos eran similares.

La disminución de la capacidad acumuladora de la flora bacteriana con el aumento de la VCO podría explicarse por un aumento en la fracción de bacterias no acumuladoras. El predominio de las bacterias acumuladoras frente a las no acumuladoras en este tipo de reactores se basa en su mayor velocidad para consumir el sustrato y en su capacidad para crecer en ausencia de sustrato externo. El aumento de la VCO no derivó en un aumento en la velocidad de consumo de sustrato, la cual se mantuvo prácticamente constante, lo que hace que permanezca sustrato en el medio susceptible de ser empleado por las bacterias no acumuladoras. Es por esto que, es posible que la operación del reactor para una concentración de sustrato mayor a la necesaria por las bacterias acumuladoras pueda favorecer el desarrollo de bacterias no acumuladoras, dado que dejaría de haber una competencia por el sustrato entre los dos grupos de bacterias, el sustrato está en exceso.

6.4. Conclusiones.

Los resultados más relevantes derivados de este trabajo son indicados brevemente en las siguientes líneas:

- La limitación de fósforo en la etapa de enriquecimiento (relaciones C/N/P en el rango 251/20/1 – 517/34/1) jugó un papel relevante en el proceso favoreciendo la respuesta de crecimiento por parte de la biomasa. El mayor contenido de PHA en célula (57%) fue alcanzado cuando el sistema fue operado a una velocidad de carga de 40 Cmmol/L·d, correspondiéndose con una

concentración de sustrato de 20 Cmmol/L. El aumento en la VCO a valores de 60 y 80 Cmmol/L-d condujo a la disminución de las velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de polímero debido a la saturación de la capacidad acumuladora de la biomasa. Durante la operación del reactor bajo estas condiciones se observaron altas fracciones de polímero en célula al comienzo de los ciclos (0,4-0,6 Cmmol HA/Cmmol X).

- La aplicación de condiciones favorables al crecimiento celular (relaciones C/N/P en el rango 11/2/1 - 16/2/1 y alta temperatura) durante la etapa de enriquecimiento llevó a un aumento considerable de la velocidad específica de consumo de sustrato y de producción de polímero (valores de 1 CmmolAGV/CmmolX·h y 0,6 CmmolHA/CmmolX·h, respectivamente), mientras que la velocidad de consumo de nitrógeno se mantuvo a valores bajos (valores próximos a 0,05 Nmmol/CmmolX·h).

- El aumento de la velocidad específica de consumo de sustrato al aplicar bajas relaciones C/N/P y altas temperaturas permitió la alimentación de varios pulsos de sustrato en la etapa de acumulación, lo que permitió mejorar el porcentaje de acumulación de polímero en la biomasa, siendo alcanzados porcentajes tan altos como 60%.

- El aumento de la VCO en la etapa de enriquecimiento durante la operación del reactor bajo condiciones favorables al crecimiento celular no favoreció la producción de PHA. El mayor contenido de PHA en célula (60%) fue alcanzado cuando el sistema fue operado a una velocidad de carga de 100 Cmmol/L-d, correspondiéndose con una concentración de sustrato de 50 Cmmol/L. La aplicación de VCO mayores de 100 Cmmol/L-d pudo favorecer el desarrollo de las bacterias no acumuladoras debido a la presencia de exceso de sustrato en el medio.

6.5. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, 130, 411-421.
- Albuquerque, M.G.E.; Torres, C.A.V.; Reis, M.A.M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar cane molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, 44 (11); 3419-3433.
- Basak, B.; Ince, O.; Artan, N.; Yagci, N.; Ince B. K. (2011). Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production, *Bioprocess Biosystem Engineering*, 34, 1007-1016
- Chua, A. S. M.; Takabatake, H.; Satoh, H.; Mino, T. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*, 37, 3602-3611.
- Dionisi, D.; Majone, M.; Vallini, G.; Di Gregorio, S.; Beccari, M. (2006). Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial culture in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 93 (1), 76-88.
- Ince, O.; Basak, B.; Ince, B. K.; Cetecioglu, Z.; Celikkol, S.; Kolukirik, M. (2011). Effect of nitrogen deficiency during SBR operation on PHA storage and microbial diversity, *Environmental Technology*, DOI: 10.1080/09593330.2011.634441.
- Jiang, Y.; Marang, L.; Kleerebezem, R.; Muyzer, G.; van Loosdrecht, M. C. M. (2011). Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. *The ISME Journal*, 5, 896–907
- Johnson, K.; Jiang, Y.; Kleerebezem, R.; Muyzer, G.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Enrichment of a mixed culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*, 10 (4), 670-676.

- Johnson, K.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water Research*, 44, 2141-2152.
- Lemos, P.C.; Serafim, L.S.; Reis M.A.M. (2006) Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology*, 122(2), 226-238.
- Oehmen, A.; Pinto, F. V.; Silva, V.; Albuquerque, M. G. M.; Reis, M. A. M. (2014). The impact of pH control on the volumetric productivity of mixed culture PHA production from fermented molasses, *Engineering in Life Science*, **14**, 143–152
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87 (2), 145-160.
- Villano, M.; Lampis, S.; Valentino, F.; Vallini, G.; Majone, M.; Beccari, M. (2010). Effect of hydraulic and organic loads in sequencing batch reactor on microbial ecology of activated sludge and storage of polyhydroxyalkanoates. *Chemical Engineering Transactions*, 20, 187-192.

7. *Efecto del TRS en el enriquecimiento de un cultivo mixto en bacterias acumuladoras*

7.1. Resumen.

El efecto del TRS en la selección de un lodo con capacidad acumuladora ya fue estudiado por otros autores, sin embargo en la bibliografía se encuentran algunos resultados contradictorios.

Beun *et al.* (2002) observó una disminución en la capacidad de acumulación del lodo cuando disminuyó el TRS a valores de 3,8 d, mientras que para la operación del reactor para TRS más largos; 9,5 y 19,8 d, el rendimiento de producción de polímero obtenido fue bastante similar, y mayor que el obtenido para TRS de 3,8 d. Third *et al.* (2003) usando un modelo bioquímico obtuvo resultados similares a los observados por Beun *et al.* (2002). Ellos observaron que para concentraciones de biomasa mayores, las cuales se correspondían con TRS mayores, se obtenían menores tiempos de feast y mayores rendimientos de acumulación. En ambos trabajos se empleó un sustrato sintético (acetato), los ciclos del reactor fueron menores de 7 horas y la temperatura aplicada al sistema era baja (20-25°C).

Johnson *et al.* (2009), operando un reactor SBR alimentado con acetato con altas temperaturas (30 °C), ciclos largos (12 h) y bajos TRS (1 d), consigue seleccionar una biomasa capaz de acumular un contenido de PHA próximo al 90% en base al peso seco de biomasa.

Albuquerque *et al.* (2010), sin embargo, consigue altos rendimientos de acumulación así como altos contenidos de PHA en peso seco de célula; 0,8 Cmmol/Cmmol y 74%, respectivamente; mediante la operación del reactor alimentado con agua fermentada de melazas a un TRS de 10d. En este caso el cultivo es enriquecido en varias cepas bacterianas con alta capacidad acumuladora. En este caso, el reactor fue operado con ciclos largos (12 horas) y sin control de temperatura.

Si bien, cabe destacar que las condiciones operacionales aplicadas por estos autores, así como el sustrato empleado en cada trabajo difiere en gran medida, lo cual puede tener una gran influencia en las condiciones óptimas para seleccionar una biomasa con una gran capacidad acumuladora.

Al igual que en el capítulo anterior, en este capítulo se pretendió optimizar la capacidad de acumulación del lodo mediante la variación del efecto del tiempo de retención de sólidos (TRS) en la etapa de enriquecimiento del lodo siendo empleado como sustrato agua residual de cervecera. El estudio se hace tanto para condiciones limitantes del crecimiento (limitación de nutrientes) como para condiciones no limitantes del crecimiento (limitación de carbono).

7.2. Sistema experimental.

7.2.1. Fermentación acidogénica.

La fermentación acidogénica fue llevada a cabo en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) con un volumen útil de 1,6L y un decantador de 0,8L. El reactor fue inoculado con biomasa procedente del reactor anaerobio de la planta depuradora de una industria productora de cerveza localizada en Galicia (España). La temperatura del reactor se controló para un valor de 37°C. El reactor fue operado para un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 0,9 d lo que resultó en una velocidad de carga orgánica promedio (VCO) de 4900 mg DQO/L.d. El pH se controló para un valor de 6,2 mediante la adición de NaOH 2M.

El sistema fue alimentado con agua residual de cervecera. No se adicionaron nutrientes al agua ya que estos estuvieron presentes en una concentración alta suficientemen para el crecimiento de la biomasa. Debido al alto contenido en sólidos procedente de la etapa de clarificado del proceso productivo de la cerveza, el agua fue decantada antes de ser introducida en el reactor.

Los principales productos de la fermentación del agua residual de cervecera fueron los ácidos grasos volátiles (AGV) (acetato, propionato, butirato y n-valerato) siendo obtenido un 60% de la conversión de la DQO total del influente a AGV. El efluente fue retirado por desborde, recogido y filtrado a través de un filtro con un diámetro de poro de 1 μm . El efluente clarificado fue mantenido refrigerado a 4°C mientras no se empleó como sustrato en la etapa de selección de un cultivo acumulador de PHA.

7.2.2. Sequencing batch reactor (SBR).

Un cultivo mixto enriquecido en bacterias acumuladoras y aclimatado al agua residual de cervecera fermentada fue inoculado en un reactor SBR de 1 L de volumen útil. El SBR fue operado bajo condiciones ADF (aerobic dynamic feeding), alternando cortos y largos períodos de exceso y ausencia de sustrato, respectivamente. Se aplicó un ciclo de 12 horas el cual consistió en tres etapas: reacción aerobia (11 h), decantación (0,8 h) y descarga de efluente (0,2 h). El medio descargado fue sustituido por medio fresco durante los dos primeros minutos de la etapa aerobia. El TRH fue de 1 d. El aire fue suministrado a un flujo de 1 vvm. La temperatura del reactor se controló a 30°C. El pH del reactor no fue controlado siendo, sin embargo, monitorizado mediante el empleo de una sonda. El reactor fue alimentado con agua residual fermentada procedente del reactor acidogénico previamente descrito, al cual se le adicionó amonio y en ocasiones AGV para obtener la concentración deseable al comienzo del ciclo.

