

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE UN CULTIVO MIXTO
MICROBIANO BASADO EN BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHA,
PROCEDENTES DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS

ANDREA LILIANA PEDRAZA LEÓN
DIANA SOFÍA POVEDA LADINO

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

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE UN CULTIVO MIXTO
MICROBIANO BASADO EN BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHA,
PROCEDENTES DE UN SISTEMA DE LODOS ACTIVADOS

ANDREA LILIANA PEDRAZA LEÓN
DIANA SOFÍA POVEDA LADINO

Proyecto integral de grado para optar por el título de:
INGENIERO QUÍMICO

Director
Iván Alejandro Ávila León
Microbiólogo industrial

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

NOTA DE ACEPTACIÓN

Ing. DIANA MILENA MORALES FONSECA
Jurado 1

Ing. SANDRA LILIANA MESA ESPITIA
Jurado 2

Bogotá D.C, Febrero 2020

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente Institucional y Rector del Claustro

Dr. MARIO POSADA GARCÍA

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados (E)

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN

Secretaría general

Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN

Decano Facultad de Ingeniería

Dr. JULIO CÉSAR FUENTES ARISMENDI

Director del Programa de Ingeniería Química

Ing. LEONARDO DE JESÚS HERRERA GUTIÉRREZ

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

DEDICATORIA

Infinitas gracias doy a Dios porque sin su voluntad no se lleva nada a cabo, agradezco a Dios y la vida por permitirme haber realizado esta investigación, la cual, ha dejado una lección valiosa para el diario vivir. Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, su persistencia y todos los valores inculcados porque gracias a ellos se culmina una fase importante en mi vida profesional. A mis hermanos, porque con a ellos y a sus sabios consejos se llevó a cabo este proyecto y se culmina con grandes conocimientos. A mis amigos Ángela Suarez, Andrés Jaime, Lina Meyer y Alejandra Jiménez ¡Gracias por su valiosa amistad! Con ustedes he aprendido lo que es una amistad apreciable, duradera y llena de cariño, gracias por ser el apoyo día a día.

A mi compañera de tesis, Sofía, muchas gracias por haberme incluido en esta oportunidad de proyecto, sabemos que, aunque hubo una serie de dificultades, juntas sabemos que esto será un pilar para nuestra vida profesional, nuestra vida personal y prontamente se nos aproximarán valiosas oportunidades, gracias por haber sido un apoyo durante este tiempo juntas. A los profesores Héctor Luna, Iván Avila y Juan Valderrama, por su paciencia, comprensión y su labor como docentes con este proyecto, han sido un valioso soporte y gran libro de conocimientos.

Andrea Liliana Pedraza L.

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios por darme fortaleza, calma, salud y optimismo para la realización y culminación de este trabajo. A mis padres por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo y a lo largo de mi carrera universitaria, quienes siempre me brindaron un consejo oportuno y ánimo en los momentos difíciles. A mis hermanas Ángela Poveda, Alejandra Poveda y Laura Poveda por siempre escucharme y creer en mí. A mi compañera de tesis por su templanza y apoyo en la realización del proyecto. A Juliana Parra, por siempre darme ánimo y ayuda durante el desarrollo de este trabajo y a lo largo de la carrera. A los docentes Héctor Luna, Iván León y Juan Valderrama por orientarnos, brindarnos sus conocimientos y aconsejarnos en la realización y culminación del proyecto de grado. Y a las personas que de una u otra manera ayudaron a la realización y culminación de este trabajo de grado. Por último, agradezco a Dios por concederme una familia que fomento en mí el gusto por el estudio y superación de las adversidades en calma.

Diana Sofía Poveda L.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a:

A Dios por brindarnos salud, fortaleza, optimismo y calma en los momentos difíciles durante la realización de este proyecto.

A nuestro director de tesis Iván Ávila por brindarnos sus conocimientos y oportunos consejos en la realización de este trabajo de grado, además de su paciencia y comprensión.

A la Fundación Universidad de América por la formación académica. Los miembros del comité, en especial a Elizabeth Torres y Fernando Moreno, quienes nos brindaron sus conocimientos y nos dieron una mano amiga en los momentos de dificultad.

A los miembros del grupo de investigación GRESIA de la universidad Antonio Nariño, por brindarnos un excelente ambiente de trabajo, por su colaboración y orientación constante para la realización y culminación del trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVOS	26
1. MARCO TEÓRICO	27
1.1 POLÍMEROS	27
1.1.1 Polímeros convencionales	27
1.1.2 Biopolímero	28
1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS	28
1.2.1 Clasificación de los PHAs	31
1.2.2 Estructura química y propiedades mecánicas de los PHAs	32
1.3 OBTENCIÓN DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	34
1.3.1 Síntesis de los PHAs	34
1.3.2 Producción de PHA	36
1.3.2.1 Producción de PHA con cultivos puros microbianos	36
1.3.2.2 Producción de PHA con cultivos mixtos microbianos	36
1.4 PRODUCCIÓN de PHA bajo el contexto de biorrefinería	37
1.4.1 Biorrefinería	37
1.4.2 Tipos de biorrefinería, según la biomasa	37
1.4.3 Etapas de la producción de PHA bajo el contexto de biorrefinería	38
1.4.3.1 Primera etapa: fermentación acidogénica	39
1.4.3.2 Segunda etapa: selección d bacterias acumuladoras de PHA	39
1.4.3.3 Tercera etapa: Acumulación de PHA	40
1.5 SUSTRATOS EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS	42
1.5.1 Melaza	42
1.6 MECANISMOS METABÓLICOS DE PRODUCCIÓN DE PHA	43
1.6.1 Crecimiento	44
1.6.2 Almacenamiento como incrustaciones intracelulares	44
1.7 DETECCIÓN DE PHA	44
1.8 APLICACIONES DE LOS PHAs	44
1.9 BIODEGRADABILIDAD DE LOS PHAS	45
1.10 CRECIMIENTO MICROBIANO	46
1.10.1.1 Concentración celular	47
1.10.1.2 Densidad de la biomasa	47
1.10.2 Métodos para medir el crecimiento microbiano	47
1.10.3 Crecimiento en términos de masa bacteriana	49
1.10.3.1 Fase de latencia	49
1.10.3.2 Fase de crecimiento exponencial	49
1.10.3.3 Fase de declinación del crecimiento	49

1.10.3.4 Fase endógena	49
1.11 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	50
1.11.1 Modelos Estructurados	50
1.11.2 Modelos no estructurados	51
1.11.3 Modelos de crecimiento microbiano	51
1.11.3.1 Modelo decrecimiento exponencial	51
1.11.3.2 Ecuación logística	51
1.11.4 Modelo de Monod	53
1.11.4.1 Eadie Hofstee	54
2. MATERIALES Y EQUIPOS	55
2.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	55
2.2 SUSTRATOS	55
2.2.1 Microorganismos	55
2.2.2 Medios de cultivo	56
2.2.1.1 Ácido acético	56
2.2.1.2 Melaza de caña de azúcar	57
2.3 EQUIPOS	57
2.4 REACTIVOS	60
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	65
3.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO BACTERIANO	65
3.1.1 Reactivación de las cepas bacterianas	66
3.1.2 Tinción de Gram	66
3.1.3 Barrido espectral	68
3.1.4 Preparación medio de cultivo con pH ajustado	68
3.1.5 Curva de calibración	68
3.1.5.1 Obtención de datos	68
3.1.6 Crecimiento microbiano	69
3.1.6.1 Obtención de datos	70
3.2 CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIO SINTÉTICO	70
3.2.1 Curva de calibración cultivo mixto	71
3.2.1.1 Obtencion de datos	71
3.2.2 Preparación medio sintética de 1600 mg DQO/L 72	71
3.2.2.1 Cantidades de melaza y acetato para la preparación de los sustratos	72
3.2.3 Crecimiento microbiano del cultivo mixto en medio sintético	75
4. RESULTADOS	77
4.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO	77
4.1.1 Reactivación de las cepas	77
4.1.1.1 Caracterización macroscópica	77
4.1.1.2 Caracterización microscópica	78
4.1.2 Barrido espectral	82
4.1.3 Curva de calibración	83

4.1.4 Crecimiento microbiano	84
4.2 CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO	84
4.2.1 Curva de calibración del cultivo mixto	84
4.2.1.1 Detección probable PHA por tinción Agar rojo Nilo	85
4.2.2 Crecimiento microbiano del cultivo mixto en medio sintético	87
4.2.2.1 Muestreo de medios sintéticos	89
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS	95
5.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO	95
5.1.1 Reactivación de las cepas.	95
5.1.2 Barrido espectral	96
5.1.3 Curva de calibración	97
5.1.4 Curvas de crecimiento microbiano	99
5.2 CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIOS SINTÉTICOS	104
5.2.1 Curva de calibración cultivo mixto	104
5.2.2 Cinética cultivo mixto microbiano medios sintéticos	105
5.2.2.1 Medio 1- 10% DQO H. Ac en solución melaza	106
5.2.2.2 Medio 2- 15% DQO H.Ac en solución melaza	109
5.2.2.3 Medio 3 - 20% DQO H. Ac en solución melaza	111
5.2.3 Comparación medios sintéticos	113
5.2.4 Parámetros cinéticos cultivo mixto, medios sintéticos	115
5.2.5 Selección relación de sustrato	120
5.3 MODELAMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIO SINTÉTICO	121
6. CONCLUSIONES	126
7. RECOMENDACIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXOS	135

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Principales monómeros que conforman los PHA	32
Tabla 2. Composición y características de la melaza de caña de azúcar	43
Tabla 3. Métodos para medir el crecimiento microbiano	47
Tabla 4. Equipos utilizados	57
Tabla 5. Reactivos	60
Tabla 6. Cantidad de melaza y Acetato para una DQO total de 1600 mg/L	71
Tabla 7. Caracterización microscópica de las colonias en Agar Nutritivo.	75
Tabla 8. Datos del barrido espectral para las cepas de trabajo	79
Tabla 9. Datos experimentales de densidad óptica y pesos seco	80
Tabla 10. Datos experimentales de la concentración de la biomasa	80
Tabla 11. Datos experimentales de densidad óptica y peso seco	81
Tabla 12. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 1-10% H.Ac en solución melaza	84
Tabla 13. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 2- 15% H.Ac en solución melaza	84
Tabla 14. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 3- 20% H.Ac en solución melaza	85
Tabla 15. Tiempo de duración de las fases de crecimiento microbiano para cada una de las cepas.	95
Tabla 16. Velocidades específicas de crecimiento y biomasa máxima	97
Tabla 17. Comparación parámetros cinéticos, medios sintéticos 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución melaza	115
Tabla 18. Comparación de parámetros de velocidad de formación de biomasa.	117

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Imagen microscópica de la acumulación de PHAs en la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	30
Figura 2. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente.	31
Figura 3. Clasificación de los PHAS según la longitud de cadena lateral	33
Figura 4. Estructura general química de PHAS	34
Figura 5. Vías metabólicas para la síntesis de PHA.	36
Figura 6. Esquema experimental planteado para la producción de PHA	39
Figura 7. Degradación completa de PHA en menos de 50 días bajo condiciones tropicales	46
Figura 8. Curva característica de crecimiento bacteriano en términos del registro de la masa de los organismos	48
Figura 9. Metodología para la selección de las bacterias que conformaran el cultivo mixto bacteriano	63
Figura 10. Procedimiento coloración de Gram	64
Figura 11. Metodología para la selección de la relación de sustrato de un medio sintético	68

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Curva espectral para las cepas 3,9,12 y 13.	92
Gráfica 2. Curva de calibración cepa 10.	93
Gráfica 3. Curvas de crecimiento para cada cepa	96
Gráfica 4. Curva de crecimiento Cepas grupo 1.	98
Gráfica 5. Curvas de crecimiento cepas grupo 2.	99
Gráfica 6. Curva de calibración del cultivo mixto microbiano.	100
Gráfica 7. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo, 10%H.Ac	103
Gráfica 8. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-10% DQO H.Ac	104
Gráfica 9. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo, 15%DQO H.Ac	106
Gráfica 10. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-15% DQO H.Ac	106
Gráfica 11. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo,20% DQO H.Ac	108
Gráfica 12. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-20%DQO H. Ac	108
Gráfica 13. Comparación crecimiento microbiano, consumo de sustrato, control semi-cuantitativo de la acumulación del PHA para los medios sintéticos 10%, 15% y 20% de H Ac en solución melaza	110
Gráfica 14. Determinación μ , medio 1, 10% H. Ac en solución melaza.	111
Gráfica 15. Determinación μ , medio 2, 15% H. Ac en solución melaza.	112
Gráfica 16. Determinación μ , medio 3, 20% H. Ac en solución melaza.	112
Gráfica 17. Determinación $Y_{x/s}$, Medio 1, 10% H. Ac en solución melaza.	113
Gráfica 18. Determinación $Y_{x/s}$, Medio 2, 15% H. Ac en solución melaza.	114
Gráfica 19. Determinación $Y_{x/s}$, Medio 3, 20% H. Ac en solución melaza.	114

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Concentración de biomasa en función del tiempo	51
Ecuación 2. Concentración de la biomasa en función del tiempo.	52
Ecuación 3. Ecuación logística para crecimiento microbiano	52
Ecuación 4. Concentración de la biomasa en función del tiempo.	53
Ecuación 5. Ecuación de Monod para el crecimiento de biomasa	53
Ecuación 6. Ecuación de Monod para el consumo de sustrato	54
Ecuación 7. Ecuación de Eadie Hofstee	54
Ecuación 8. Fórmula para determinar sólidos suspendidos totales.	66
Ecuación 9. Ecuación de curva de calibración	93
Ecuación 10. Ecuación de la línea para el cultivo mixto	100

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Caracterización macroscópica de las colonias en Agar Nutritivo y Glucosa.	74
Cuadro 2. Detección probable de PHA por tinción Agar rojo Nilo para la curva de calibración del cultivo mixto.	82
Cuadro 3. Extensiones en placa para los medios sintéticos 10%, 15% y 20% H.Ac en solución melaza.	85

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Medios de cultivos empleados	131
Anexo B. Construcción del sistema de agitación	133
Anexo C. Coloración negro de sudán	135
Anexo D. Protocolo ssv ideam	136
Anexo E. Repetición de datos curva de calibración cepa 10	138
Anexo F. Datos por repetición de la concentración de la biomasa y coloración de Gram	139
Anexo G. Protocolo determinación biomasa cultivo mixto	141
Anexo H. Resultados obtenidos en los reactores acidogénicos	142
Anexo I. Curva de calibración DQO entre 100 a 900 mg DQO/L	146
Anexo J. Linealización de cada una de las cepas	147
Anexo K. Concentración de biomasa y consumo de sustrato.	153
Anexo L. Ecuación logística	159
Anexo M. Ecuación eadie-hofstee	160

ABREVIATURAS

PHA: Polihidroxicanoato.