Tabla 7.1. Parámetros operacionales del reactor estándar operado bajo condiciones desfavorables al crecimiento.

TRS	F/F	X	C ₀	N ₀	C/P	N/P	Composición de sustrato (%)			
		Cmmol/L	Cmmol/L	Nmmol/L			HAc	HPr	HBu	HVal
3,5 d	0,23 (0,1)	42 (10)	24 (3)	1,3 (0,28)	304 (42)	16 (3)	54 (6)	11 (3)	19 (1)	16 (4)
6 d	0,08 (0,02)	83 (7)	22 (1,9)	0,99 (0,05)	281 (30)	12 (0,7)	59 (8)	11 (4)	17 (2)	13 (4)

(F/F: relación feast/famine; X: biomasa activa (Cmmol/L); C₀: concentración inicial de sustrato (Cmmol/L); N₀: concentración inicial de nitrógeno (Nmmol/L)). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Durante la operación del reactor bajo condiciones limitantes del crecimiento, el reactor fue operado a dos TRS diferentes, 6 y 3,5 d. La concentración de AGV empleada fue de 25 Cmmol/L, resultando en una VCO de 50 Cmmol/L·d. El amonio fue adicionado al medio para una concentración de 1,2 Nmmol/L lo que resultó en una relación C/N próxima a 21. Se adicionó también tiurea para de esta manera inhibir la nitrificación. No se adicionó fósforo al medio, el cual estuvo presente en el efluente acidogénico para una concentración de 0,16 Pmmol/L. Los parámetros operacionales del SBR son descritos en detalle en la Tabla 7.1.

En la operación del reactor bajo condiciones favorables al crecimiento, el reactor fue operado a tres TRS diferentes, 1, 3,5 y 10 d. La concentración de AGV empleada fue de 50 Cmmol/L, resultando en una VCO de 100 Cmmol/L·d. La relación C/N/P se mantuvo en el rango desde 9/2/1 a 18/2/1. Se adicionó tiurea para inhibir la nitrificación. Los parámetros operacionales empleados durante el ensayo en el SBR se describen en detalle en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Parámetros operacionales del reactor estándar operado bajo condiciones favorables al crecimiento celular.

TRS	F/F	X	C ₀	N ₀	P ₀	C/P	N/P	Composición de sustrato (%)			
		Cmmol/L	Cmmol/L	Nmmol/L	Pmmol/L			HAc	HPr	HBu	HVal
1 d	0,17	50 (13)	51 (6)	5,7 (1,7)	2,5 (0,8)	18	2	62	10	15	13
	(0,05)										
3,5 d	0,20	55 (10)	45 (4)	9,2 (2,5)	5,0 (0,8)	9	2	62	11	14	13
	(0,08)										
10 d	0,10	64 (10)	50 (2)	7,2 (1,0)	4,6 (0,9)	10	2	62	10	15	13
	(0,03)										

(F/F: relación feast/famine; X: biomasa activa (Cmmol/L); C₀: concentración inicial de sustrato (Cmmol/L); N₀: concentración inicial de nitrógeno (Nmmol/L); P₀: concentración inicial de fósforo (Pmmol/L)). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Para comprobar la capacidad acumuladora del lodo, una vez que la operación del reactor fue estable en el tiempo, éste se alimentó en modo discontinuo. Estos ensayos fueron realizados sin la adición de amonio ni de fósforo y con una concentración inicial de sustrato de 50 Cmmol/L. Las condiciones operacionales empleadas fueron las mismas que aquellas usadas durante la operación del SBR estándar.

7.3. Resultados y discusión.

7.3.1. Condiciones limitantes del crecimiento.

7.3.1.1. Etapa de enriquecimiento del lodo.

Para el estudio del efecto del TRS en la etapa de selección de la biomasa bajo condiciones limitantes de nutrientes, este fue fijado a 6 d y posteriormente fue bajado hasta 3,5 d.

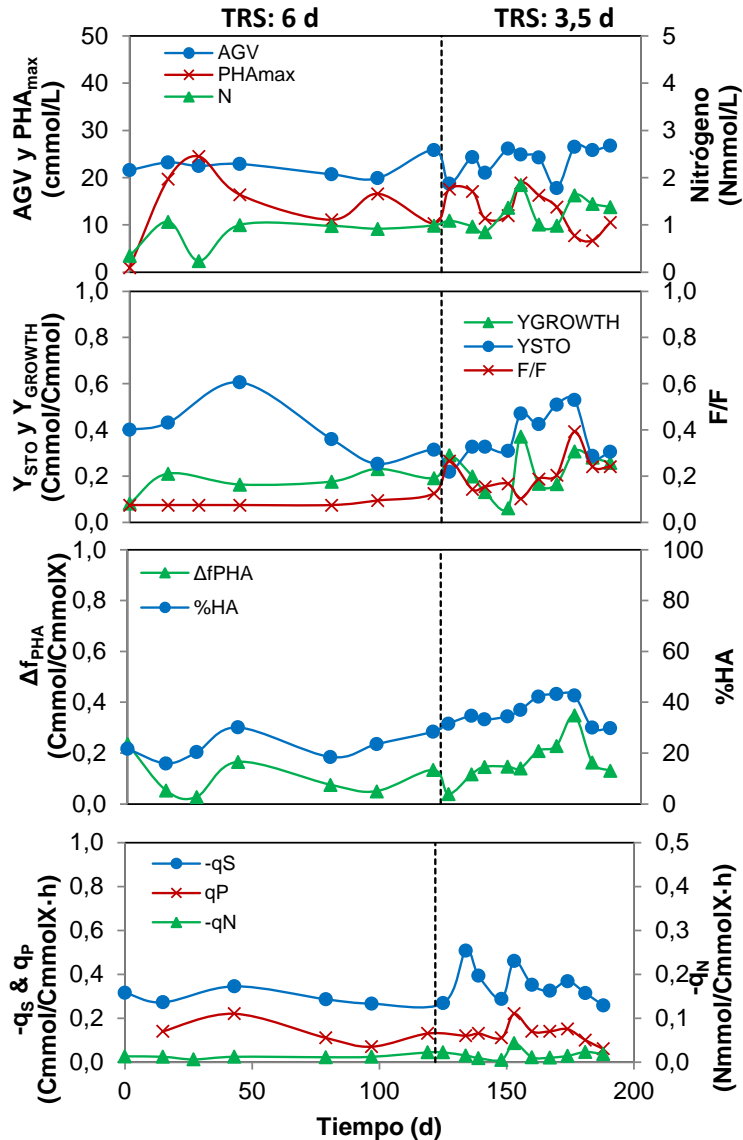


Fig. 7.1. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).

La relación feast/famine (F/F), tal y como se esperaba, se vio significativamente afectada por el TRS, duplicando su valor con la disminución del TRS desde 6 a 3,5 d (Fig. 7.1). La reducción del TRS llevó a una disminución de la concentración de biomasa inicial resultando en un consumo de sustrato más lento. El tiempo de feast

aumentó desde 0,93 h para el TRS de 6 d a 2 horas para un TRS de 3,5 d. Sin embargo, el régimen de feast y famine no se vió comprometido a pesar de la fase de feast más larga observada para el TRS más bajo. En ambos períodos, una vez que el sistema fue estable, los valores de rendimiento de almacenamiento fueron similares variando en el rango entre 0,3-0,5 Cmmol HA/Cmmol AGV para ambos TRS, mientras que el rendimiento de crecimiento aumentó desde un valor promedio de 0,19 a un valor promedio de 0,26 Cmmol X/Cmmol AGV con la disminución del TRS.

A diferencia de la tendencia observada para el rendimiento de almacenamiento, el contenido de PHA en célula y la producción específica de polímero aumentaron desde el 23 al 37% y desde 0,11 a 0,2 Cmmol HA/CmmolX con la disminución del TRS.

La velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_s$) y la velocidad específica de producción de polímero (q_p) permanecieron prácticamente constante para los dos TRS estudiados, mientras que la velocidad de consumo de nitrógeno ($-q_N$) aumentó ligeramente su valor desde 0,01 a 0,02 Nmmol/CmmolX·h con la disminución del TRS.

7.3.1.2. Ensayos batch.

Se realizaron ensayos batch con la biomasa seleccionada a los dos TRS estudiados con el objeto de comprobar la capacidad de acumulación del lodo. Para la realización de estos ensayos no se adicionaron nutrientes en el medio. La concentración de nitrógeno estuvo en el rango 0,02-0,71 Nmmol/L, y esta provenía del efluente acidogénico alimentado para la realización de los ensayos.

Como se muestra en la Tabla 7.3, la disminución del TRS en la etapa de enriquecimiento del lodo no afectó al rendimiento de almacenamiento obtenido en los diferentes fedbatchs los cuales presentaron valores próximos a 0,3 Cmmol HA/Cmmol AGV. No obstante, se apreció un ligero aumento en el contenido de PHA desde el 48 al 53% cuando el TRS fue reducido desde 6 a 3,5 d en la etapa de enriquecimiento. La producción específica de polímero (Δf_{PHA}) obtenida en los diferentes fedbatchs fue mayor cuando la biomasa fue seleccionada a un TRS de 6 d (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Resultados obtenidos en los fedbatches llevados a cabo con el lodo seleccionado a diferentes TRS (6 y 3,5 d) bajo condiciones desfavorables al crecimiento celular.