PHB: Polihidroxiacetato.

Lb: Libra.

AGVs: Ácidos grasos volátiles.

UV: Ultra violeta.

SST: Sólidos suspendidos totales.

SSV: Sólidos suspendidos volátiles.

DQO: Demanda química de oxígeno.

nm: Nanómetros.

UFC: Unidades formadoras de colonia.

mL: Mililitro.

rpm: Revoluciones por minuto.

W₀: Peso inicial.

W_f: Peso final.

ΔW: Diferencial de peso.

D.O.: Densidad óptica.

LPS: lipopolisacáridos.

H. Ac: Ácido acético.

R²: Coeficiente de correlación.

μ_x: Velocidad específica de crecimiento.

Y_{x/s}: rendimientos de la biomasa.

X_0 : concentración inicial de la biomasa.

X_m : concentración máxima de biomasa.

S: sustrato.

ACS: Grado de reactivo analítico

GLOSARIO

ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES: son ácidos orgánicos de cadena corta, de bajo peso molecular que pueden ser obtenidos por medio de la fermentación de sustratos complejos.

AZÚCAR FERMENTABLE: sustancia orgánica que contiene carbonos, oxígenos e hidrógenos, las cuales pueden ser metabolizadas por microorganismos para la obtención de energía.

BACTERIAS: organismos procariotas unicelulares microscópicos, capaces de transformar sustancias orgánicas en inorgánicas y viceversa.

BIODEGRADABLE: descomposición de un compuesto químico orgánico por microorganismos en presencia o ausencia de oxígeno para dar dióxido de carbono, agua, sales minerales en cualquier elemento presente y nueva biomasa.

BIOMASA: materia orgánica originada en un proceso biológico que puede ser utilizada como fuente de energía.

BIOREFINERÍA: integra procesos sustentables para la conversión de biomasa para producir energía, combustible, biomateriales y bioproductos.

CEPA MICROBIANA: identificación mediante características determinadas para un grupo particular de microorganismos.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO: descripción matemática del proceso de fermentación con el fin de cuantificar, modelar y conocer el comportamiento del sistema biomasa, sustrato y metabolito por medio de métodos directos o indirectos.

COPOLIMERO: están formados por dos o más unidades monoméricas distintas que dependen principalmente de los microorganismos y la fuente de carbono usado.

CRECIMIENTO EQUILIBRADO: incremento de masa celular debido a la síntesis de la totalidad de sus componentes (azúcares, lípidos, etc.). Esto conlleva a la proliferación o división celular. El crecimiento exponencial es por lo general balanceado.

CRECIMIENTO DESEQUILIBRADO: el incremento de la masa celular es debido al crecimiento de un solo componente (cualquier material de reserva) que no conlleva división celular.

CULTIVO AXÉNICO: conformado por una única especie, cepa o variedad de organismo

CULTIVO MIXTO MICROBIANO: presencia de microbios de diferente especie que permite que las cualidades naturales de las diferentes especies se complementen.

FASE DE ADAPTACIÓN O LATENCIA: período de adaptación a las nuevas condiciones ambientales de un medio de cultivo

FASE DE MUERTE: etapa donde los microorganismos sufren lisis celular por falta de nutrientes, en algunos casos las bacterias muertas sirven como nutrientes.

FASE EXPONENCIAL: período donde la población se incrementa de modo regular, duplicándose a intervalos regulares de tiempo.

FASE ESTACIONARIO: etapa donde el crecimiento de los microorganismos se detiene esencialmente por agotamiento de nutrientes y acumulación de productos tóxicos, pero aún hay nutrientes para mantenerse vivas.

FERMENTACIÓN: descomposición de una sustancia orgánica mediante enzimas o microorganismos para producir metabolitos de valor industrial.

HOMOPOLÍMERO: están constituidos por un mismo monómero, se obtienen cuando se presenta una sola fuente de carbono específica.

INCUBACIÓN DE MICROORGANISMOS: proceso de desarrollo del crecimiento microbiano y producción del metabolito bajo condiciones de operación controladas como temperatura, agitación, pH.

LODOS ACTIVADOS: proceso principalmente utilizado para el tratamiento de aguas residuales, el cual se caracteriza por poseer una gran variedad de microorganismos (cultivo mixto).

MATERIAL BIODEGRADABLE: material que es posible descomponer por la acción de agentes biológicos como microorganismos.

MATERIAL RECALCITRANTE: sustancias que no son biodegradables bajo condiciones ambientales naturales.

MEDIO DE CULTIVO: mezcla de nutrientes que permiten el crecimiento de microorganismos.

METABOLITO: sustancia final producida durante o después de la descomposición de un sustrato por microorganismos.

MODELOS CINÉTICOS ESTRUCTURADOS: modelos que consideran los aspectos básicos de la célula y sus especies químicas, se tienen en cuenta

componentes intracelulares (ribosomas, RNA, enzimas, etc.). Tienen en cuenta las rutas metabólicas que se llevan a cabo intracelularmente.

MODELOS CINÉTICOS NO ESTRUCTURADOS: modelos que consideran que los microorganismos y/o células poseen una composición fija y simple y a su vez considera que las reacciones biológicas dependen solamente de variables macroscópicas. Desprecia los cambios en el medio de cultivo producto de la concentración de biomasa.

POLIHIDROXIALCANOATOS: son polímeros biodegradables de naturaleza lipídica que se acumulan en el citoplasma de algunos microorganismos.

POLÍMERO: macromolécula formada por largas cadenas de monómeros que presentan elevada masa molecular.

RUTA METABÓLICA: proceso bioquímico por el cual los microorganismos metabolizan un sustrato para producir metabolitos.

SUSTRATO: sustancia que debe contener nutrientes que sean fuente de energía para que el microorganismo se desarrolle efectuando rutas metabólicas para tal propósito.

RESUMEN

El grupo de investigación GRESIA de la Universidad Antonio Nariño trabaja en un proceso de producción de PHA bajo el contexto de biorrefinería conformado por tres etapas, fermentación acidogénica, enriquecimiento selectivo de B-PHA y acumulación de PHA; sobre esta última etapa trabajó este proyecto de Grado, en dónde se estimó los parámetros cinéticos de un cultivo mixto bacteriano acumulador de PHA, aisladas de un sistema de lodos activados, proveniente de la segunda etapa de enriquecimiento selectivo de las B-PHA.

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizó un medio sintético de H.Ac en solución melaza a un pH de 5, condiciones que pertenecen a la corriente de salida del reactor acidogénico¹, correspondiente a la primera etapa: fermentación acidogénica, con el que se alimenta el reactor de acumulación.

Se analizó el crecimiento de 13 cepas aisladas de un sistema de lodos activados, provenientes de la segunda etapa de selección de B. PHA, en el que se adaptó las cepas a pH 5 en un medio comercial no selectivo usado en el laboratorio, seleccionando las cepas 1, 4, 6, 10 y 13, que presentaron un comportamiento similar en cuanto a su crecimiento y alcanzaron concentraciones máximas y velocidades de formación de biomasa mayores en comparación con las demás cepas.

El cultivo mixto microbiano conformado, fue evaluado en tres medios sintéticos, 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución melaza, nombrados como medio 1, medio 2 y medio 3, respectivamente; en el que se seleccionó la relación de sustrato del medio 2, 15% H. Ac en solución melaza; este medio tuvo un comportamiento de crecimiento mayor, alcanzando la mayor cantidad de biomasa máxima correspondiente a 3685 mg de biomasa en donde el pH alcanzó la neutralidad ya que el acetato presente en el medio sirvió como tampón químico. El rendimiento de la biomasa fue de 0.0143 mg biomasa/ mg DQO. También, la velocidad específica de crecimiento fue mayor en este medio, creciendo casi al doble de la velocidad específica de crecimiento del medio 1. Para el control semi-cualitativo del PHA, se observó que el medio 2 alcanzó la máxima acumulación a las 48 horas, incrementándose paulatinamente hasta las 72 horas, en comparación a los otros dos medios sintéticos.

Se ajustaron los modelos de crecimiento exponencial, modelo logístico y la linealización de la ecuación de Monod por Eadie-Hofstee obteniendo valores en la velocidad específica de crecimiento de 0.0471 h⁻¹, 0.0586 h⁻¹ y 0.0005 h⁻¹, respectivamente, obteniendo un mayor ajuste, con un coeficiente de correlación de 0.9997, por la linealización de la ecuación de Monod por Eadie-Hofstee.

¹ MORA, Carlos Eduardo. Evaluación de la producción de ácidos grasos volátiles (AGVS) a diferentes alturas en dos tipos de reactores anaerobios (ASTBR Y UFBR.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, parámetros cinéticos, cultivo mixto, efluente sintético.

INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de materiales plásticos ha causado una problemática ambiental a nivel global ya que los residuos generados no son biodegradables y se acumulan en el medio ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año². Además, emplea como materia prima recursos no renovables. En vista de esta problemática se han buscado estrategias para mitigar la acumulación de plástico en el ambiente como incinerar, reciclar, foto degradar e incluso reutilizar; sin embargo, estas soluciones no son adecuadas ya que generan otro tipo de contaminantes³. En consecuencia, se ha planteado la sustitución de los plásticos de origen petroquímico por polímeros biodegradables⁴.

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros, biocompatibles y biodegradables, que tienen propiedades termoplásticas y elastoméricas similares a los plásticos convencionales con la gran diferencia que es completamente biodegradable⁵ de ácidos hidroxialcanóicos que más de 300 bacterias diferentes acumulan intracelularmente, en forma de gránulos, como material de reserva cuando en el medio hay abundancia de carbono y déficit de elementos como nitrógeno, fósforo, magnesio entre otros⁶. Sin embargo, la producción de PHA en una biorrefinería aún no es competitiva frente a los plásticos convencionales de la refinería, debido a los costos elevados de producción de los biopolímeros, que se generan al utilizar sustratos refinados y cultivos puros microbianos provocando en definitiva condiciones desfavorables para una producción a gran escala que pueda competir con la industria de plásticos convencionales⁷, con costos de fabricación aproximados de US\$ 2.25-2.75/lb y US\$ 0.60-0.87/lb respectivamente.⁸

² GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTRERAS, Juan Carlos; GONZALES REYNOSO, Orfil; CÓRDOVA LÓPEZ, Jesús Antonio, Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional De Contaminación Ambiental. Febrero 2013. vol. 29, no. 1, p. 77-115

³ *Ibíd.* p. 77-115

⁴ MONTAÑO HERRERA, Liliana. Modelado Matemático De La Acumulación De Polihidroxicanoatos (PHA) En Cultivos Mixtos Durante El Tratamiento De Aguas Residuales. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011. p. 105

⁵ MONTAÑO HERRERA, *Op cit.*, p 79.

⁶ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: Teoría Y Praxis Investigativa. vol. 5, no. 2, p. 79-84

⁷ JOHNSTON, Brian; RADECKA, Iza; Hill, David; CHIELLINI, Emo; Ilieva, VASSILKA Ivanova; SIKORSKA, Wanda; MUSIOŁ, Marta; ZIĘBA, Magdalena; MAREK, Adam A; KEDDIE, Daniel; MENDREK, Barbara; DARBAR, Surila; ADAMUS, Grazyna y KOWALCZUK, Marek. The Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates from Waste Polystyrene Fragments Attained Using Oxidative Degradation. En: *Polymers*. 2018. vol. 10, no. 9, p. 957

⁸ *Ibíd.* p. 957

Debido a lo expuesto anteriormente, el grupo de investigación GRESIA de la Universidad Antonio Nariño tiene una línea de investigación en bioprocesos que se basa en la valorización de la biomasa de segunda generación, en bioproductos de valor agregado bajo el concepto de biorrefinería. Por ello tiene un proceso general para la producción de PHA, compuesto por tres etapas claves; en donde se han realizado investigaciones en la primera y segunda etapa. El proyecto de investigación se enfoca en la tercera etapa del proceso de producción de PHA planteado por el grupo de investigación de la Universidad Antonio Nariño, por lo que se hace necesario conocer los parámetros cinéticos de las bacterias acumuladoras de PHA seleccionadas en la segunda etapa del proceso (provenientes de un sistema de lodos activados capaces de metabolizar AGV), en medio sintético proveniente del reactor acidogénico correspondiente a la primera etapa, ya que, permite mejorar el proceso de fermentación y de esta manera optimizar el proceso productivo de PHA.

Para realizar un análisis riguroso se emplean modelos cinéticos que permiten obtener balances de masa celular, concentración del producto, rendimiento de la fuente de carbono seleccionada e identificación del sustrato limitante, en otras palabras, los modelos cinéticos facilitan el análisis de datos y proporcionan estrategias para resolver problemas presentes en los procesos de fermentación. Esta información es bastante importante para la mejora del rendimiento del producto de interés, en este caso el PHA, y la conversión de la fuente de carbono que tiene una repercusión directa sobre la productividad del proceso⁹, además, esto constituye un aspecto fundamental en el diseño, operación, simulación y predicción del comportamiento de los reactores biológicos.¹⁰ Para el diseño de los biorreactores que intervienen en la producción de PHA, es necesario seleccionar un modelo cinético, ya que este permite conocer el comportamiento microbiano, definido como una correlación matemática entre las velocidades y la concentración de reactantes/producto en el comportamiento microbiano que tiene lugar en este bioproceso.

Los modelos cinéticos conllevan una complejidad para describir el cambio producido dentro del microorganismo, por ello para la etapa inicial de una investigación es recomendable seleccionar modelos cinéticos no estructurados.¹¹

⁹ VANEGAS, Diana M. y RAMÍREZ, Margarita E. Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHA MCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. En: Información Tecnológica. vol. 27, no. 2, p. 87-96

¹⁰ DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. , Enero. 1995. vol. 33, no. 9, p. 123-148

¹¹

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estimar los parámetros cinéticos de un cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA, provenientes de un sistema de lodos activados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las cepas para el cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA provenientes de un sistema de lodos activados, basado en el crecimiento a pH 5.
- Seleccionar la relación de sustrato (melaza/acetato) basado en el crecimiento del cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA provenientes de un sistema de lodos activados.
- Ajustar un modelo cinético para el cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA provenientes de un sistema de lodos activados, para la relación de sustrato (melaza/acetato) seleccionado.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 POLÍMEROS

Los polímeros son macromoléculas constituidas por la repetición de unidades químicas simples que son equivalentes al monómero o material que es punto de partida para la formación del polímero; por ejemplo, la unidad que se repite en el cloruro de vinilo es $-CH_2CHCl-$ y por tanto su monómero es el cloruro de vinilo $CH_2=CHCl$.¹²

Los polímeros se pueden clasificar de acuerdo a su origen en petroquímicos (sintéticos) y de recursos renovables (biopolímeros).

Los polímeros a partir de recursos renovables son los que se crean naturalmente de plantas y animales, o totalmente sintetizados a partir de recursos renovables.

Los polímeros a base de petróleo, como su nombre lo indica, son polímeros que provienen de derivados de origen fósil, no degradables al final de su funcionalidad.

Los polímeros a partir de fuentes mixtas son fabricados por medio de combinaciones de materiales de base biológica y monómeros derivados del petróleo.¹³

1.1.1 Polímeros convencionales. Los plásticos son los polímeros convencionalmente usados, estos en su mayoría son obtenidos a partir del petróleo, creados para desempeñarse en funciones específicas, que pueden tener aplicaciones tanto industriales (farmacéutica, alimentos y transporte entre otros), como en la vida cotidiana; es por esto que es considerado uno de los grandes avances del siglo XX.¹⁴

Los plásticos presentan propiedades como resistencia a la degradación, ligereza, durabilidad (inalterables a los agentes atmosféricos), aislantes de la corriente eléctrica y pueden sustituir la madera, el papel de envolturas, la piedra o el metal. Son productos versátiles y además económicos, sin embargo, estos polímeros convencionales o sintéticos perduran en la naturaleza por largos periodos de tiempo, debido a su alto peso y conformación molecular que los hace materiales

¹² BILLMEYER, Fred. Ciencia De Los Polímeros. 1 ed. Barcelona: Reverté SA, 1975. p. 610

¹³ RODRÍGUEZ, S Lady y ORREGO, Carlos. Aplicaciones De Mezclas De Biopolímeros Y Polímeros Sintéticos: Revisión Bibliográfica. En: Revista Científica Del Centro De Investigaciones Y Desarrollo Científico De La Universidad Distrital Francisco José De Caldas. 2016,. vol. 2, no. 25, p. 252-264

¹⁴ VALERO VALDIVIESO, Manuel Fernando; ORTEGÓN, Yamileth y USCATEGUI, Yomaira. BIOPOLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS. En: Dyna. 2013. vol. 80, no. 181, p. 171-180

recalcitrantes y como se dijo anteriormente, resistentes a la acción degradadora de los microorganismos.

1.1.2 Biopolímeros. Los principales biopolímeros producidos y comercializados en el mundo son: biopolímeros derivados del almidón, el Ácido Poliláctico (PLA), los PHAs, entre otros¹⁵.

Los PHAs son biopolímeros sintetizados por microorganismos como resultado de su mecanismo de defensa o como material de almacenamiento; sus ventajas frente a otros biopolímeros es su versatilidad ya que son termoplásticos que pueden ser procesados de igual forma que el polietileno y el polipropileno.

Estas propiedades termoplásticas y elastómeras y sobre todo su biodegradabilidad fueron las que motivaron las investigaciones sobre los PHAs, aunque también hubo un mayor auge debido a la crisis petrolera de los años 70.

1.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos, biocompatibles y biodegradables que más de 300 bacterias diferentes acumulan intracelularmente en forma de gránulos como material de reserva cuando en el medio hay abundancia de carbono y déficit de elementos como nitrógeno, fósforo, magnesio entre otros o en un pH no óptimo¹⁶; son producidos mediante la fermentación de una fuente de carbono por parte del microorganismo, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía.

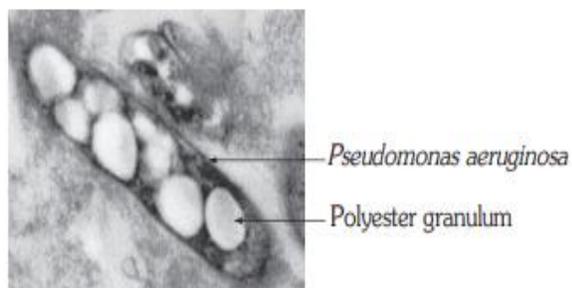
Por célula pueden almacenar de 8-10 gránulos de PHA, los cuales tienen un peso molecular aproximado de 2×10^5 hasta 3×10^6 Dalton. En la **figura 1** se puede observar la acumulación de PHA en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷

¹⁵ NARANJO VASCO, Javier Mauricio. Producción De Polihidroxitirato a Partir De Residuos Agroindustriales. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, 2010. p. 127

¹⁶ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Op cit., p. 79-84

¹⁷Ibíd. p. 79-84

Figura 1. Imagen microscópica de la acumulación de PHAs en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.



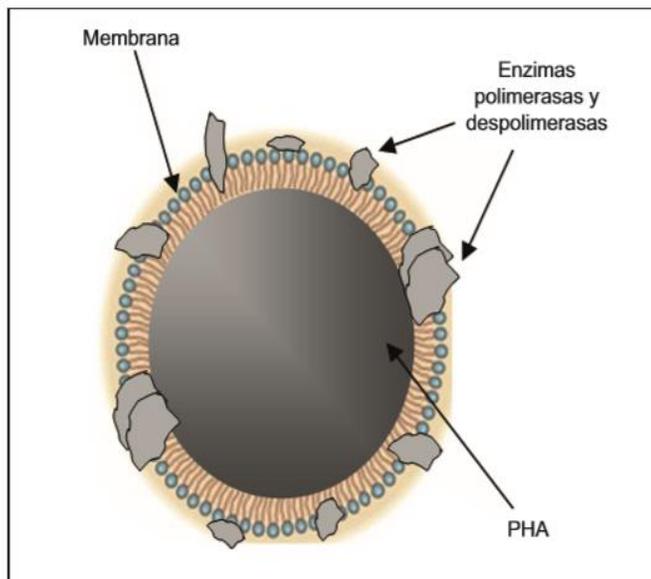
Fuente: SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: Teoría Y Praxis Investigativa. vol. 5, no. 2, p. 79-84.

En la **figura 2** se presenta una vista más detallada de la estructura y características de los gránulos que contienen el PHA acumulado por los microorganismos, los cuales están rodeados por una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas.

La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos se da por medio de enzimas intracelulares que permiten la condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster por lo que también se les denomina biopoliésteres¹⁸

¹⁸ GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTRERAS, Juan Carlos; GONZALES REYNOSO, Orfil; CÓRDOVA LÓPEZ. Op cit., p. 77-115

Figura 2. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente.



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

Según investigaciones realizadas sobre los procesos de producción y acumulación de PHA llegan a la conclusión que independientemente de la disponibilidad de sustrato o la acción de la enzima polimerasa, hay una restricción física que impide que la célula acumule más del 80- 90% del peso celular en base seca de la bacteria¹⁹.

¹⁹ GARCÍA, Luis A, NOVA Julián, FRANCO R, Ana and HIGUITA, Luz. Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. En: REVISTA QUID. Diciembre, 2015. vol. 25, p. 69-78

1.2.1 Clasificación de los PHAs. Los PHAs se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de sus unidades monómeras, si el polímero está formado por solo un tipo de unidades se denomina homopolímero, el más conocido es el polihidroxi-butilato (PHB) ²⁰ se obtienen cuando se presenta una sola fuente de carbono específica. Por otro lado, si está conformado por monómeros de distinta longitud de átomos de carbono en el mismo gránulo se refiere a un copolímero ya que se suministra más de una fuente de carbono,²¹ siendo el más estudiado el polihidroxi-butilato y polihidroxi-valerato conocido como polihidroxi-butilato-valerato (PHBV).

En la **tabla 1** se presentan una variedad de monómeros que pueden conformar los PHA.

Tabla 1. Principales monómeros que conforman los PHA

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

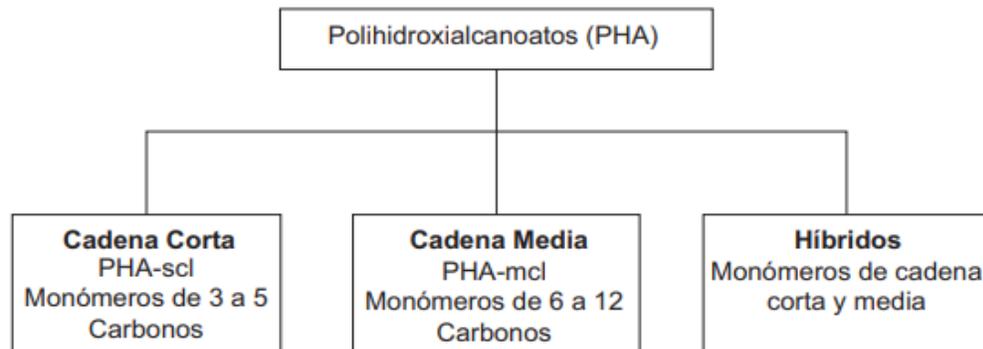
Fuente: GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTRERAS, Juan Carlos; GONZALES REYNOSO, Orfil; CÓRDOVA LÓPEZ, Jesús Antonio, Síntesis y biodegradación de polihidroxi-alcanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional De Contaminación Ambiental. Febrero 2013. vol. 29, no. 1, p. 77-115.

²⁰ KHANNA, Shilpi y SRIVASTAVA, Ashok K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. En: Process Biochemistry. vol. 40, no. 2, p. 607-619

²¹ GARCÍA, Luis A, NOVA Julián, FRANCO R, Ana y HIGUITA, Luz. Op cit., p. 69-78

También se pueden clasificar según la longitud de la cadena lateral de ácidos hidroxialcanoicos de su estructura monomérica, cuya división se muestra en la **figura 3**.

Figura 3. Clasificación de los PHAS según la longitud de cadena lateral.



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

Otra clasificación que presentan los PHA es según las condiciones del cultivo que requieren para la síntesis del polímero, por lo que se pueden clasificar en dos grupos. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, oxígeno) ²² suministrando un exceso de fuente de carbono.

El segundo grupo, por el contrario, no requiere de la limitación de un nutriente, la acumulación de PHA se puede dar en grandes cantidades durante de la fase de crecimiento.

1.2.2 Estructura química y propiedades mecánicas de los PHAs. Los polihidroxialcanoatos presentan propiedades termoplásticas, elastómeras y su estado físico es el de un polímero amorfo móvil,²³ siendo estas características las que han despertado el interés como bioplástico.