TRS	HA	Δf_{PHA}	Y_{STO}	Y_{GROWTH}	% Composición polímero	
	%				CmmolHA/CmmolX	CmmolHA/Cmmol
3,5 d	53 (1,4)	0,41 (0,08)	0,33 (0,04)	0,06 (0,01)	85 (4)	15 (4)
6 d	48 (3,9)	0,53 (0,08)	0,31 (0,12)	0,02 (0,01)	82 (6)	18 (6)

(Δf_{PHA} : producción específica de polímero; Y_{STO} : rendimiento de producción de polímero; Y_{GROWTH} : rendimiento de crecimiento). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Por otro lado, la reducción del TRS en la etapa de selección de la biomasa, condujo a una disminución considerable en la velocidad de consumo del sustrato (Fig 7.2.). La biomasa seleccionada bajo un TRS más corto (3,5 d) tardó 12 h en consumir un único pulso de sustrato de 50-60 Cmmol/L, mientras que la biomasa seleccionada a un TRS de 6 d consumió todo el sustrato en un período de 2-3 h. El lento consumo de sustrato hizo imposible alimentar más de un pulso de sustrato para de esta manera mejorar la productividad del proceso. Además, en las primeras horas del ensayo realizado con la biomasa seleccionada a un TRS de 3,5 h se pudo apreciar una lenta velocidad de producción de polímero, la cual fue posiblemente debida a la saturación de la célula en polímero. La fracción de PHA en la biomasa al comienzo de los ensayos realizados con el lodo seleccionado a un TRS de 3,5 d ya era alta (0,4-0,6 Cmmol HA/CmmolX).

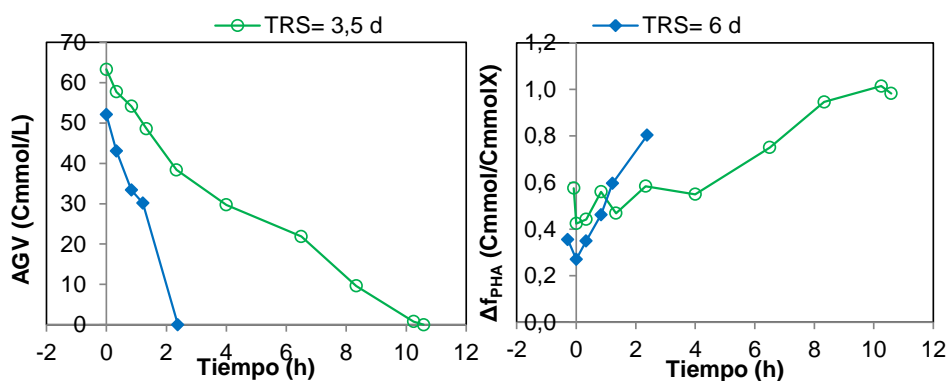


Fig. 7.2. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero.

En todos los ensayos, se obtuvieron copolímeros de hidroxibutirato y hidroxivalerato (P(HB:HV)) con composiciones en el rango de 70:30 a 85:15 (%HB:%HV).

7.3.2. Condiciones no limitantes del crecimiento.

7.3.2.1. Etapa de enriquecimiento del lodo.

Para el estudio del efecto del TRS en la etapa de selección de la biomasa bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular, la relación C/N/P fue reducida hasta alcanzar relaciones situadas en el rango 9/2/1-18/2/1.

La aplicación de condiciones no limitantes del crecimiento celular condujo a un aumento en las velocidades específicas del proceso, por lo que se decidió aumentar la concentración de sustrato en el reactor a 50 Cmmol/L.

El TRS fue inicialmente fijado en 3,5 d, posteriormente aumentado a 10 d y finalmente, disminuido a 1 d. Semanalmente se hicieron seguimientos de los ciclos del reactor para evaluar el efecto del TRS en la operación continua del reactor. Los parámetros medidos fueron el consumo de AGV y de amonio, así como la producción de PHA y de biomasa. El rendimiento de acumulación y de crecimiento y las velocidades del proceso (velocidad de consumo de sustrato y nitrógeno, y velocidad de producción de polímero) fueron calculados para la fase de feast de cada uno de los ciclos del SBR monitoreados (Fig. 7.3).

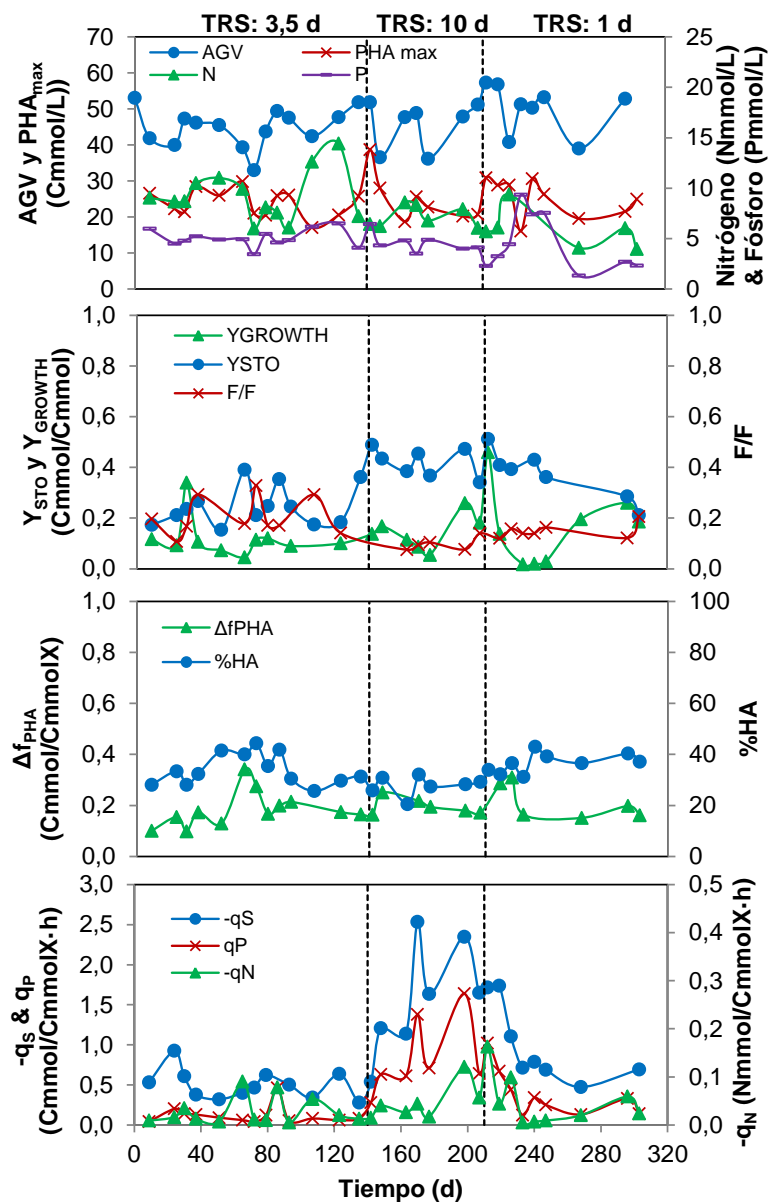


Fig. 7.3. Variación de los principales parámetros de operación del reactor con el tiempo (rendimiento de almacenamiento (Y_{STO}), rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}), relación feast/famine (F/F), producción específica de polímero (Δf_{PHA}), contenido de PHA en célula (%HA), velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_S$), velocidad específica de consumo de nitrógeno ($-q_N$) y velocidad específica de producción de polímero (q_P)).

La relación feast/famine (F/F), a diferencia de lo observado durante la operación del reactor bajo condiciones limitantes del crecimiento, no se vio afectada con la variación del TRS presentando valores iguales o inferiores a 0,3 (Fig. 7.3). Asimismo,

la concentración de biomasa activa permaneció más o menos constante para los tres TRS estudiados (valores próximos a 50 CmmolX/L). Sin embargo, en este caso sí se observa una gran diferencia entre los rendimientos de acumulación (Y_{STO}) y los rendimientos de crecimiento (Y_{GROWTH}) obtenidos para los tres períodos. De esta manera se puede apreciar que el máximo rendimiento de producción fue obtenido para el máximo TRS estudiado (10 d), mientras que el máximo rendimiento de crecimiento (Y_{GROWTH}) fue obtenido para el mínimo TRS (1 d). La producción específica de polímero (Δf_{PHA}) fue similar para los tres TRS estudiados.

A diferencia de la tendencia observada para el rendimiento de almacenamiento, se observó un ligero descenso del contenido de PHA en célula con el aumento del TRS.

Como se puede apreciar en la Fig. 7.3., tanto la velocidad específica de consumo de sustrato ($-q_s$) como la velocidad específica de producción de polímero (q_p) obtenidas para los diferentes TRS aplicados bajo condiciones favorables al crecimiento son mucho mayores que las obtenidas cuando se aplicaron condiciones limitantes del crecimiento (Fig.7.1.). La velocidad de consumo de sustrato específica ($-q_s$) y la velocidad de producción de polímero específica (q_p) fueron máximas para el mayor TRS estudiado (10 d). La velocidad de consumo de nitrógeno ($-q_N$) presentó el valor más bajo para el TRS de 3,5 d (valor promedio de 0,02 Nmmol/CmmolX·h), mientras que para los TRS de 1 y 10 d este fue de 0,05 Nmmol/CmmolX·h (valor promedio). Sin embargo, a pesar del exceso de nutrientes en el medio, las velocidades de consumo de nitrógeno observadas fueron del orden de las obtenidas en el ensayo realizado bajo condiciones limitantes del crecimiento celular (limitación de nutrientes).

7.3.2.2. Ensayos batch.

Una vez que la operación del reactor fue estable en el tiempo, varios ensayos batch fueron realizados con el fin de determinar la capacidad acumuladora del lodo. Se sabe que la limitación de nutrientes en la etapa de producción de polímero es un requisito necesario para obtener altos contenidos de PHA (Bengtsson *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010; Serafim *et al.*, 2004), por lo que no se adicionó nutrientes al medio. El nitrógeno presente en estos ensayos procedió del excedente de nutrientes

presente en el reactor. Sin embargo, en ocasiones, la concentración de este presentó valores tan altos como 8-10 Nmmol/L.