Las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los PHA como los son la fragilidad, la rigidez, el punto de fusión, la ductilidad, la elasticidad, la cristalinidad, la temperatura de transición vítrea, entre otras, dependen de la composición monomérica del biopolímero aunque también influye el peso molecular que

²² GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTRERAS, Juan Carlos; GONZALES REYNOSO, Orfil; CÓRDOVA LÓPEZ. Op cit, p. 77-115

²³ ARCOS HERNÁNDEZ, Mónica Vanessa. Degradación De Aguas Residuales Y Producción De Polihidroxialcanoatos Mediante Un Biorreactor Discontinuo. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2007. p. 138

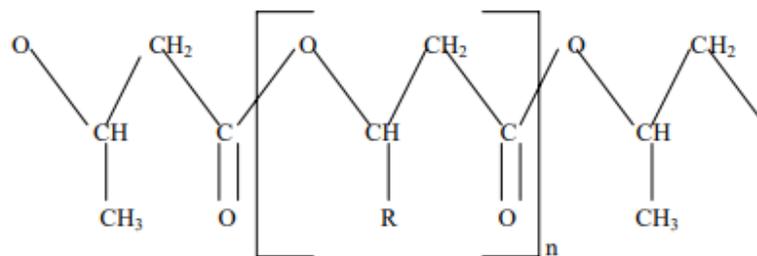
depende a su vez del tipo de microorganismo con el que se trabaje y la clase de sustrato suministrado²⁴, por lo que este biomaterial tiene una extensa variedad de aplicaciones.

Por ejemplo, cuando en un copolímero se aumenta el porcentaje de homopolímero 3HV (hidroxivalerato) y se disminuye el porcentaje de homopolímero 3HB (hidroxibutirato), éste es más flexible y más duro, mientras que el esfuerzo último a tensión disminuye y la elongación requerida para la ruptura aumenta.

Por otro lado, los PHAs son estables ante los rayos UV. Su temperatura de fusión parcial es superior a los 180°C y muestran una baja permeabilidad al agua²⁵

La forma estructural general de los PHA se muestra en la **Figura 4**, en donde se observa que se compone típicamente de 600 a 35.000 (R) -hidroxiunidades de monómero de ácido graso²⁶

Figura 4. Estructura general química de PHAS



n varies from 600 to 35000

R= hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
R=methyl	Poly(3-Hydroxybutyrate)
R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)

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

²⁴ SIERRA MOJICA Winston Aaron. Propuesta de proyecto de educación ambiental (Escoplásticos). Bogotá D.C.: Fundación Universidad América, 2016. p. 97.

²⁵ GARCÍA, Luis A, NOVA Julián, FRANCO R, Ana y HIGUITA, Luz. Op cit., p. 69-78

²⁶ KHANNA, S. y SRIVASTAVA, A.K. Op cit.,p. 607–619

1.3 OBTENCIÓN DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

1.3.1 Síntesis de PHAs. Como ya se dijo anteriormente la composición monomérica de los biopolímeros PHAs es muy variada, depende de la fuente de carbono y el tipo de microorganismo que a su vez determinan las rutas metabólicas por las cuales fueron sintetizados. Las vías metabólicas por las que se produce PHA son principalmente la degradación de azúcares mediante la obtención de Acetil CoA (glucólisis), ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs), la degradación de ácidos grasos (β -oxidación) y/o biosíntesis de ácidos grasos y el catabolismo de aminoácidos.²⁷

Así como las polimerasas son las enzimas encargadas de la síntesis de PHA, las despolimerasas (PHAZ) se encargan de la degradación del PHA. Para ello existen tres tipos de degradación: Intracelular, extracelular y periplásmica²⁸. En bacterias como *Ralstonia eutro*, se ha observado que la tasa de degradación del polímero acumulado es aproximadamente diez veces más lenta que la tasa de síntesis. Sin embargo el mecanismo de degradación de PHA no se ha investigado tan extensamente como la síntesis²⁹.

La biosíntesis de PHA, como ya se mencionó anteriormente, se presenta fundamentalmente cuando las condiciones nutricionales para el crecimiento de los microorganismos son desequilibradas, debido a bajas concentraciones de coenzima-A libre y a una alta concentración de NADH, está última a consecuencia del cese de síntesis de proteínas, relacionado estrechamente a la generación de ATP por la cadena de transporte de electrones que ocurre durante la limitación de algún nutriente necesario para las funciones celulares. Lo expuesto anteriormente causa que el acetil-CoA no pueda entrar al ciclo de Krebs para la producción de energía y el crecimiento celular ya que el NADH inhibe a la enzima citrato sintetasa (enzimas clave del ciclo TCA), entonces, el acetil-CoA es utilizada como sustrato para la biosíntesis del PHA mediante la secuencia de tres reacciones enzimáticas. Cuando no hay limitación del acetil-CoA para entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), CoA es liberado mientras la parte de acetil proveniente de la actividad de la enzima citrato sintetasa (la acetil-CoA) es utilizada, por lo que se incrementa la concentración de CoA causando que la enzima β -ketotiolasa, una de las tres responsables de la síntesis de PHA, se inhiba junto con la síntesis de PHA.

²⁷ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Op cit. p. 79-84

²⁸ SIERRA MOJICA Winston Aaron. Op cit. p. 97

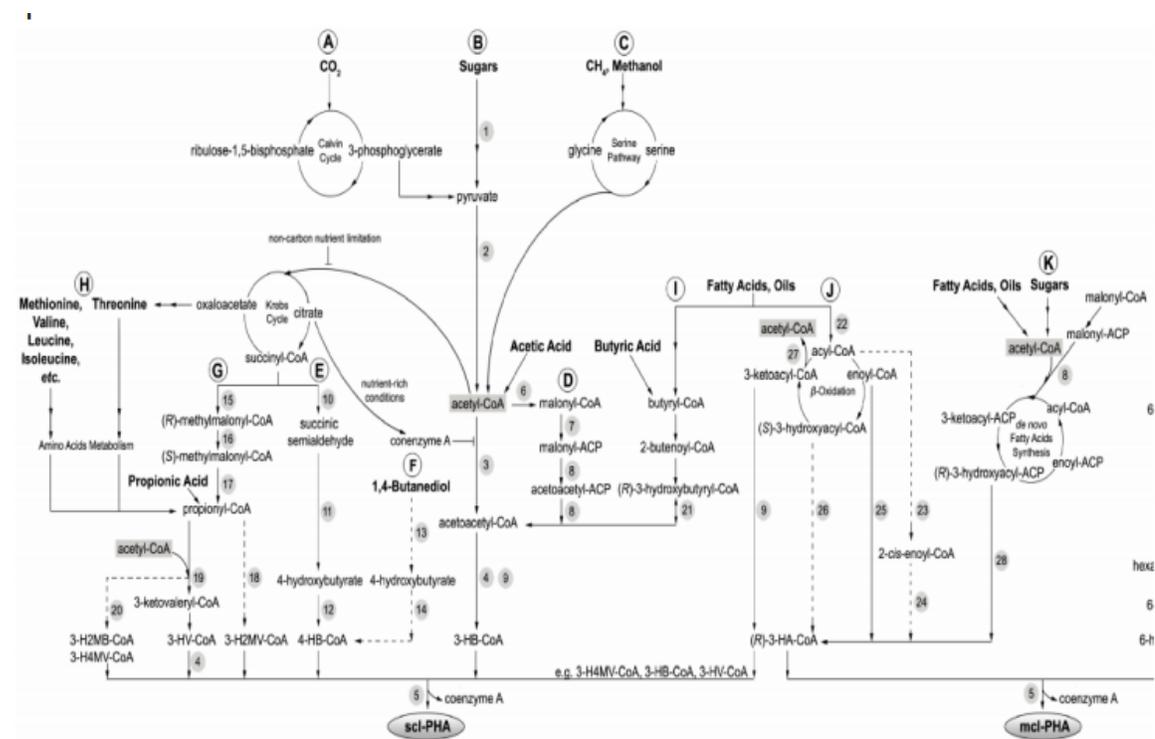
²⁹ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Op cit, p.79-84

Los PHA pueden servir como un fuente de carbono o de energía para los microorganismos durante un período de ayuno³⁰. Steinbüchel y Fuchtenbusch³¹ explican que la enzima clave de la biosíntesis es la PHA sintetasa.

Las fuentes de carbono que son degradadas vía acetoacetyl-CoA o R(-)-3-hidroxiacetyl-CoA agilizan las rutas para la formación de PHAs³²

En la **figura 5** se presentan las vías metabólicas para la síntesis de PHA, en donde las líneas punteadas representan las rutas que conllevan a la formación del polihidroxicanoatos.

Figura 5. Vías metabólicas para la síntesis de PHA.



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

³⁰ PUNRATTANASIN, Warangkana. The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics. Virginia Tech, 2001. p 131

³¹ STEINBÜCHEL, Alexander y FÜCHTENBUSCH, Bernd. Bacterial and other biological systems for polyester production. En: *Trends in Biotechnology*. 1998. vol. 16, no. 10, p. 419-427

³² *Ibíd.* p. 419-427

1.3.2 Producción de PHA. La producción de PHA se puede producir a partir de diferentes tipos de cultivo.

1.3.2.1 Producción de PHA con cultivos puros microbianos. Al emplear cultivos puros se debe establecer condiciones de alimentación (sustratos refinados) y condiciones asépticas adecuadas. Por lo que esto hace que el proceso tenga un alto costo asociado al sustrato como por el alto costo de los equipos y consumo de energía provocando en definitiva que no sea competitivo industrialmente frente al plástico convencional.

Por otro lado, la síntesis de PHA en microorganismos capaces de producir PHA es de aproximadamente 300 especies y sigue creciendo³³. Sin embargo, muchas de las bacterias que han sido identificadas como productoras de PHA tienen una baja tasa de crecimiento y una temperatura de crecimiento óptimo relativamente baja, es por esto que se ha usado la ingeniería metabólica para modificar genéticamente algunas bacterias, aprovechando algún beneficio genético que esté ausente en el microorganismo que se vaya a utilizar y así maximizar la productividad, pero debido a la complejidad del proceso, esto puede llegar a afectar los costos de producción.

1.3.2.2. Producción de PHA con cultivos mixtos microbianos. Los cultivos mixtos se han utilizado principalmente para el tratamiento de residuos en el tratamiento biológico en plantas de tratamiento de aguas residuales, en donde a este proceso se le conoce como sistema de lodos activados.

Por lo que, con fines de reducir los costos asociados a materia prima para la producción de PHA, se han utilizado dichos lodos activados que proporciona además un valor agregado al poder obtener un producto de alto valor a partir de desechos³⁴.

Una ventaja al utilizar esta ecotecnología es que se pueden utilizar efluentes líquidos proveniente de procesos acidogénicos de industrias alimenticias como el aceite de oliva, aceite de palma, melazas de caña de azúcar, industria del papel cervecería, y de la industria láctea³⁵, como sustrato, es decir se pueden emplear sustratos económicos en vez de los sustratos convencionales que son refinados.

Al momento de operar biorreactores por medio de cultivos mixtos microbianos se debe tener en cuenta las condiciones establecidas por el sustrato empleado, pH,

³³ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Op cit., p. 79-84

³⁴ PISCO, Ana Rita Saloio. Polyhydroxyalkanoates production by glycogen-accumulating organisms (GAOs) from by-products of the sugar industry. Universidad de Lisboa, 2008. p. 83.

³⁵ MENDOZA CALERO, Rolando. Obtención de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de cultivos mixtos microbianos usando efluentes ricos en ácidos grasos volátiles como sustrato. En: Revista Científica Y Tecnológica UPSE. vol. 2, no. 1, p. 1-145

la temperatura y por sobre todo de las condiciones dinámicas de alimentación de un ciclo de disponibilidad de sustrato (abundancia) y períodos de ausencia de sustrato (ayuno),³⁶ esto se realiza con el fin de no suministrar constantemente el sustrato ya que puede ocurrir una adaptación fisiológica y la tasa de crecimiento será mayor que la de acumulación³⁷.

Se ha observado que la tasa de acumulación de PHA tiene mucho que ver con la memoria colectiva que tienen las bacterias. En los lodos jóvenes tienen tasas menores de acumulación de PHA que aquellos de mayor edad celular bajo condiciones de ayuno y abundancia.

Bajo las condiciones de ayuno y abundancia en períodos consecutivos, parece ser que en la fase de abundancia entre un 66% del sustrato es consumido para almacenamiento y el restante es usado para crecimiento y mantenimiento.

1.4 PRODUCCIÓN DE PHA BAJO EL CONTEXTO DE BIORREFINERÍA

1.4.1 Biorrefinería. La biorrefinería es un proceso sustentable para la transformación de biomasa que genera un portafolio de bioproductos como fabricación de combustibles, productos químicos de valor agregado y energía, permitiendo generar una economía circular en los procesos productivos. La materia prima o biomasa proviene de la agricultura, la silvicultura y corrientes secundarias, permitiendo el desarrollo de una economía basada en el aprovechamiento de desechos orgánicos.³⁸

1.4.2 Tipos de biorrefinería según la biomasa. Las biorrefinerías pueden ser clasificadas, según el tipo de biomasa utilizada, como biorrefinerías de primera, segunda y tercera generación

Las biorrefinerías de primera generación utilizan biomasa de cultivos que son de interés alimenticio o llamados también cultivos energéticos, los cuales generan una problemática de seguridad alimentaria ya que en lugar de producir alimentos se utilizan para producir diferentes bioproductos. Entre los cultivos más usados se encuentra el maíz (producción de etanol), la soja, y diferentes granos³⁹.

³⁶ *Ibíd.* p. 1-145

³⁷ LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. En: *Biotechnology and Bioengineering*. Jan 5, . vol. 49, no. 1, p. 1-14

³⁸ ARCOS HERNÁNDEZ, Mónica Vanessa. *Op cit* p. 138

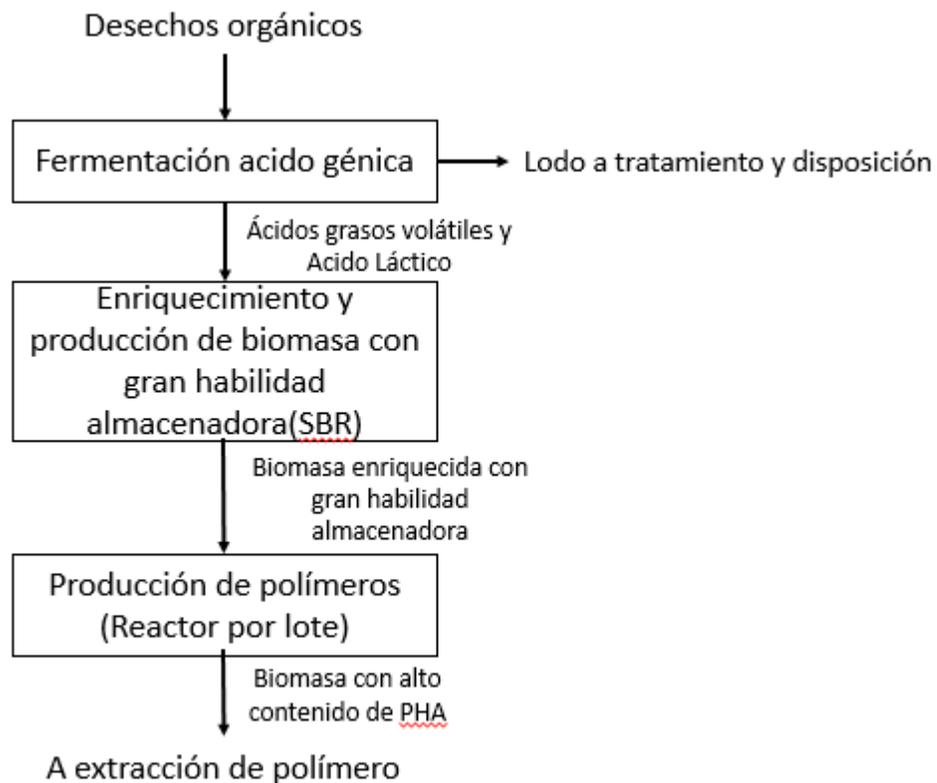
³⁹ ARTURO ROMERO, Salvador. Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. En: *Real Academia De Ciencias Exactas Físicas Y Naturales (España)*. 2010, vol. 104, no. 2, p. 331-345

La biorrefinerías de segunda generación surge como una solución a los cultivos energéticos, ya que se aprovechan los residuos agroindustriales, residuos de biomasa lignocelulósica y residuos contenidos en aguas residuales. Por último, las biorrefinerías de tercera generación consisten en el uso de algas y microalgas como materia prima.

1.4.3 Etapas de producción de PHA bajo el contexto de biorrefinería. Para la producción de PHA por medio de cultivos mixtos provenientes de sistemas de lodos activados se trabaja bajo el contexto de biorrefinería, compuesto por tres etapas fundamentales de proceso, una anaerobia (para la fermentación acidogénica) y dos aerobias (enriquecimiento selectivo de biomasa acumuladora de PHA y producción de PHA).

En la figura 6 se muestra el proceso general para la producción de PHA en cultivos mixtos aprovechando los lodos activados y desechos orgánicos como sustrato.

Figura 6. Esquema experimental planteado para la producción de PHA



FUENTE: ARCOS HERNÁNDEZ, Mónica Vanessa. Degradación De Aguas Residuales Y Producción De Polihidroxialcanoatos Mediante Un Biorreactor Discontinuo. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2007. p. 138

1.4.3.1 Primera etapa: Fermentación acidogénica. Para disminuir los costos asociados a la materia prima, para cultivos mixtos microbianos se utiliza como fuente de carbono, residuos agroindustriales que funcionan como sustratos, pero debido a que los residuos formados de carbohidratos no son un buen sustrato por sí mismos para la producción de PHA, porque éstos son transformados preferentemente en glucógeno, se lleva a cabo la fermentación acidogénica que es la segunda fase de la digestión anaerobia. Se debe inhibir la fase metanogénica para que los AGV producidos no sean consumidos.

En esta etapa es importante conocer la composición de los AGV obtenidos debido a que son alimentados como fuente de carbono en el proceso de acumulación que es donde se sintetiza el PHA que depende de la disponibilidad del tipo de AGV. El acetato es el sustrato más utilizado para la producción de PHA, almacenado preferentemente como homopolímero PHB, y gracias a la optimización de la producción de PHA por cultivos mixtos se ha llegado a producir hasta un 65% de PHB de su contenido seco.⁴⁰ El acetato es la sal del ácido acético (AGV), un ácido orgánico débil cuya distribución entre el ácido libre y la sal depende del pH del medio⁴¹. También se han utilizado mezclas de otros ácidos grasos volátiles (AGV) para obtener copolímeros que formen plásticos de características eficientes. Por ejemplo, mezclas de ácido propiónico y acético se han utilizado para obtener copolímeros de P(3HB-co-3HV).⁴²

1.4.3.2 Segunda etapa: Selección de bacterias acumuladoras de PHA. El proceso de selección de bacterias o microorganismos con capacidad de almacenar PHA se realiza principalmente en un reactor SBR (reactor secuencial por lotes) en condiciones aerobias partiendo de un inóculo con alta concentración de biomasa determinada como sólidos volátiles de un lodo de un sistema de lodos activados de una planta de aguas residuales⁴³ el cultivo mixto microbiano presente se somete a periodos de abundancia y hambruna del sustrato, donde ocurre presión selectiva ya que las bacterias que no acumulan el PHA no pueden utilizarlo como fuente de carbono y energía durante la fase de hambruna.

⁴⁰MENDOZA CALERO Rolando. Op cit, p. 1-145

⁴¹ WANG, Jianping y YU, Jian. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. En: *Process Biochemistry*. 2000, vol. 36, no. 3, p. 201-207

⁴² LEMOS, Paulo C.; SERAFIM, Luísa S. y REIS, Maria A. M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. En: *Journal of Biotechnology*. 2006, vol. 122, no. 2, p. 226-238

⁴³ SERAFIM, Luisa, LEMUS Paulo; OLIVIERA, Rui, y REIS, Maria. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. En: *Biotechnology and Bioengineering*. 2004. vol. 87, no. 2, p. 145-160

Esta fase es importante para la siguiente etapa de acumulación de PHA porque las bacterias o biomasa seleccionadas en esta fase del proceso determinarán la calidad y la cantidad de las bacterias acumuladoras de PHA ⁴⁴ y si no cumplen con estas condiciones pueden generar algún efecto no deseado en el proceso de acumulación y aumentan los costos de la extracción del PHA.

1.4.3.3 Tercera etapa: Acumulación de PHA. En esta etapa, la inoculación al reactor se realiza con las bacterias con capacidad de almacenamiento del PHA aisladas del lodo proveniente de la fase de selección. En esta fase el objetivo es que las bacterias seleccionadas aumenten la capacidad de almacenamiento de PHA utilizando como fuente de carbono los AGV con trazas de azúcares producidos en la fase de fermentación acidogénica que se suministran en periodos de abundancia y racionando la alimentación en pulsos temporalmente espaciados para llevar a la biomasa microbiana a un punto de saturación de acumulación intracelular de PHA. La mayor parte de las investigaciones recientes con cultivos mixtos se basan en este tipo de sistemas ya que han demostrado obtener buenos resultados⁴⁵ con tasas de acumulación mucho mayores que en los sistemas diseñados con etapas alternadas aerobias/anaerobias, logrando un alto contenido de PHA y alta productividad⁴⁶.

Algunos autores presentan que en esta etapa se requiere una limitación de nutrientes mientras que otros muestran que no es necesaria esta limitación.⁴⁷ Para evaluar la eficiencia de esta etapa se compara el contenido celular, la productividad volumétrica y la composición del polímero.

Esta alternativa de producción de PHA bajo el concepto de biorrefinería, es un proceso que se encuentra aún por debajo del contenido alcanzado con cultivos puros ya que bajo diferentes AGV en cultivos mixtos microbianos se obtuvo contenido de PHA en célula seca de 14-41%,⁴⁸ es por esto que las tres etapas están siendo ampliamente estudiadas para optimizar la producción de PHA.

⁴⁴ CUI, Y, ZHANG, Y, LU, P.y PENG, Z. Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. En: Scientific reports. 2017, Vol 6, no. 1, p 30-44.

⁴⁵ DIONISI, Davide; MAJONE Mauro; PAPA, Viviana y BECCARI Mario. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. En: Biotechnology and Bioengineering. Mar 2004, vol. 85, no. 6, p. 569-579

⁴⁶ REIS M; Serafim L; LEMOS P; RAMOS A, AGUIAR F and VAN LOOSDRECHT, M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. En: Bioprocess and Biosystems Engineering. 2003l. vol. 25, no. 6, p. 377-385

⁴⁷ DIONISI, Davide; CARUCCI, G., PAPINI, M. P., RICCARDI, C., MAJONE, M., y CARRASCO F. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. Water research, 2005, vol. 39, no 10, p. 2076-2084.

⁴⁸ LEMOS, Paulo C.; SERAFIM, Luísa S. y REIS ,Maria A. M. Op cit, p. 226-238

1.5 SUSTRATOS EMPLEADOS EN LA PRODUCCIÓN DE PHAS

Los sustratos que se usan para la acumulación de PHA van desde carbohidratos, lípidos y proteínas, hasta compuestos aromáticos y residuos agroindustriales, acumulando desde 1 hasta 90 % de polímero en relación al peso de su biomasa en base seca.

Existen diversos sustratos que, por su naturaleza de desechos, podrían actuar favorablemente en los costos de producción de los biopolímeros. Entre los sustratos económicos más usados se encuentran: la melaza, residuos de la industria del arroz y los lactosueros. Otras fuentes de carbono frecuentes son los ácidos grasos volátiles (acético, butírico y propiónico), obtenidos de la degradación de algunos desechos orgánicos lipídicos, pero que deben utilizarse en bajas concentraciones, debido a que pueden generar toxicidad celular⁴⁹

En Colombia la agroindustria es el sector más importante de la industria manufacturera, generando gran cantidad de residuos orgánicos, por lo que la producción de PHA a nivel nacional se podría ver favorecida al tener disponibles sustratos económicos que permitan bajar los costos asociados a la materia prima. A continuación, se presentan algunas características de los sustratos que se utilizan para la acumulación de PHA.

1.5.1 Melaza. Es un subproducto o residuo de la cristalización final del azúcar del cual no se puede obtener más azúcar por métodos físicos, en los ingenios se considera como un producto sobrante el cual cuenta con muy pocos usos. Sin embargo, la melaza puede aprovecharse como materia prima para la producción de biomasa microbiana y para la obtención de diversos productos biotecnológicos, presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivo comerciales⁵⁰.

Mediante ensayos adecuados de diluciones de la melaza se ha demostrado que, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio para microorganismos (levaduras hongos y bacterias) mesófilos y termófilos.

La composición y otras características de la melaza se muestran en la tabla 2, estas propiedades pueden variar según la variedad de caña de azúcar, suelo, clima,

⁴⁹ VALERO-VALDIVIESO, Manuel Fernando; ORTEGÓN, Yamileth y USCATEGUI, Yomaira. Op cit, p. 171-180

⁵⁰FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Evaluación De Melaza De Caña Como Sustrato Para La Producción De Saccharomyces Cerevisiae. Pontificia Universidad Javeriana, 2007a. p. 120

periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la producción de la fábrica, entre otros.

Tabla 2. Composición y características de la melaza de caña de azúcar

COMPONENTE	CONSTITUYENTE	CONTENIDO (P/P)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63%
	Azúcares reductores (glucosa y fructosa).	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8%p/p
	Agua	16&
	Grasas	0.40%
Contenido de minerales	Cenizas	9%
	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm
Grados Brix o sólidos disueltos		68-75%
pH		5-6.1

Fuente: FAJARDO CASTILLO,Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO,Sandra Constanza. Evaluación De Melaza De Caña Como Sustrato Para La Producción De Saccharomyces Cerevisiae. Pontificia Universidad Javeriana, 2007. p. 120.

1.6 MECANISMOS METABÓLICOS DE PRODUCCIÓN DE PHA

La respuesta de los cultivos bacterianos ante la presencia de condiciones dinámicas en el medio es variada, en particular se encuentra el crecimiento y el almacenamiento.

1.6.1 Crecimiento. Los microorganismos adaptan sus características fisiológicas al medio de cultivo (tipo de sustrato, pH, temperatura, etc.) y se llega a una adaptación final cuando las bacterias son capaces de crecer en el medio que alcanza condiciones de estado relativamente estable (crecimiento balanceado)⁵¹. Existen principalmente cinco mecanismos para la adaptación fisiológica al medio; enriquecimiento selectivo, regulación enzimática, intercambio de información genética, cambio genético hereditario y alteración del medio ambiente.