Las mayores velocidades de consumo de sustrato observadas en el SBR operado bajo condiciones no limitantes del crecimiento nos permitieron realizar ensayos batch con una adición del sustrato mediante pulsos con el objeto de aumentar la productividad del sistema.

La saturación de la capacidad de acumulación de los microorganismos estuvo, en todos los casos, indicada por una disminución en la velocidad de consumo de sustrato. Como se puede apreciar en la Fig 7.4., el consumo de sustrato en el último pulso adicionado duró aproximadamente el doble que los otros pulsos.

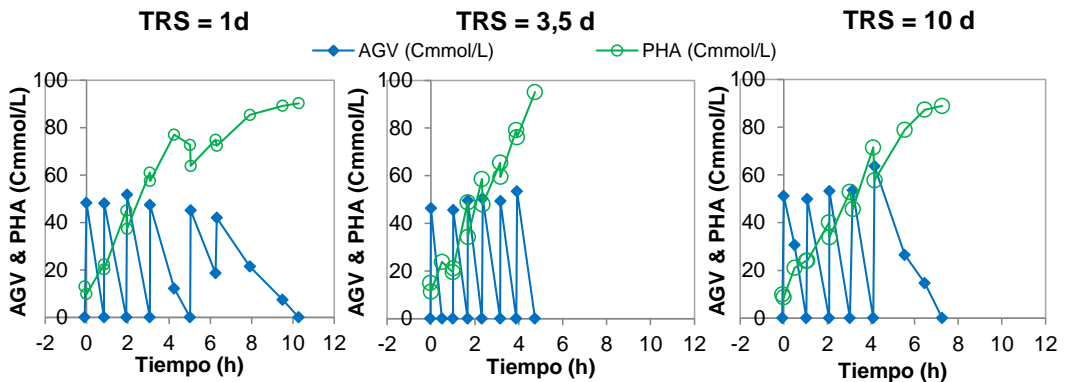


Fig. 7.4. Perfiles de consumo de sustrato y de producción de polímero observados en los ensayos batch realizados con un lodo seleccionado a diferentes TRS.

En la Tabla 7.4 se muestran los resultados más relevantes obtenidos en los ensayos fedbatch.

Tabla 7.4. Resultados obtenidos en los fedbatches llevados a cabo con el lodo seleccionado a diferentes TRS (3,5; 10 y 1 d) bajo condiciones favorables al crecimiento celular.

TRS	HA	Δf_{PHA}	Y_{STO}	Y_{GROWTH}	% Composición polímero	
	%	CmmolHA/CmmolX	CmmolHA/Cmmol	Cmmol/Cmmol	HB	HV
1 d	53 (2)	0,88 (0,07)	0,31 (0,005)	0,05 (0,02)	70 (3,5)	30 (3,5)
3,5 d	47 (5)	0,66 (0,16)	0,29 (0,03)	0,14 (0,05)	71 (3,5)	29 (3,5)
10 d	61 (6)	1,23 (0,24)	0,30 (0,09)	0,04 (0,01)	70 (0,6)	30 (0,6)

(Δf_{PHA} : producción específica de polímero; Y_{STO} : rendimiento de producción de polímero; Y_{GROWTH} : rendimiento de crecimiento). Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

La disminución del TRS en la etapa de enriquecimiento del lodo no afectó al rendimiento de almacenamiento obtenido en los diferentes fedbatches los cuales presentaron valores en el rango de 0,3 a 0,45 Cmmol HA/Cmmol AGV. No obstante, se apreció un considerable aumento en el contenido de HA desde el 47-53% al 61% con el aumento del TRS de 1-3,5 d a 10 d en la etapa de enriquecimiento. La producción específica de polímero también fue mayor para el mayor TRS (1,23 Cmmol HA/CmmolX), presentando el menor valor para el TRS de 3,5 d (0,66 Cmmol HA/CmmolX). El rendimiento de crecimiento se mantuvo bajo en todos los casos oscilando entre valores situados entre 0,05 y 0,2 Cmmol X/Cmmol AGV. (Tabla 7.4).

En todos los ensayos, se obtuvieron copolímeros de hidroxibutirato y hidroxivalerato (P(HB:HV)) con composiciones en el rango de 70:30 a 83:17 (%HB:%HV).

7.3.2.2.1. Efecto de la concentración de nutrientes

Debido a la variable concentración de nitrógeno observada en los ensayos batchs, se estudia el efecto de este parámetro en la producción de HA.

Como muestra Fig. 7.5., el nitrógeno no ejerció ninguna efecto en la capacidad de acumulación del lodo, siendo alcanzados altos contenidos de PHA en la biomasa y altas producciones específicas de polímero incluso cuando la concentración de nitrógeno en el medio fue tan alta como 8-10 Nmmol/L. Si comparamos los resultados obtenidos en el mismo período de aclimatación del lodo, se puede apreciar que en ocasiones el aumento de la concentración de nitrógeno llevó a un aumento en el contenido de PHA y a la obtención de mayores producciones específicas de polímero. Esto ocurre en el caso de los ensayos batch realizados con un lodo seleccionado a un

TRS de 3,5 d, los mejores resultados fueron obtenidos cuando la concentración de nitrógeno fue de 8,24 Nmmol/L. Asimismo, el mejor resultado alcanzado tanto en contenido de PHA como en producción específica de polímero se obtuvo con una concentración de nitrógeno de 2,23 Nmmol/L (lodo seleccionado para un TRS de 10 d). Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados por Dionisi *et al.* (2005) quienes observaron mayores productividades de PHA en los ensayos realizados sin limitación de nutrientes.

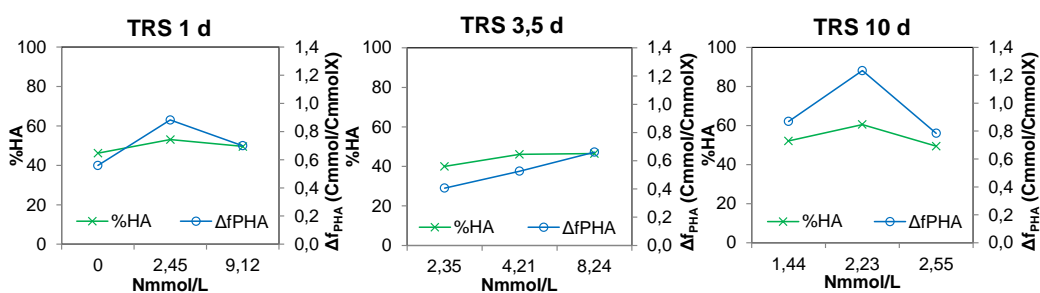


Fig. 7.5. Variación del contenido de PHA (%) (x) y de la producción específica de polímero (Δf_{PHA}) (Cmmol/CmmolX) (○) con la concentración de nitrógeno.

Por otro lado, la concentración de nitrógeno también tuvo una ligera influencia en la composición del polímero, siendo observado un aumento de la fracción de HV en el copolímero con el aumento de la concentración de nitrógeno. Como se puede apreciar en la Fig. 7.6., las mayores fracciones de HV en la composición del polímero fueron obtenidas en los ensayos realizados con mayores concentraciones de nitrógeno (8-10 Nmmol/L). Este hecho ya fue observado por otros autores. Bengtsson *et al.* (2008) observó que al comparar los datos obtenidos experimentalmente y mediante un modelo metabólico, las composiciones del polímero obtenidas en ensayos realizados con exceso de nutrientes se desviaban de las obtenidas a partir del modelo metabólico; el modelo metabólico predecía un polímero con un 39% menos de contenido de HV. Ellos sugirieron que el crecimiento celular ocurría con una mayor proporción de los ácidos implicados en la producción de PHB (acetato y butirato). Otros autores que obtuvieron resultados similares fueron Wen *et al.* (2010) y Reddy *et al.* (2012) quienes observaron que la biomasa producía más PHB que PHV bajo condiciones stress de limitación de nutrientes; especialmente bajo condiciones en las que el fósforo estaba limitado.

Esta tendencia puede ser también apreciada si se comparan los resultados obtenidos durante la operación del reactor de enriquecimiento del lodo bajo condiciones limitantes del crecimiento celular inducidas por una limitación en el contenido de fósforo y los resultados en los que el lodo fue seleccionado bajo condiciones no limitantes del crecimiento (exceso de nutrientes). Los polímeros obtenidos por el lodo aclimatado bajo condiciones limitantes de nutrientes presentaron fracciones de HV en el rango de 15-22%, mientras que la fracción de HV en los polímeros producidos por el lodo aclimatado bajo condiciones de exceso de nutrientes se situó en el rango de 21-34%.

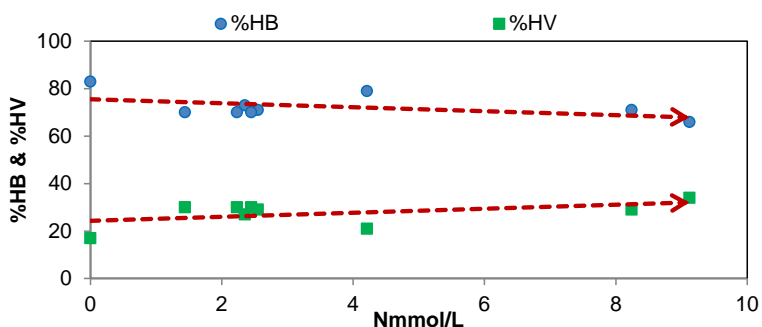


Fig. 7.6. Variación de la fracción de los monómeros de HB y HV en la composición del polímero con la concentración de nitrógeno.

7.3.3. Discusión.

El control del TRS es un parámetro operacional importante para la selección microbiana. Sin embargo, el efecto del TRS en el proceso de producción de PHA con cultivos mixtos no está claro. En este trabajo se propuso el estudio del efecto del TRS tanto para condiciones limitantes del crecimiento celular (limitación de nutrientes esenciales) y condiciones no limitantes del crecimiento celular. Esta elección viene condicionada por el hecho de que en la bibliografía no existe una tendencia clara a la hora de seleccionar unas condiciones óptimas para la selección del lodo. Autores tales como Serafim *et al.* (2004), Lemos *et al.* (2006), Basak *et al.* (2011) o Ince *et al.* (2012) fueron capaces de seleccionar una biomasa con alta capacidad de acumulación y obtuvieron una operación estable del SBR trabajando bajo la limitación de nutrientes esenciales. Sin embargo, otros autores como Johnson *et al.* (2009) y Albuquerque *et al.* (2010) demandan que una estrategia operacional basada en una

limitación de carbono es más favorable para el enriquecimiento a largo plazo de un lodo en bacterias acumuladoras que aquella basada en una limitación de nutrientes.

Este trabajo demostró que la reducción del TRS en la etapa de enriquecimiento no favoreció la selección de microorganismos con alta capacidad de acumulación siendo aplicadas tanto condiciones limitantes del crecimiento como no limitantes. En ambos casos los mejores resultados, en cuanto a acumulación de PHA y producción específica de polímero se refiere, fueron alcanzados para el mayor TRS aplicado (6 y 10 d).

La reducción del TRS desde 6 a 3,5 d cuando el reactor fue operado bajo condiciones limitantes del crecimiento celular llevó a un aumento del contenido de PHA en lodo desde el 23 al 37%, mientras que el rendimiento de acumulación permaneció prácticamente constante (valores oscilando entre 0,3 y 0,5 Cmmol HA/Cmmol AGV) (Fig. 7.1). Este aumento en el contenido de PHA pudo ser debido al mayor contenido de PHA presente en la biomasa al comienzo del ciclo cuando el reactor fue operado al menor TRS (3,5d). Como se puede apreciar en la Fig. 7.2., aunque en ambos ensayos la fracción de polímero en la biomasa fue alta al comienzo de los ensayos, este valor fue mayor en la biomasa seleccionada a un TRS de 3,5d (0,4 Cmmol HA/CmmolX) que en la biomasa seleccionada a un TRS de 6 d (0,3 Cmmol HA/CmmolX).

Durante la operación del reactor bajo condiciones limitantes de nutrientes, tanto el nitrógeno como el fósforo fueron consumidos por completo antes o al mismo tiempo que la fuente de carbono. Dado que ni el nitrógeno ni el fósforo (nutriente limitado) no estaban disponibles durante la fase de famine, los microorganismos acumuladores no fueron capaces de usar el polímero almacenado para crecer durante la fase de famine, viéndose limitada su ventaja competitiva. Debido a la carencia de nutrientes durante el período de famine, el polímero no fue completamente consumido, permaneciendo en el interior de la célula, lo cual pudo conducir a la saturación celular. Bajo estas condiciones, el sistema no solo operó bajo una estricta competición por el carbono sino que también tuvo lugar una competición por los nutrientes durante la fase de feast. La operación del reactor bajo estas condiciones pudo favorecer el crecimiento celular frente a la acumulación de reservas.

Por otro lado, la reducción del TRS condujo a una mayor limitación de los nutrientes en el medio, favoreciéndose incluso más el crecimiento celular de los microorganismos. Johnson *et al.* (2010) observó que al someter a un cultivo a la misma relación C/N pero a diferentes TRS la limitación de nitrógeno del medio aumentaba con la disminución del TRS. Ellos observaron que los cultivos así seleccionados no ajustaban su velocidad de consumo de sustrato a la mayor velocidad de crecimiento, haciéndose más largo el tiempo de feast con la reducción del TRS. Sin embargo, sí ajustaban la velocidad de consumo de nitrógeno en la fase de feast. Si nos fijamos en las velocidades del proceso para la operación del reactor bajo condiciones limitantes del crecimiento, la velocidad específica de consumo de sustrato y la velocidad específica de producción de polímero presentaron valores similares para los dos TRS estudiados mientras que la velocidad específica de consumo de nitrógeno aumentó ligeramente su valor al disminuir el TRS de 6 a 3,5 d (Fig. 7.1.).

Aunque en este trabajo se consigue seleccionar una biomasa con capacidad acumuladora trabajando bajo condiciones de limitación del crecimiento celular, la productividad del proceso fue baja como consecuencia de la saturación de la capacidad de acumulación de la biomasa. En la bibliografía se pueden encontrar varios trabajos en los cuales se consigue seleccionar una biomasa con mayor capacidad acumuladora trabajando bajo condiciones limitantes de nutrientes que bajo condiciones excedentes de nutrientes (Basak *et al.*, 2010 y Ince *et al.*, 2012). Sin embargo, a diferencia de este trabajo, todo ellos usaron medios sintéticos conteniendo acetato como única fuente de carbono. Además, los TRS aplicados por estos autores fueron mayores (8d) a los usados en este trabajo (3,5 y 6 d). El uso de un sustrato más complejo (agua residual de cervecera) y los tiempos de retención más cortos empleados en este trabajo pudieron favorecer la saturación de la capacidad de acumulación de la biomasa seleccionada. Albuquerque *et al.* (2007), trabajando con residuo de melazas, no fueron capaces de seleccionar una biomasa con alta capacidad de acumulación cuando aplicó condiciones limitantes de nutrientes, incluso a bajas VCO (60 Cmmol/L-d). La conclusión de estos autores fue que las condiciones de operación para la selección de microorganismos acumuladores de PHA son diferentes cuando se usa sustratos sintéticos que cuando se usan sustratos complejos tales como efluentes residuales fermentados. El período

de feast está más definido cuando se emplea un sustrato sintético que usando un sustrato real, siendo restablecido el régimen de feast/famine. En este trabajo, aunque se empleó un sustrato real, el agua residual de cervecera esta principalmente compuesta de materia orgánica fácilmente biodegradable la cual, bajo condiciones de fermentación acidogénica, es prácticamente convertida en su totalidad a AGV. Es por esto, que el comportamiento del reactor observado en este trabajo fue bastante similar al observado trabajando con sustratos sintéticos.

La operación del reactor bajo condiciones favorables al crecimiento condujo a un aumento de la velocidad de consumo de sustrato y de la velocidad de producción de polímero, mientras que, contra lo esperado, la velocidad de consumo de nitrógeno se mantuvo en valores bajos (en torno a 0,02-0,05 Nmmol/Cmmol-h). Además, el polímero fue prácticamente consumido en su totalidad en la etapa de famine, siendo observadas fracciones de polímero en la biomasa al comienzo del ciclo tan bajas como 0,1 Cmmol HA/CmmolX. Asimismo, el contenido de PHA y las productividades específicas de polímero obtenidas con el lodo enriquecido bajo condiciones no limitantes del crecimiento (61% y 1,23 Cmmol HA/CmmolX) fueron bastante mayores que aquellas conseguidas con el lodo enriquecido bajo condiciones limitantes del crecimiento (48% y 0,43 Cmmol HA/CmmolX). Estos resultados vienen a confirmar los resultados observados por Johnson *et al.* (2009) y Albuquerque *et al.* (2010) quienes encontraron que una estrategia operacional que limita el carbono fue más favorable para el enriquecimiento del lodo a largo plazo en bacterias acumuladoras de PHA que aquella que se basa en la limitación de nutrientes.

Por otro lado, cuando el lodo fue enriquecido bajo condiciones no limitantes del crecimiento se pudo observar que la capacidad de acumulación del lodo no era dependiente de la concentración de nutrientes en el medio, siendo alcanzados incluso altos contenidos de PHA y altas productividades de PHA en presencia de elevadas concentraciones de nitrógeno (2-10 Nmmol/L). Hasta ahora, se creía que la limitación del crecimiento celular era necesaria para incrementar la productividad en la etapa de producción de polímero. Pero, la mayor parte de los trabajos donde la mejora del proceso estaba asociado con una limitación del crecimiento celular, por ejemplo la limitación de nutrientes esenciales, fueron realizados con un lodo enriquecido bajo condiciones limitantes de nutrientes (Serafim *et al.*, 2004, Lemos *et al.*, 2005). Otros

autores quienes basaron su estrategia para el enriquecimiento del lodo en un proceso con limitación del carbono observaron la ausencia de influencia de los nutrientes en la síntesis de PHA (Dionisi *et al.*, 2005; Marang *et al.*, 2013, Jiang *et al.*, 2009)

La biomasa enriquecida en bacterias acumuladoras bajo condiciones de feast and famine experimentan lo conocido como crecimiento desequilibrado; en presencia de una fuente de carbono acumulan la mayor parte del carbono como reservas internas (60-80% de su peso), para finalmente, una vez agotada la fuente de carbono externa, crecen usando estas reservas internas como fuente de carbono y energía.

En los sistemas operados bajo limitación de nutrientes durante la etapa de exceso de carbono, los microorganismos acumuladores no cuentan con esta ventaja competitiva, por lo que tienen que competir por el carbono y los nutrientes del medio con los microorganismos no acumuladores, de ahí que la respuesta principal de estos microorganismos sea el crecimiento celular. Cuando la biomasa seleccionada bajo condiciones limitantes de nutrientes es sometida a un exceso de carbono y nutrientes, esta tiende a crecer, siendo por lo tanto necesario limitar el crecimiento celular para de esta manera poder incrementar la productividad del sistema.

Sin embargo, en los sistemas operados bajo condiciones limitantes de carbono (exceso de nutrientes), las bacterias acumuladoras pueden almacenar la mayor parte del carbono como reservas internas, para después crecer empleando estas reservas, de ahí que la respuesta más favorable en estos sistema, en presencia de carbono, sea la acumulación. Es por esto que al emplear bacterias enriquecidas en microorganismos acumuladoras en presencia de nutrientes, en las que la respuesta más favorable es la acumulación de reservas, no se observe una influencia de este parámetro en el proceso de acumulación de reservas internas. Marang *et al.* (2014) observó un comportamiento similar al emplear un cultivo mixto conteniendo un microorganismo acumulador (*Plasticicumulumans acidivorans*) y un microorganismo no acumulador (*Methylobacillus flagellatus*). Ellos observaron que incluso en presencia de nutrientes el organismo acumulador mantenía su capacidad de acumulación y que la disminución en la productividad del sistema estaba motivada por el mayor desarrollo del organismo no acumulador en presencia de MeOH (sustrato que los organismos acumuladores no pueden usar en sistemas de feast-famine para acumular reservas internas).