En el enriquecimiento selectivo, los microorganismos capaces de adaptarse al estrés crecen selectivamente sobre otros, lo cual produce una mayor proporción de la biomasa total de estos microorganismos ya adaptados al medio. Es este mecanismo la base de la mayor parte de los experimentos de producción de PHA bacteriano.

1.6.2 Almacenamiento como incrustaciones intracelulares. Como un mecanismo alternativo y/o adicional, la presencia de condiciones dinámicas (sustrato, tiempo de retención celular, pH, aireación, etcétera) en el medio puede ocasionar como respuesta el almacenamiento intracelular de compuestos, principalmente polisacáridos y lípidos (glucógeno y polihidroxialcanoatos). Esta respuesta puede ocurrir incluso bajo condiciones sin limitación de algún nutriente esencial para el crecimiento celular.

Debido a que la síntesis de los polímeros almacenados es más simple que la de nuevo material celular, se requiere menos tiempo de adaptación fisiológica al medio, por lo que la respuesta como almacenamiento se puede considerar más rápida que la de crecimiento celular⁵². Es este tipo de respuesta la que se ha tomado en cuenta para el diseño de sistemas para producción de PHA con lodos activados.

1.7 DETECCIÓN DE PHA

Diversas técnicas se han utilizado para la detección de los gránulos de PHA acumulados intracelularmente por las bacterias, pero los colorantes lipofílicos Negro Sudan, Azul de Nilo A y Rojo de Nilo (produce una fuerte fluorescencia naranja) son los que más se emplean debido a que son métodos sencillos y rápidos de realizar para la identificación de PHA.

1.8 APLICACIONES DE LOS PHAs

Los PHA tienen diversas aplicaciones en industrias como la: farmacéutica, biomedicina, de alimentos, embalaje, entre otras. Al ser materiales biocompatibles

⁵¹ MAJONE M; DIRCKS K y BEUN J J. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. En: Water Science and Technology.1999. vol. 39, no. 1, p. 61

⁵² *Ibíd.* p. 61

se pueden procesar para convertirlos en materiales de implantes médicos. Los PHA también se emplean como recubrimientos en la fabricación de drogas de liberación controlada de fármacos. También se pueden encontrar en empaques (envolturas de elementos de aseo y alimentos, en general envases de plásticos desechables o de larga duración), en productos de higiene y en biocombustibles.⁵³

1.9 BIODEGRADABILIDAD DE LOS PHAS

Los PHAs son sustitutos atractivos de los poliésteres de origen petroquímico, dado que en la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradarlos hasta CO₂ y agua, en condiciones aerobias, y hasta metano, en condiciones anaerobias, por acción de las enzimas PHA despolimerasas y PHA hidrolasas⁵⁴.

La principal ventaja de los polihidroxicanoatos es su biodegradabilidad y esto lo logran ya que los gránulos son hidrolizados por microorganismos que buscan en ellos fuentes de carbono y energía; lo hacen por medio de despolimerasas que son secretadas de las células y se adhieren a la superficie del polímero convirtiéndola en unidades de monómeros independientes.

El tiempo que demora la degradación depende de la naturaleza propia del polímero así como también las condiciones ambientales a las que sean expuestos, se ha observado degradación de los PHAs en gran cantidad de ambientes incluyendo aerobios, anaerobios, salinos, marinos y otros⁵⁵.

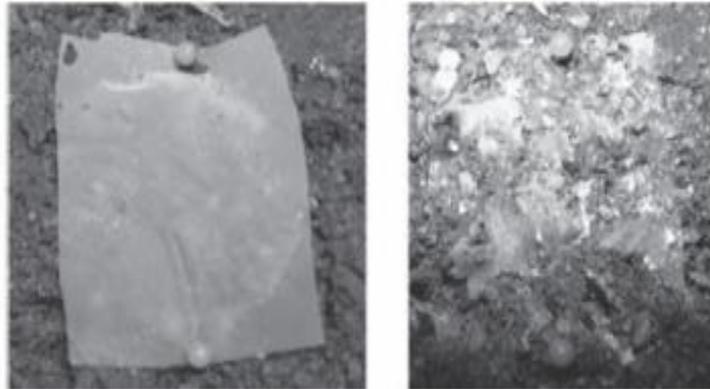
En la **figura 7** se puede observar la degradación completa de una bolsa compuesta por PHA en menos de 50 días bajo condiciones tropicales.

⁵³ SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Op cit, p. 79-84

⁵⁴ VALERO-VALDIVIESO, Manuel Fernando; Op cit, p. 171-180

⁵⁵ SERRANO RIAÑO, Op cit., p. 79-84

Figura 7. Degradación completa de PHA en menos de 50 días bajo condiciones tropicales



Fuente: SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: Teoría Y Praxis Investigativa. vol. 5, no. 2, p. 79-84

1.10 CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento es el aumento ordenado en la suma de todos los componentes de un microorganismo. La multiplicación celular se lleva a cabo por fisión binaria y es consecuencia del desarrollo; en los organismos unicelulares, el desarrollo provoca incremento en el número de individuos que constituyen una población o cultivo.

Las concentraciones microbianas se miden en términos de concentración celular (número de células viables por volumen unitario de cultivo), a el intervalo de tiempo para la duplicación del número de células se denomina tiempo de generación; o concentración de biomasa (peso seco de las células por volumen unitario de cultivo), en cuyo caso a el tiempo necesario para la duplicación de la masa celular se denomina tiempo de duplicación. Estos dos parámetros no siempre son equivalentes, puesto que el peso seco celular promedio varía durante las distintas etapas de un cultivo, sin embargo, estas dos expresiones del crecimiento pueden considerarse equivalentes cuando los componentes aumentan a una misma proporción por unidad de tiempo (crecimiento balanceado o equivalente- fase exponencial) en el que hay un incremento de masa celular debido a la síntesis de la totalidad de sus componentes (azúcares, lípidos, etc.). Esto conlleva a la proliferación o división celular. Tampoco tienen la misma importancia: en los estudios sobre genética microbiana o desactivación celular, la concentración celular es la cantidad significativa; en los estudios sobre bioquímica o nutrición microbiana, la cantidad importante es la concentración de la biomasa.⁵⁶

⁵⁶BROOKS Geo F; CARROLL, Karen C; BUTEL, Janet S; MORSE, Stephen A y MIETZNER, Timothy A. "Jawetz" Microbiología Médica. 25 ed. ES: McGraw-Hill Interamericana - M.U.A, 2015. p. 83

1.10.1.1 Concentración celular. La concentración de células viables se considera por lo general la medida de la concentración celular; Cuando se utiliza la medida de turbidez es importante recordar que la correlación entre turbidez y cuenta viable varía durante el desarrollo y muerte de un cultivo; las células pierden viabilidad sin que el cultivo pierda turbidez, es por esto que se debe desarrollar una curva de calibración que relacione la turbidez con las unidades formadoras de colonia por volumen unitario del medio de cultivo.

1.10.1.2 Densidad de la biomasa. La biomasa se mide directamente al determinar el peso seco de un cultivo microbiano, se puede determinar como SST o SSV. Se realiza frecuentemente una curva patrón que correlaciona al peso seco con la turbidez. Estas dos medidas son directamente proporcionales en soluciones diluidas, ambas son una medida para determinar el número total de microorganismos, y son independientes del tamaño celular de los microorganismos.

1.10.2 Métodos para medir el crecimiento microbiano. En la tabla 3 se presentan las técnicas para medir el crecimiento microbiano de acuerdo a si son métodos directos (miden directamente las células o masa microbianas) o métodos indirectos (relacionan algún parámetro del cultivo que permite deducir el crecimiento microbiano); también se tiene en cuenta si mediante la técnica se hace una medición del número de células o masa celular. La elección del método de medición del cultivo depende de sus características y del proceso, como también de la sensibilidad requerida, confianza del método y velocidad necesaria.

Tabla 3. Métodos para medir el crecimiento microbiano

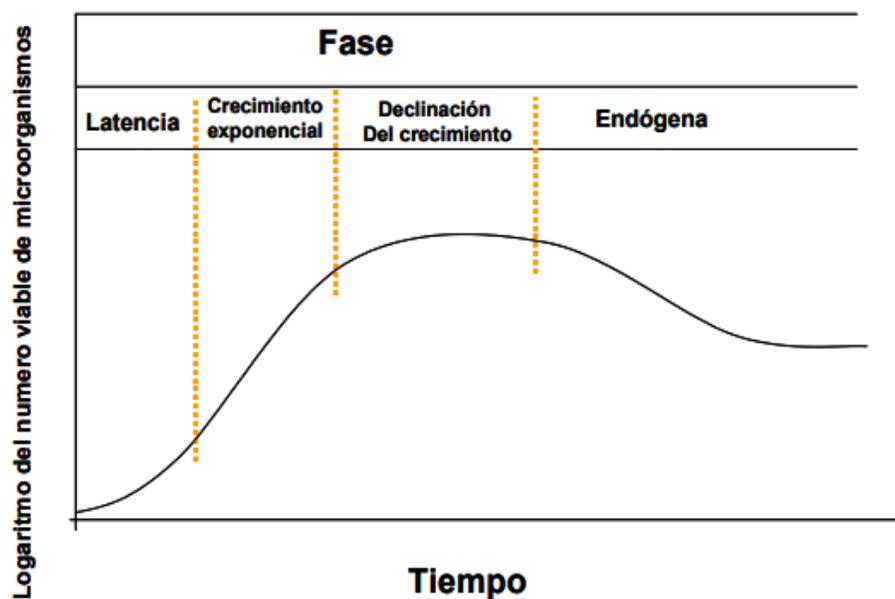
Determinación del Número de células	Vivas y Muertas	Recuento en cámara
		Recuento indirecto en portaobjetos
		Contador automático de partículas
		Nefelometría
Determinación de la masa celular	Vivas	Recuento en medio sólido
		Filtración sobre membrana
Determinación de la masa celular	Directos	Determinación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

Fuente: BROOKS Geo F; CARROLL, Karen C; BUTEL, Janet S; MORSE, Stephen A y MIETZNER, Timothy A. "Jawetz" Microbiología Médica. 25 ed. ES: McGraw-Hill Interamericana - M.U.A, 2015. p. 83

El crecimiento exponencial, es por lo general, balanceado de modo que se puede utilizar la medición de cualquier propiedad de la biomasa. Una de ellas es la determinación de la masa celular y el método más empleado es la turbidimetría, un método óptico que consiste en la determinación de la cantidad de luz absorbida por una suspensión de células;⁵⁷ la medición de turbidez se usa para estimar los indicadores de crecimiento de bacterias como una alternativa a los recuentos de las placas tradicionales⁵⁸.

1.10.3 Crecimiento en términos de masa bacteriana. El patrón de crecimiento, en términos de masa de microorganismos se presenta en la figura 8 y puede describirse así⁵⁹:

Figura 8. Curva característica de crecimiento bacteriano en términos del registro de la masa de los organismos



Fuente: MOELLER Gabriela y TOMASINI ORTIZ Ana Cecilia. Microbiología De Lodos Activados. IDEAM, 2004. p. 148-208

⁵⁷ SANZ CERVERA, Susana. Técnicas De Microbiología. 2a edición ed. Universidad Rioja: 2011. p. 102

⁵⁸GONZALES ACEBO, Dayana y HERNÁNDEZ GARCÍA, Armando. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. En: Modelamiento Matemático Y Optimización Del Proceso De Producción De Polihidroxialcanoatos. 2013. vol. 44, no. 1, p 1-14.

⁵⁹ MOELLER Gabriela y TOMASINI ORTIZ Ana Cecilia. Microbiología De Lodos Activados. IDEAM, 2004. p. 148-208

1.10.3.1 Fase de latencia. En esta fase las bacterias necesitan de un tiempo para adaptarse al ambiente nutricional, pero en comparación a la fase de latencia del número de células viables, la fase en términos de masa bacteriana no es tan larga debido a que la masa empieza a incrementarse después de que tiene lugar la división celular.

1.10.3.2 Fase de crecimiento exponencial. Existe siempre un exceso en la cantidad de alimento que rodea a los microorganismos, y la velocidad del metabolismo y crecimiento es sólo una función de la habilidad del microorganismo para procesar el sustrato.

1.10.3.3 Fase de declinación del crecimiento. La velocidad de incremento de la masa bacteriana disminuye debido a la limitación en el suministro de alimento.