7.4. Conclusiones.

Los principales resultados derivados de este trabajo son comentados brevemente en las siguientes líneas:

- La concentración de nutrientes en el medio jugó un importante papel en la selección de la biomasa. La limitación de nutrientes favoreció el crecimiento celular durante la fase de feast, en lugar de la acumulación de reservas internas.
- El enriquecimiento del lodo bajo condiciones de limitación del carbono (relaciones C/N/P en el rango 9/2/1 – 18/2/1) permitió la selección de una biomasa con alta capacidad acumuladora. Además, la biomasa seleccionada bajo condiciones excedente de nutrientes no se vio influenciada por la presencia de nutrientes en la etapa de producción de polímero, siendo alcanzados altos contenidos de PHA (40-60%) y altas productividades de polímero (0,4-1,2 CmmolHA/CmmolX) en presencia de altas concentraciones de nitrógeno (2-10 Nmmol/L).
- La operación del reactor bajo condiciones de limitación de carbono llevó a un aumento de la velocidad de consumo del sustrato (0,5-2 Cmmol AGV/CmmolX·h) y de la velocidad de producción de polímero (0,2-0,9 Cmmol HA/CmmolX·h), mientras que la velocidad de consumo de nitrógeno se mantuvo a valores bajos (0,02-0,05 Nmmol/CmmolX·h).
- La operación del reactor a TRS altos (10 d) bajo condiciones favorables al crecimiento permitió seleccionar una biomasa con una alta capacidad acumuladora. La biomasa seleccionada bajo estas condiciones alcanza contenidos en célula del 61%.
- El aumento en la concentración de nutrientes en el medio llevó a un aumento en la fracción de HV en el copolímero producido.

7.5. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Albuquerque, M.G.E.; Torres, C.A.V.; Reis, M.A.M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar cane molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection, *Water Research*, **44** (11); 3419-3433.
- Basak, B.; Ince, O.; Artan, N.; Yagci, N.; Ince B. K. (2011). Effect of nitrogen limitation on enrichment of activated sludge for PHA production, *Bioprocess Biosystem Engineering*, **34**, 1007-1016
- Bengtsson, S.; Werker, A.; Christensson, M.; Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater, *Bioresource Technology*, **99** (3), 509-516.
- Beun, J. J.; Dircks, K.; van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J. (2002). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, *Water Research*, **36**, 1167-1180.
- Dionisi, D.; Beccari, M.; Di Gregorio, S.; Majone, M., Papini, M. P. and Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by enrichment microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 1306-1318.
- Ince, O.; Basak, B.; Ince, B. K.; Cetecioglu, Z.; Celikkol, S.; Kolukirik, M. (2012). Effect of nitrogen deficiency during SBR operation on PHA storage and microbial diversity, *Environmental Technology*, DOI: 10.1080/09593330.2011.634441.
- Jiang, Y; Chen, Y.; Zheng, X. (2009). Efficient Polyhydroxyalkanoates Production from a Waste-Activated Sludge Alkaline Fermentation Liquid by Activated Sludge Submitted to the Aerobic Feeding and Discharge Process, *Environmental Science and Technology*, **43**, 7734–7741.

- Johnson K.; Jiang, Y.; Kleerebezem, R.; Muyzer, G.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Enrichment of a mixed culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity, *Biomacromolecules*, **10** (4), 670-676.
- Johnson, K.; Kleerebezem, R.; Van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs, *Water Research*, **44**, 2141-2152.
- Lemos, P.C.; Serafim, L.S.; Reis M.A.M. (2006) Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding, *Journal of Biotechnology*, **122**(2), 226-238.
- Marang, L.; Jiang, Y.; van Loosdrecht, M.C.M.; Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production, *Bioresourcetechnology*, **142**, 232–239. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.031
- Reddy, M. V.; Mohan, S. V. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment, *Bioresourcetechnology*, **114**, 573–582
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2), 145-160.
- Third, K. A.; Newland, M.; Cord-Ruwisch, R. (2003). The effect of dissolved oxygen on PHB accumulation in activated sludge cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, **82** (2), 238-250.
- Wen, Q.; Chen, Z.; Tian, T.; Chen W. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge, *Journal of Environmental Sciences*, **22**(10), 1602–1607.

8. Caracterización de los bioplásticos

8.1. Introducción.

Los polihidroxicanoatos, como ya se mencionó en la revisión bibliográfica realizada en el primer capítulo, presentan un gran rango de propiedades, las cuales surgen químicamente como consecuencia de la longitud de las cadenas laterales unidas al esqueleto del polímero, así como de la distancia entre las uniones éster en el esqueleto del polímero. Generalmente los PHA con cadenas laterales cortas son materiales duros y cristalinos, mientras que los PHA con cadenas laterales largas son materiales elastómeros (William *et al.*, 1999)

El polímero de origen bacteriano más conocido y mejor caracterizado es el PHB, el cual presenta una cristalinidad entre el 60-80%, temperaturas de transición vítrea entre -5 y 5°C y temperaturas de fusión próximas a 180°C (Anderson *et al.*, 1990; Philip *et al.*, 2007). En el caso de copolímeros, el aumento de unidades de HV en su composición se ve reflejado en una disminución en la cristalinidad, así como en una disminución de las temperaturas de transición del polímero. De esta forma el aumento de unidades de HV en el copolímero hasta un 30% lleva a una disminución de la cristalinidad hasta valores del 30-40% y a una disminución de la temperatura de fusión hasta valores próximos a 143°C (Anderson *et al.*, 1990)

Se sabe que el porcentaje de HV en el polímero y, por lo tanto, las propiedades térmicas del polímero producido, se puede regular mediante la composición de AGV del sustrato alimentado en el sistema de producción de PHA (Serafim *et al.*, 2005; Bengtsson *et al.* 2010). La relación de los ácidos grasos en el sustrato se puede controlar con el ajuste de parámetros como son el pH, el TRH y el TRS en la etapa acidogénica del sistema (Albuquerque *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2010). De la misma manera, se ha visto que el ajuste de la concentración de nutrientes o del régimen de alimentación (alimentación en pulsos o en modo continuo) en las etapas aerobias del proceso puede influir también en la proporción de la fracción de HB en el polímero. Wen *et al.* (2010) y Reddy *et al.* (2012) observaron que la biomasa producía más PHB que PHV bajo condiciones de stress de limitación de nutrientes; especialmente bajo condiciones en las que el fósforo estaba limitado. Albuquerque *et al.* (2010) observó que una alimentación en un modo continuo en la etapa de producción de polímero, no solo daba lugar a la obtención de mayores

productividades volumétricas de polímero, sino que conducía a la formación de polímeros con una mayor fracción de HV.

Por otro lado, también se sabe que se puede influir sobre la microestructura del polímero (estructura al azar o por repetición de dibloques o multibloques) ajustando el régimen de alimentación, lo cual permite ajustar también las propiedades mecánicas del polímero. Trabajando con cultivos puros se ha demostrado que una microestructura en bloque aumenta la fuerza de tracción del polímero y el módulo de Young, así como lleva a una mayor retención de la elasticidad del polímero con el tiempo (Arcos *et al.*, 2013).

Todos estos ajustes en la composición y en la microestructura del polímero permiten un mayor control del polímero a producir para su posterior empleo en aplicaciones determinadas.

Este capítulo se centra en el análisis y estudio de las propiedades térmicas (temperaturas y entalpías de transición y temperatura de degradación) y del grado de cristalinidad de algunos de los polímeros producidos en los capítulos 6 y 7 de este trabajo.

8.2. Resultados y discusión.

La extracción de los polímeros fue realizada mediante el lavado previo de la biomasa con acetona y empleando cloroformo como disolvente extractante. Las características de los polímeros fueron determinadas cuando la fuente de carbono fue completamente consumida, lo cual se correspondió con el máximo polímero almacenado.



Fig. 8.1. Imagen de un plástico producido durante la operación del reactor a diferentes TRS

Los parámetros determinados fueron la estabilidad térmica y las temperaturas de transición del polímero (T_g , T_c y T_m). Las entalpías de cristalización y de fusión fueron determinadas a partir del termograma obtenido. El porcentaje de cristalinidad se calculó a partir de la entalpía de fusión asumiendo que el PHB con un 100% de cristalinidad presento una entalpía de fusión de 132 J/g (Miguel *et al.*, 2001).

Los polímeros analizados fueron copolímeros P(3HB:3HV) con un contenido de HV en el rango de 26-34%. Todos los polímeros presentaron características similares, sin embargo, se pudo apreciar que la disminución en un 8% de la fracción de HV en el polímero llevó a un aumento en el % cristalinidad desde 26,9 a 27,3% y a un aumento en las temperaturas de cristalización y fusión desde 66 y 152 °C a 74 y 155 °C, respectivamente.

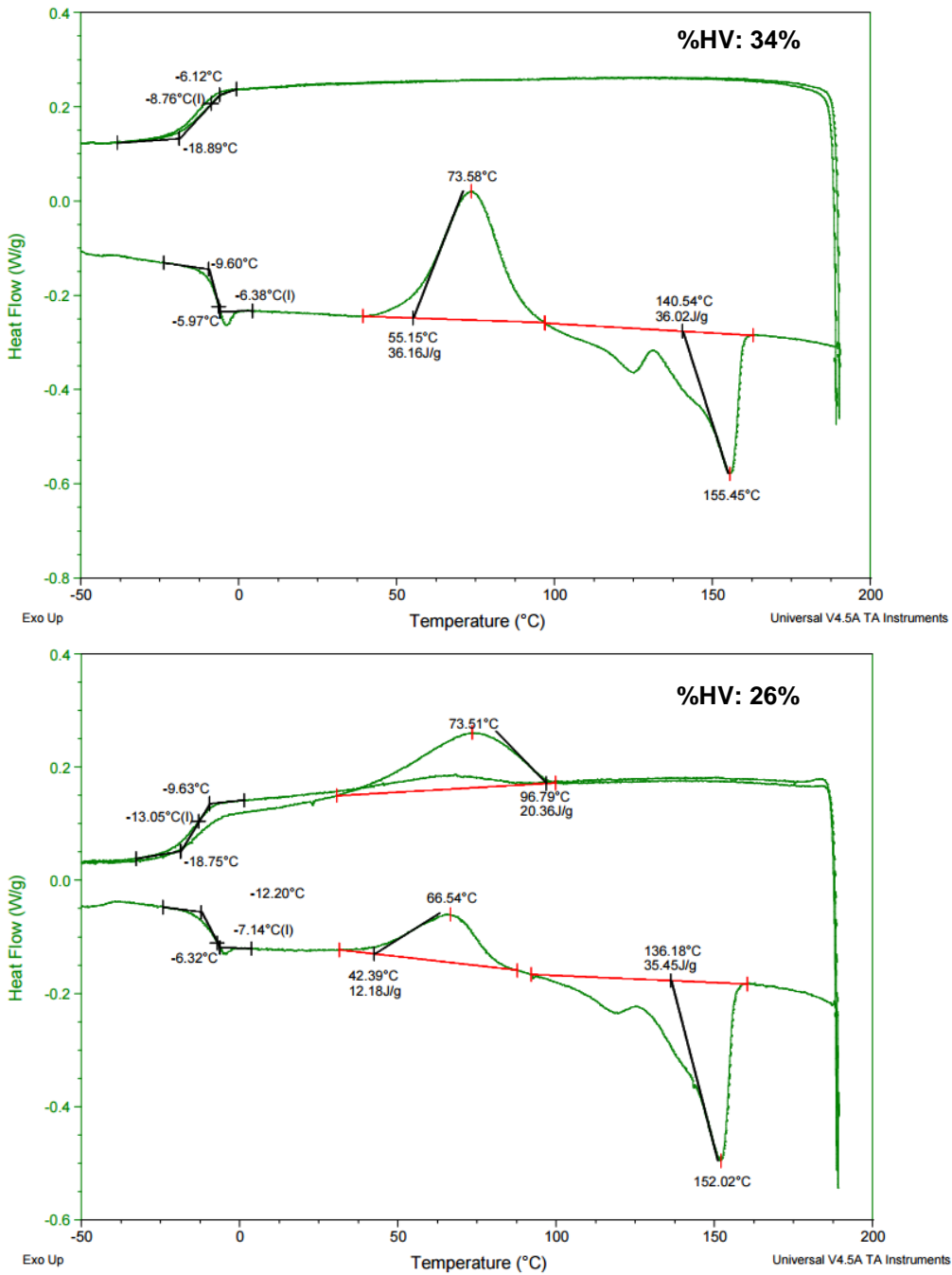


Fig. 8.2. Curva de calentamiento de calorimetría diferencial de barrido típica de los polímeros caracterizados (en la gráfica de arriba se muestra la curva del copolímero P(HB:HV) 66:34% y en la gráfica de abajo la curva del copolímero P(HB:HV) 74:26%).

El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Fig. 8.2.) nos permite apreciar algunas diferencias entre los dos polímeros. Ambos copolímeros presentaron temperaturas de cristalización en el segundo ciclo de calentamiento (66,54 y 73,58 °C para una fracción de HV del 34 y del 26%, respectivamente)). Sin embargo, el copolímero con una fracción de HV del 34%, presentó también picos de cristalización en los ciclos de enfriamiento, sin embargo estos picos de cristalización se produjeron a diferentes temperaturas, en el primer ciclo de enfriamiento el pico de cristalización aparece a 66,5°C y en el segundo ciclo de enfriamiento aparece a 73,51°C. Mientras que el copolímero con una fracción de HV del 26% no presentó picos de cristalización en ninguno de los ciclos de enfriamiento.

Por otro lado, en la DSC también se puede apreciar la presencia de picos de fusión dobles lo que, junto con las altas temperaturas de fusión observadas (Tabla 8.1.) puede ser indicativo de la heterogeneidad del polímero o lo que es lo mismo de una microestructura en bloques (presencia de mezcla de diferentes polímeros). Asimismo, si se observa la variación de la composición del polímero a lo largo del ciclo, se puede apreciar que ésta cambió en el tiempo (Fig. 8.3). Inicialmente se obtiene un polímero rico en HB (80% HB) posiblemente como consecuencia de la elevada concentración de acetato (en torno al 70%), a la mayor velocidad de consumo del acetato con respecto a los otros ácidos grasos y a la mayor velocidad de acumulación de HB (el doble que la de HV), lo que vendría a simular una alimentación de acetato 100%. Sin embargo, a medida que avanza el ensayo se va incrementando la presencia de unidades de HV en el polímero. Este comportamiento es similar al observado por Arcos *et al.* (2013) al alimentar de forma alterna con acético (100%) y propiónico (100%) para de esta forma producir un copolímero con una microestructura en multibloque. Bengtsson *et al.* 2010 observó también un comportamiento similar al realizar ensayos con residuos de melazas fermentados. Ellos observaron la presencia de picos de fusión dobles en los termogramas de los plásticos y el análisis de las temperaturas de transición de los polímeros obtenidos reveló temperaturas de fusión más altas y entalpías de fusión más bajas que las reportadas por otros autores para polímeros con una composición similar. De la misma manera, ellos observaron también un cambio en la composición del polímero a lo largo del ciclo, el cual pasó de tener una alta fracción de HV al comienzo del ciclo a

presentar altas fracciones de HB al final del ciclo, coincidiendo con el consumo total del propionato.

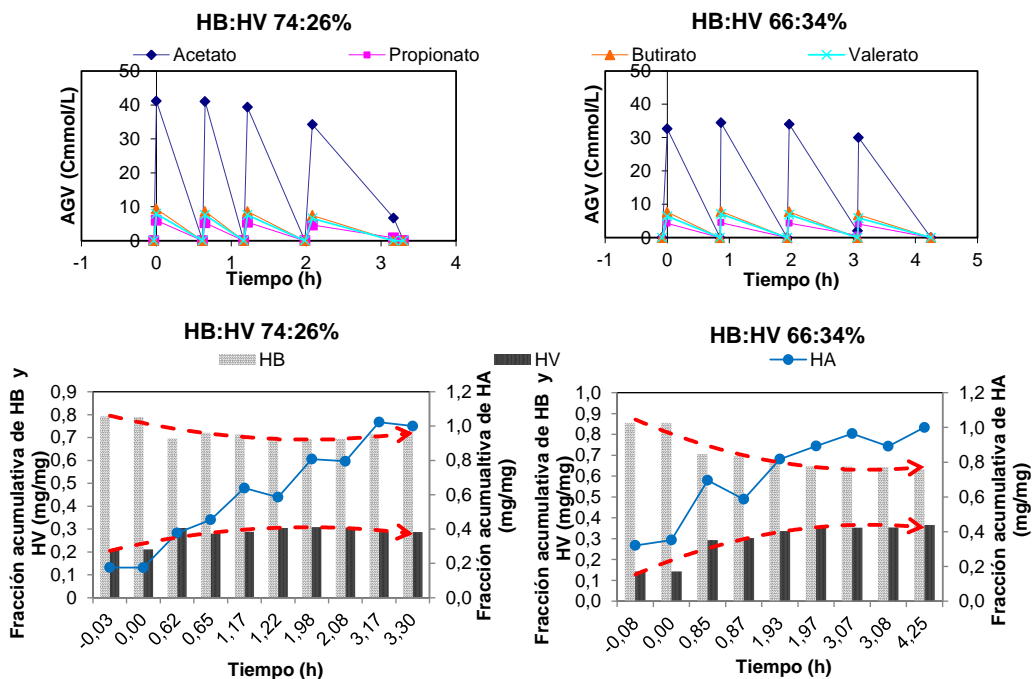


Fig. 8.3. En la parte de arriba, perfiles de los diferentes AGV alimentados durante un fedbatch y variación en la composición del polímero obtenido. En la parte de abajo fracción acumulativa de HB, HV y HA (mg/mg)

Como se puede apreciar en la Tabla 8.1., los resultados aquí obtenidos son del orden de los encontrados en la bibliografía para copolímeros obtenidos con cultivo mixto con una composición similar y una microestructura en bloque.

Tabla 8.1. Comparativa entre las propiedades de los plásticos

T_c (°C)	T_m (°C)	ΔH_c (J/g)
3,8	154,6/168,5	40,
3,8	154,6/168,5	43,
73,5	120,2	22,
-	120,2	-
3,6	154,6/168,5	46,
1,0	154,6/168,5	41,
3,9	154,6/168,5	47,

ΔH_m fue calculada a partir del pico más grande observado en el termograma. Los % cristalización fueron calculados considerando que el PHB presenta una cristalinidad de 100% (ΔH_m de 132 J/g.)

Con respecto al análisis termogravimétrico de los polímeros, este mostró que todos los plásticos determinados fueron térmicamente estables hasta 225 °C (pérdidas de peso menores al 1%) y que estos se degradaron en una sola etapa mostrando una temperatura máxima de degradación (T_{max}) en el rango 275-290 °C. Resultados similares se encontraron en la bibliografía. Bengtsson et al. (2010) encontró que todas las muestras analizadas por ellos, con un amplio rango de composición, presentaron temperaturas de descomposición entre 277,2 y 294,9 °C. Ellos también observaron que la temperatura de degradación máxima no estuvo influenciada por la composición del polímero ni por el peso molecular del polímero. Li et al. (2007) obtuvo temperaturas de degradación entre 296 y 307°C para copolímeros con hasta un 30% de HV y Carrasco et al. (2006) reportaron temperaturas de degradación máxima entre 266,7 y 272°C para copolímeros con un 20% de HV obtenidos a partir de un cultivo mixto enriquecido bajo condiciones aerobias de alimentación dinámica.