1.10.3.4 Fase endógena. Los microorganismos son forzados a metabolizar las reservas de energía que acumulan intracelularmente sin que haya reemplazo, debido al agotamiento de la concentración del sustrato. Durante esta fase puede ocurrir el fenómeno conocido como lisis, en el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden hacia el exterior para suministrar alimento a las células vivas restantes.⁶⁰

1.11 CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

La cinética, de un proceso biológico o químico se encarga de estudiar la velocidad de reacción de un proceso, según el mecanismo de reacción; pero para un proceso bioquímico, describir la cinética durante una transformación microbiana es complejo por los parámetros que intervienen en ella, es por ello que se han propuesto diversos modelos cinéticos con el fin de representar parte de la realidad del proceso y de esta manera predecir en un cultivo microbiano, la cantidad de sustrato o compuesto químico remanente después de cierto tiempo, calcular el tiempo requerido para alcanzar cierta concentración de compuesto de interés, como también reducir costos en diseño experimental y de proceso, considerar o no variables que puedan o no afectar el desarrollo experimental y utilizar el modelamiento matemático para escalar procesos realizados a nivel de banco o laboratorio entre otros. La evaluación de la cinética en el crecimiento bacteriano constituye un aspecto importante para la operación, simulación, diseño y predicción del comportamiento de reactores biológicos⁶¹

En general, un modelo matemático de crecimiento está compuesto por 3 partes: la primera corresponde a los principios químicos, físicos y biológicos involucrados en el proceso en cuestión, la segunda son las inferencias que se puedan hacer a partir de los datos existentes previamente y la tercera corresponde a las suposiciones que

⁶⁰ ⁶⁰ MOELLER Gabriela y TOMASINI ORTIZ Ana Cecilia, Op Cit. p. 148-208

⁶¹ DUARTE TORRES, Alberto. Op cit, p. 123-148

se deban hacer, con bases y criterios válidos, necesarias debido a la complejidad de los procesos microbiológicos⁶².

A continuación, se muestra la clasificación de los modelos cinéticos y las consideraciones que se realizan.

1.11.1 Modelos Estructurados: consideran las rutas metabólicas intracelulares, consideran los componentes básicos de la célula y su especie química en cuestión, despreciando o agrupando los demás componentes en grupos generalizados que pueden llamarse lípidos, proteínas, etc.

1.11.2 Modelos no estructurados: Son modelos que brindan una aproximación del comportamiento microbiano considerando el sistema sin una complejidad abrumadora, por lo que su aplicación es recomendable para etapas iniciales de una investigación donde se desee indagar el modelamiento de los procesos realizados por microorganismos. A continuación, se nombran algunas de las suposiciones:

- Se debe considerar a la población de microorganismos como un conjunto homogéneo.
- La masa de la población celular está distribuida uniformemente en el cultivo asumiendo que es un cultivo homogéneo, expresada como masa de células secas por unidad de volumen.
- No se presenta muerte celular
- No se presenta fase de adaptación.

Además de los modelos anteriormente mencionados, existen también los modelos segregados y no segregados; en donde los modelos segregados consideran a la población heterogénea distinguiendo entre tamaño, edad y composición interna variable, mientras que los modelos no segregados consideran a la población como una célula promedio de un único componente, distribuido uniformemente.⁶³

Para modelar la cinética microbiana se tienen en cuenta los siguientes parámetros, usados posteriormente para el diseño y estudio de biorreactores, consumo de sustrato, producción de metabolito y formación de biomasa. En esta última está centrado el presente trabajo, el cual es representado mediante modelos matemáticos no estructurados, no segregados que permiten describir y reproducir su comportamiento.

⁶² CORDÓN PÁEZ, Santiago y PÉREZ MARTÍNEZ, Jorge Alejandro. Ajuste De Un Modelo Matemático Para El Crecimiento De *Streptococcus Pyogenes* En 2 Sustratos Para La Producción De Ácido Hialurónico a Escala De Laboratorio. FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, 2016. p. 129

⁶³ CALDERÓN VARGAS, Juan Fernando. Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Fundación Universidad América, 2017. p. 78

1.11.3 Modelos de crecimiento microbiano.

Los modelos cinéticos no estructurados son sencillos y brindan una aproximación del comportamiento microbiano, considerando el sistema sin complejidad, asumiendo una distribución uniforme en el cultivo, es decir, consideran el cultivo homogéneo, por lo que generalmente usan el término población microbiana o biomasa, expresada como masa de células secas por unidad de volumen.

Los modelos no estructurados se pueden dividir en tres grupos, los modelos de crecimiento, los modelos de consumo de sustrato y modelos de formación de producto, basados en el modelo de Monod⁶⁴.

A continuación se muestran modelos no estructurados de crecimiento microbiano que tienen en cuenta el crecimiento del microorganismo con la concentración de la biomasa y otros factores como el sustrato limitante, que hace depender el crecimiento de la concentración de la biomasa con la concentración de un sustrato⁶⁵.

1.11.3.1 Modelo de crecimiento exponencial. Denominado también ley de Malthus, es el modelo más sencillo, empleado cuando el crecimiento es equilibrado, en donde la masa celular media no se ve afectada por la proliferación de la población; este tipo de comportamiento se puede presentar en la fase de crecimiento exponencial, por lo que, para fases como la declinación en el crecimiento, es incapaz de predecir la concentración de la biomasa. El modelo de crecimiento exponencial está representado por la Ecuación 1, donde μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}) y X es la concentración de biomasa que se puede obtener en un cultivo correspondiente.

Ecuación 1. Concentración de biomasa en función del tiempo

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Resolviendo la **Ecuación 1** en torno a los límites de $t = 0$ con $X = X_0$ (concentración de biomasa inicial), se obtiene la Ecuación 3 que describe la fase exponencial, en función del tiempo.

⁶⁴ ALCON MARTIN, Almudena. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprosesos: aplicación a la producción de Xantano . Universidad complutense de Madrid, 1999. p. 471.

⁶⁵ Ibid., p 471

$$\frac{dX}{X} = \mu dt$$

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_0^t \mu dt$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu t$$

$$\frac{X}{X_0} = e^{\mu t}$$

Obteniendo la **Ecuación 2**, la cual representa la concentración de la biomasa en función del tiempo.

Ecuación 2. Concentración de la biomasa en función del tiempo.

$$X = (X_0 e^{\mu t})$$

1.11.3.2 Ecuación logística. Esta ecuación permite describir distintos procesos fermentativos de la biomasa, teniendo en cuenta la fracción de carga que involucra la concentración de biomasa con la concentración máxima producida. En la Ecuación 3 se representa la ecuación logística.

Ecuación 3. Ecuación logística para crecimiento microbiano

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

Donde X_m es la concentración máxima de biomasa, μ la tasa de crecimiento específica y X la concentración de biomasa.

Al integrar la **Ecuación 3** en las condiciones de frontera $X=X_0$ y $t=t_0=0$, se obtiene la **Ecuación 4**, correspondiente al crecimiento de biomasa en función del tiempo.

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X(1 - \frac{X}{X_m})} = \int_0^t \mu dt$$

$$\ln\left(\frac{X}{1 - \frac{X}{X_m}}\right)_{X_0}^X = \mu t$$

$$\ln\left(\frac{\frac{X}{1 - \frac{X}{X_m}}}{\frac{X_0}{1 - \frac{X_0}{X_m}}}\right) = \mu t$$

$$\frac{X(1 - \frac{X_0}{X_m})}{X_0(1 - \frac{X}{X_m})} = e^{\mu t}$$

$$\frac{X(X_m - X_0)}{X_0(X_m - X)} = e^{\mu t}$$

$$X(X_m - X_0) = X_0 e^{\mu t} (X_m - X)$$

$$X(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}) = X_0 X_m e^{\mu t}$$

Ecuación 4. Concentración de la biomasa en función del tiempo.

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{(X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t})}$$

1.11.4 Modelo de Monod. Modelo desarrollado en 1942, en el que se describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante la fermentación⁶⁶. El modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y asumiendo la población microbiana como homogénea. El modelo se describe mediante las ecuaciones 5 y 6.

Ecuación 5. Ecuación de Monod para el crecimiento de biomasa

$$\frac{dX}{dt} = X \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

⁶⁶ DUARTE TORRES, Alberto. Op cit. p. 123-148

Ecuación 6. Ecuación de Monod para el consumo de sustrato

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt}$$

El modelo de Monod, generalmente se caracteriza por alcanzar un grado de ajuste cercano a los datos experimentales.

1.11.4.1 Eadie Hofstee. El método diferencial de análisis es la evaluación de las velocidades de crecimiento de biomasa y de consumo de sustrato a partir de un conjunto de datos experimentales de las concentraciones de biomasa y de sustrato en función del tiempo en un cultivo por lotes.⁶⁷

Ecuación 7. Ecuación de Eadie Hofstee

$$\mu = \mu_M \frac{\mu}{K_s}$$

La representación de la gráfica de μ versus μ/s en el caso de los microorganismos que se comportan de acuerdo con el modelo de Monod, correspondiente a una línea recta, cuyo intercepto es μ_M y cuya pendiente es $-K_s$.

La principal limitación del método diferencial de análisis en la determinación de parámetros cinéticos es la dificultad para la realización de ensayos con un reactor continuo (CSTR)

⁶⁷ DUARTE TORRES, Alberto, Op cit. p. 123-148

2. MATERIALES Y EQUIPOS

En este capítulo se detallan herramientas físicas como son equipos, reactivos, materias primas, etc. También se explican los métodos realizados para cumplir con los objetivos del proyecto.

2.1 LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

La experimentación se llevó a cabo en la Universidad Antonio Nariño en el laboratorio del grupo de investigación GRESIA, el cual tiene una línea de investigación en ingeniería de bioprocesos basada en la valorización de residuos y biomasa de segunda generación en bioproductos de valor agregado bajo el contexto de biorrefinería. Dentro de sus investigaciones está la producción de PHA, sobre el que trabaja este Proyecto de Grado.

Los materiales, materias primas y equipos para la ejecución del proyecto de investigación fueron suministrados por el laboratorio del grupo de investigación GRESIA.

2.2 SUSTRATOS

A continuación, se describen las materias primas empleadas en el proyecto, los microorganismos con los cuales se trabajó y los medios de cultivo usados.

2.2.1 Microorganismos. Se utilizaron 13 cepas axénicas aisladas previamente de un sistema de lodos activados provenientes de la segunda etapa del proceso de producción de PHA bajo el contexto de biorrefinería correspondiente al enriquecimiento selectivo de B-PHA, con el que trabaja el grupo de investigación GRESIA. El inóculo utilizado en dicha etapa fue un lodo de un tanque de aireación de una planta de tratamiento de agua residual de lodos activados de la industria alimenticia⁶⁸, sometidos a periodos de abundancia y de ayuno del sustrato, en donde por presión selectiva se obtiene un lodo enriquecido únicamente con bacterias que acumularon el PHA como fuente de carbono y energía.

En un estudio previo realizado por el laboratorio, se conocía la clasificación de las bacterias en la estructura de la pared celular como Bacilos Gram positivos en su mayoría, a excepción de las cepas 3, 4 y 6⁶⁹; además se detectó la posible capacidad para acumular PHAs a nivel intracelular por medio de las técnicas de detección de tinción con Rojo de Nilo y Negro de Sudán. Las bacterias crecen a una temperatura de 35°C en un tiempo de incubación entre las 24 a 72 horas.

Los microorganismos se encontraban conservados a -4°C en medio de cultivo agar nutritivo con glucosa.

⁶⁸ ACOSTA Edith; FONSECA, Andrea; JIMÉNEZ, Santiago; SÁNCHEZ, Astrid; LUNA, Héctor y LEÓN, Iván. Identificación De Bacterias Acumuladoras De Polihidroxialcanoatos Con Técnicas De Tinción Convencionales. Universidad el bosque: 2018, p 45.

⁶⁹ *Ibíd.*, p 45

2.2.2 Medios de cultivo. El medio de cultivo utilizado en este proyecto es glucosa y caldo nutritivo de origen comercial (anexo A), empleado para la construcción de las curvas de crecimiento de cada una de las cepas bacterianas ajustando el pH a 5.

El sustrato seleccionado para cultivar los microorganismos del cultivo mixto conformado, es un medio sintético en diferentes concentraciones, 10%, 15% y 20% de ácido acético en solución melaza. Dichos valores se obtuvieron a la salida de tres reactores acidogénicos respectivamente, el cual por medio de un proceso fermentativo de la melaza genera una corriente de ácidos grasos volátiles con azúcares no fermentados de la melaza. Estos porcentajes fueron reportados por el autor Mora⁷⁰; quien trabajó en la primera etapa de la producción de PHA bajo el concepto de biorrefinería en el grupo de investigación GRESIA de la Universidad Antonio Nariño, por lo cual se quiere utilizar estos porcentajes hallados experimentalmente.

A continuación, se detalla los componentes de este medio sintético.

2.2.1.1 Ácido acético. Se usó acetato de sodio y posteriormente se ajustó el medio con HCl 0.1N. Se seleccionó este ácido graso volátil, ya que, este se genera en mayor porcentaje de DQO en AGVS a la salida de los reactores acidogénicos en los proyectos desarrollados por el grupo de investigación GRESIA⁷¹. Además, el acetato es uno de los sustratos más reportados en literatura que permiten la acumulación de gránulos de PHA con una producción mayor al 65% en peso seco⁷². En cultivos microbianos mixtos aeróbicos alimentados con acetato, el autor Johnson obtuvo un 89% de acumulación de PHA, un resultado comparable a los valores reportados por cultivos puros⁷³.