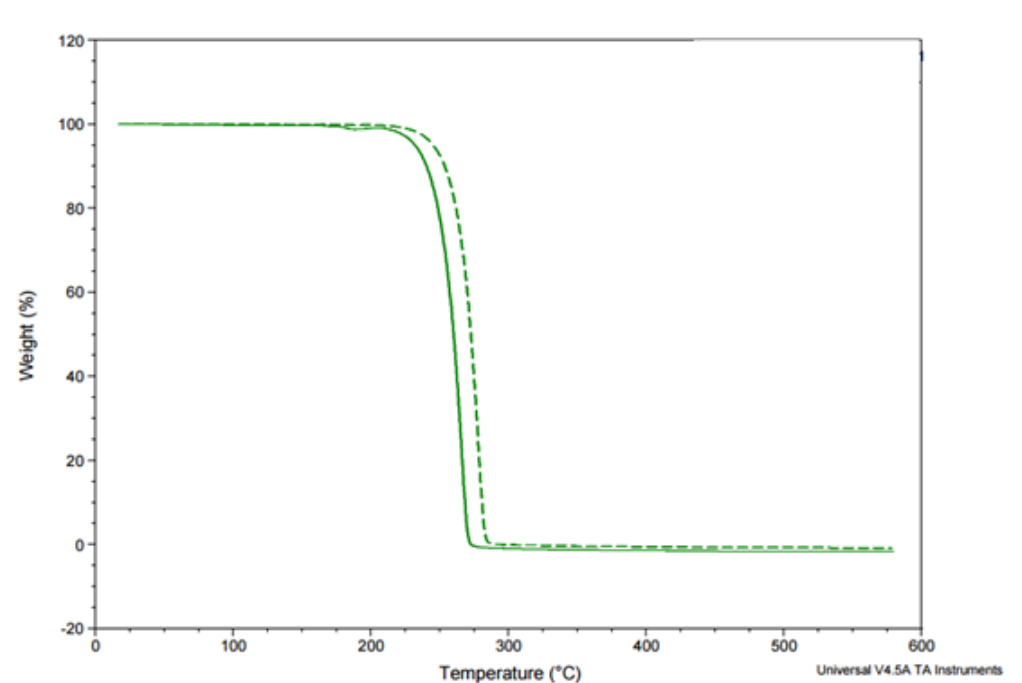


Fig. 8.4. Típica curva de calentamiento del análisis termogravimétrico de los polímeros caracterizados ((-) curva del copolímero P(HB:HV) 66:34% and (- -) curva del copolímero P(HB:HV) 74:26%).

8.3. Conclusiones.

Los principales resultados derivados de este trabajo son comentados brevemente en las siguientes líneas:

- El aumento en la fracción de HV en el copolímero producido, como cabía esperar, llevó a la disminución de las temperaturas y las entalpías de transición y por lo tanto a una reducción en su cristalinidad.
- La variación de la composición del polímero a lo largo del ciclo, junto con las altas temperaturas de fusión observadas y la presencia de picos de fusión dobles en el termograma indicaron una posible microestructura del polímero en bloques.

- Los polímeros obtenidos en este trabajo fueron térmicamente estables hasta los 225°C y ambos presentaron temperaturas de degradación máximas en el rango 275-290°C.

8.4. Referencias.

- Albuquerque, M. G. E.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoates (PHA) production from sugar cane molasses, *Journal of Biotechnology*, **130**, 411-421.
- Anderson et al. 1990
- Albuquerque, M. G. E.; Martino, V.; Pollet, E.; Avérous, L.; Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate production from fermented molasses: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties, *Journal of Biotechnology*, **151** (1), 66-76.
- Anderson, AJ; Dawes, EA. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiological Reviews*, **54**, 450–472
- Arcos-Hernandez MV, Laycock BL, Pratt SP, Al-Luaibi S, Werker A, Lant PA. (2013) Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV), *European Polymer Journal*, **49**, 904–13.
- Bengtsson, S., Pisco, A. R.; Johansson, P.; Lemos, P. C.; Reis, M. A. A. (2010). Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures, *Journal of Biotechnology*, **147**, 172–179
- Braunegg G.; Sonnleitner, B.; Lafferty R.M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **6**, 29-37.
- Carrasco, F., Dionisi, D., Martinelli, A., Majone, M., (2006). Thermal stability of polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Polymer Science*. **100**, 2111–2121.
- Comeau, Y.; Hall, K.J.; Oldham, W.K. (1988). Determination of poly- β -hydroxybutyrate and poly- β -hydroxyvalerate in activated sludge by gas-liquid chromatography, *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 2323-2327.
- Li, Z.G., Lin, H., Ishii, N., Chen, G.Q., Inoue, Y., (2007). Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and

- medium-chainlength3-hydroxyalkanoates. *Polymer Degradation and Stability*, **92**, 1708–1714.
- Miguel, O.; Eguiburu, J.; Iruin, J. J. (2001). Blends of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) with synthetic poly(3-hydroxybutyrate) and poly(epichlorohydrin): transport properties of carbon dioxide and water vapour, *Polymer*, **42**, 953-962
- Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **82**, 233–247. DOI: 10.1002/jctb
- Reddy, M. V.; Mohan, S. V. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment, *Bioresource Technology*, **114**, 573–582
- Satoh, H.; Mino, T.; Matsuo, T. (1992). Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxyalkanoates linked with glycolysis of intracellular carbohydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes., *Water Science and Technology*, **29**, 933-949.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Reis, M. A. M.; Ramos A. M. (2005). Tailored made polyhydroxyalkanoates from mixed cultures. Proceeding of the 8th Polymers for Advanced Technologies International Symposium. Budapest, Hungary, 13-16 September 2005
- Wen, Q.; Chen, Z.; Tian, T.; Chen W. (2010). Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge, *Journal of Environmental Sciences*, **22**(10), 1602–1607
- Williams, S. F.; Martin, D. P.; Horowitz, D. M., Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue I. issue engineering, *Biological Macromolecules*, **25**, 111-121.

9. Conclusiones

A continuación se exponen las principales conclusiones obtenidas en esta tesis:

1. Es posible la producción de PHA empleando cultivos mixtos como inóculo y agua residual generada en la industria cervecera como sustrato.
2. El uso de un agua residual de cervecera nos permitió seleccionar una biomasa con capacidad acumuladora y estable en el tiempo empleando dos estrategias diferentes para el enriquecimiento del lodo; una basada en la limitación de los nutrientes esenciales (nitrógeno y fósforo) y otra basada en la limitación de carbono.
3. Los parámetros óptimos de operación del reactor de enriquecimiento del lodo van a venir condicionados por la estrategia seguida. De esta manera:
 - a. Una estrategia basada en la limitación de nutrientes esenciales (condiciones limitantes del crecimiento celular) requerirá el empleo de bajas velocidades de carga orgánica (40 Cmmol/L·d) y la aplicación de altos tiempos de retención de lodos (TRS \geq 6 d), así como longitudes de ciclo largas (12 horas).
 - b. Una estrategia basada en la limitación del carbono (condiciones no limitantes del crecimiento celular) permite la aplicación de mayores velocidades de carga orgánica (100 Cmmol/L·d) con respecto a la basada en la limitación de nutrientes, así como permite operar el reactor a tiempos de retención de sólidos más bajos (TRS=1 d).
4. En contra de lo esperado, la optimización de la etapa de acumulación de PHA no fue tan crucial como la optimización de la etapa de selección de la biomasa, y esta dependió de la estrategia seguida en el enriquecimiento del lodo. De esta manera:
 - a. El empleo de un lodo enriquecido bajo condiciones limitantes de nutrientes requiere de la limitación del crecimiento mediante la limitación de los nutrientes en el medio (altas relaciones C/N) y la aplicación de condiciones que no favorezcan el crecimiento

- celular, para de esta forma aumentar la productividad del proceso.
- b. El empleo de un lodo enriquecido bajo condiciones limitantes de carbono dio lugar a un sistema robusto en el que la capacidad de acumulación del lodo no se vio alterada ni por la presencia de altas concentraciones de nutrientes ni por la aplicación de condiciones que favorecen el crecimiento celular, como es la alta temperatura. La productividad de este tipo de sistemas se pudo aumentar por la aplicación de una alimentación por pulsos en la que cada pulso contenía una alta concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).
5. Los mayores contenidos de PHA en célula y las mayores productividades fueron obtenidos con un lodo seleccionado bajo condiciones no limitantes del crecimiento celular (limitación del carbono). Llegándose a alcanzar contenidos en HA del 60-61% y producciones específicas de polímero de 1,2 Cmmol HA/CmmolX cuando el reactor fue operado con una velocidad de carga orgánica de 50 Cmmol/L-d, tiempos de retención de sólidos mayores a 6 d y a una temperatura de 30°C.
 6. La aplicación de condiciones favorables al crecimiento celular (bajas relaciones C/N/P y altas temperaturas) durante la etapa de enriquecimiento del lodo dio lugar a un aumento tanto en la velocidad de consumo de sustrato como en la velocidad de producción de polímero, siendo alcanzados valores similares a los observados para los reactores alimentados con sustratos sintéticos.
 7. La composición del plástico se puede regular mediante la concentración de nutrientes en el medio. Altas concentraciones de nitrógeno en la etapa de acumulación de PHA dieron lugar a polímeros con un mayor contenido en HV.
 8. El aumento de la fracción de HV en la composición del polímero llevó a una disminución en el grado de cristalinidad del polímero, así como a menores temperaturas de transición (temperatura de transición vítrea, temperatura de cristalización y temperatura de fusión).

9. Todos los polímeros caracterizados presentaron resistencia a la degradación hasta los 225 °C, y una temperatura de degradación máxima en el rango de 275-290°C.