⁷⁰ MORA, Carlos Eduardo. Op cit., p. 55

⁷¹ *Ibíd.*, p.55

⁷² CORTES DE LUNA Omar. Producción De Polihidroxibutirato (PHB) Con Cultivo Mixto Fotoheterotrófico. Instituto Politecnico Nacional, 2016. p. 63

⁷³ FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A. y REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. En: Journal of Biotechnology. Sep 2014,. vol. 185, p. 19-27

2.2.1.2 Melaza de caña de azúcar. Es el residuo de la cristalización del azúcar, se empleó como sustrato para el cultivo mixto conformado. Esta materia prima fue suministrada por la Universidad Antonio Nariño, quienes emplean este compuesto para la alimentación de otros reactores de la biorrefinería. En la sección 1.5.1. En la tabla 2 se presenta la composición y algunas características que comúnmente se presentan en las melazas (sin embargo, en otra investigación se debe realizar una caracterización de la composición de la melaza para corroborar los componentes encontrados en literatura). Mediante la fermentación de melaza se ha obtenido una acumulación de PHA del 75%⁷⁴ en peso seco.

2.3 EQUIPOS

Para la ejecución del proyecto se requirió el uso de diferentes instrumentos para cumplir con cada una de las etapas de la investigación, en la **tabla 4** se observan especificaciones y se realiza una breve descripción de los equipos utilizados a lo largo del proyecto.

Tabla 4. Equipos utilizados

Nombre del equipo	Características	Función	Imagen
Autoclave	Sistema cerrado donde se forma vapor de agua emplea una temperatura de 121°C y 15lb de presión, lo que conlleva a la muerte de los microorganismos y la destrucción de las esporas. Marca: All American Modelo: 50X-120	Se utilizó para esterilizar el material y los medios de cultivo para el proceso.	 Fuente: elaboración propia

⁷⁴ RAMOS, Fernando Daniel. Producción de PHA estudios experimentales y diseño óptimo de biorrefinerías. Universidad Nacional del Sur, 2019. p. 355.

Tabla 4. (Continuación)

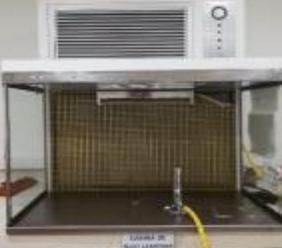
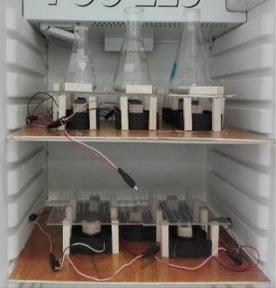
Nombre del equipo	Características	Función	Imagen
Balanza analítica	Se utiliza principalmente para medir pequeñas masas, precisión de lectura de 0,1 µg a 0,1 mg. Marca: BOECO Germany Modelo: BBL52	Empleado para medir el peso de los reactivos y cuantificación del peso seco de la biomasa.	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
Cabina de bioseguridad: cabina de flujo laminar	Permite mantener libre de polvo e impurezas el espacio interior del área de trabajo. Marca: Purificación u Análisis de Fluidos LTD	Empleado para manipular los microorganismos medios de cultivo en condiciones de asepsia.	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
Espectrofotómetro	Instrumento usado en el análisis químico que mide la absorbancia de una muestra en los espectros de luz ultravioleta y visible. Marca: Genesys 20. Modelo: Thermo	Empleado para monitorear el crecimiento microbiano evidenciado por medio de la turbidez y para la prueba de DQO.	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
Horno	Cámara o cavidad donde se utiliza una temperatura mayor al ambiente con el fin de retirar la humedad de un producto. Marca: HUMBOLDT Modelo: H-30145E	Utilizado para eliminar la humedad y cuantificar el peso seco de la biomasa.	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>

Tabla 4. (Continuación)

Nombre del equipo	Características	Función	Imagen
Incubadora de laboratorio	<p>Tiene como función generar las condiciones adecuadas de temperatura y humedad para el crecimiento microbiano.</p> <p>Marca: Memmert. Modelo: 100-800</p>	<p>Empleado para cultivar los medios de cultivo (sólidos) a las condiciones de temperatura y humedad requeridos.</p>	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
Microscopio	<p>Instrumento óptico de gran importancia para la observación e identificación de los microorganismos.</p> <p>Marca: Leica Modelo MD500</p>	<p>Utilizado para observar la morfología microscópica de los microorganismos su clasificación según el tipo de pared celular.</p>	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
pH-metro	<p>Instrumento científico que mide la actividad de ion hidrógeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad.</p> <p>Marca: HANNA Modelo HI2210</p>	<p>Se empleó para el ajuste del pH del medio de cultivo.</p>	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>
Reactor DQO	<p>Reactor de digestión, puede ser utilizado para análisis de metales, digestiones para análisis de nutrientes, o muestras biológicas.</p> <p>Marca HANNA Modelo HI839800</p>	<p>Utilizado para completar la reacción de oxidación en la medición de DQO.</p>	 <p><i>Fuente: elaboración propia</i></p>

Tabla 4. (Continuación)

Nombre del equipo	Características	Función	Imagen
Sistema de agitación	Permiten que la composición y la temperatura de la masa reaccionante tiendan a ser iguales en todas las zonas del cultivo, es decir lograr una uniformidad de las propiedades. Elaboración propia (ANEXO B)	Garantizar la homogeneidad de los cultivos, de forma axial, constante y uniforme, adecuada para cultivar medios en Erlenmeyer.	 <p>Fuente: elaboración propia</p>
Sistema de filtración a vacío	Permite filtrar suspensiones en las que la fuerza de gravedad no es suficiente para el proceso o permite acelerar la velocidad de filtración Marca: Thomas Modelo: 1630.	Sistema empleado para la filtración de muestras para la determinación del peso seco de la biomasa y las pruebas de DQO soluble.	 <p>Fuente: elaboración propia</p>

Fuente: elaboración propia

2.4 REACTIVOS

Los reactivos que se muestran en la tabla 5 se emplearon en el proyecto para preparar reactivos y realizar varias técnicas como son la coloración de Gram, el método colorimétrico de DQO.

Tabla 5. Reactivos

REACTIVO	USO
Cristal Violeta de Gram. (ACS)	Se utiliza para la prueba de coloración de Gram como colorante.
Lugol de Gram (ACS)	Se utiliza para fijar el colorante Cristal Violeta en la coloración de Gram.
Alcohol acetona de Gram. (ACS)	Se utiliza para remover el exceso de colorante en la coloración de Gram.
Fucsina de Gram (ACS)	Se utiliza para la prueba de coloración de Gram como colorante de contraste
Solución salina al 0,85% p/v	Se utiliza como solvente para realizar las diluciones para la siembra.

Tabla 5. (Continuación)

REACTIVO	USO
Etanol 70% v/v	Utilizado como bactericida.
Ácido sulfúrico concentrado	Utilizado para preparar los viales de DQO.
Rojo de Nilo	Utilizado como colorante para la detección de bacterias productoras de PHA
Negro de Sudán	Utilizado como colorante para la detección de gránulos de PHA.
Ácido Clorhídrico 0.1N	Utilizado para regular el pH.

Fuente: elaboración propia

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO BACTERIANO

En estudios⁷⁵ previos realizados por el laboratorio se evaluaron cada una de las 13 cepas de interés, aisladas de un sistema de lodos activados provenientes del reactor de la segunda etapa para la producción de PHA correspondiente al enriquecimiento selectivo de B-PHA, en el que se detectó la posible presencia de PHA por medio de las técnicas de tinción en Agar Rojo Nilo y Negro de Sudán B usando exceso de glucosa. Mediante este trabajo⁷⁶ se logró detectar cuales bacterias acumulan PHA.

Para llevar a cabo la selección de las bacterias para conformar el cultivo mixto se monitoreo el crecimiento de las bacterias en un medio comercial no selectivo, empleado en el laboratorio, y se tuvieron en cuenta las cepas que presentaron un crecimiento exponencial alto, evidenciado por la concentración de la biomasa formada, con respecto a las demás cepas, ya que en dicha fase las bacterias tienen la capacidad para crecer constante y rápidamente, tomando la fuente de carbono que se suministre, por lo que se puede evidenciar la habilidad del microorganismo para procesar determinado sustrato, importante al momento de describir la cinética de crecimiento bacteriano.

También se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos previamente en el laboratorio de las cepas que tienen potencial para acumular PHA.⁷⁷

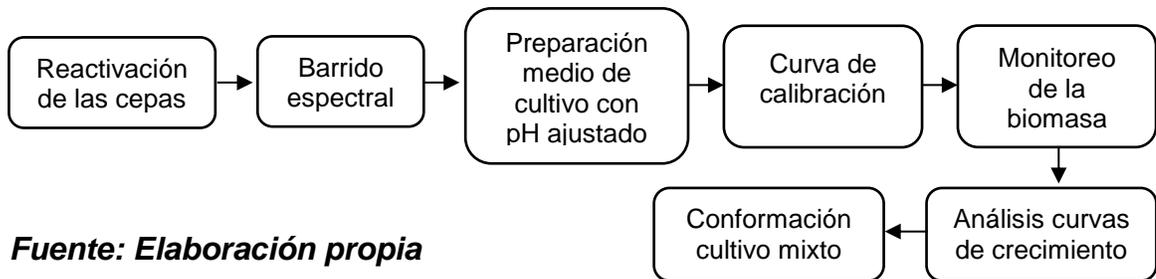
En la **figura 9** se describe la metodología para la selección de las bacterias que conformarán el cultivo mixto bacteriano basado en el crecimiento bacteriano de las cepas.

⁷⁵ ACOSTA Edith; FONSECA, Andrea; JIMÉNEZ, Santiago; SÁNCHEZ, Astrid; LUNA, Héctor y LEÓN, Iván. Op cit, p. 45

⁷⁶Ibíd., p. 45.

⁷⁷ Ibíd., p 45.

Figura 9. Metodología para la selección de las bacterias que conformaran el cultivo mixto bacteriano



Fuente: *Elaboración propia*

3.1.1 Reactivación de las cepas bacterianas. Se reactivaron 13 cepas axénicas que estaban conservadas en un refrigerador a una temperatura de 4°C empleando un medio de cultivo sólido agar nutritivo y glucosa, ya empleado en el laboratorio, compuesto por Glucosa 10 g/L Peptona 2.5 g/L Extracto de levadura 1.0 g/L NaCl 2.5 g/L Extracto de carne 0.5 g/L Agar 15 g/L. pH 7.0 ± 0.1 (ANEXO A) y se incubó a 35°C por 24 a 72 horas; pasado este tiempo se determinaron las características morfológicas macroscópicas y microscópicas; se determinó el tiempo en el que se evidencia crecimiento y se realizó Tinción de Gram, para reconocer e identificar a las bacterias y de esta manera evitar fallos en el proceso.

3.1.1. Tinción de Gram. Es un método económico, sencillo y eficaz que se basa en una tinción diferencial donde se aplican colorantes selectivos en un orden específico para clasificar a las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram Negativas. La composición química y el contenido de peptidoglicano en la pared celular de las bacterias Gram negativas y Gram positivas explica y determina las características tintoriales.

Los colorantes se utilizan con el fin de contrastar las células y así poder observarlas a través de un microscopio con mayor facilidad. Como colorante primario se usa cristal violeta, el cual tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana y se usa safranina, el cual funciona como un colorante secundario o de contratinción y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.⁷⁸.

Para realizar la tinción se necesitan los siguientes reactivos:

- Cristal violeta.
- Lugol.

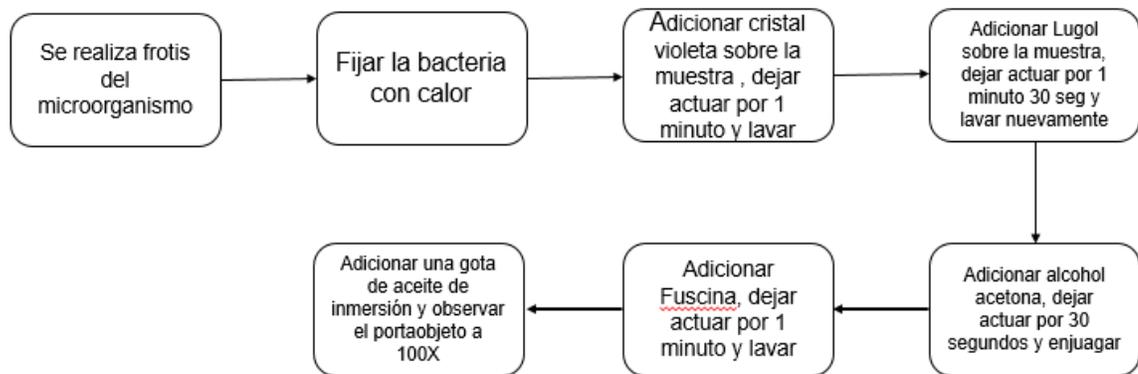
⁷⁸ HERNÁNDEZ DURAN Melissa, COLÍN CASTRO Claudia Adriana, ORTEGA PEÑA Silvestre, CERÓN GONZALES Guillermo y FRANCO CENDEJADAS Rafael. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. En: Medi Graphic. vol. 3, no. 1, p. 10-18

- Alcohol acetona.
- Fucsina.
- Aceite de inmersión

Para realizar la tinción de Gram se inocularon cada una de las cepas en caldo nutritivo y glucosa, cultivadas por 24 horas, cultivo joven, ya que, los cultivos con más tiempo de incubación dan resultados irregulares⁷⁹.

En la figura 10 se observa el procedimiento que se realizó para la coloración de Gram.

Figura 10. Procedimiento coloración de Gram



Fuente: elaboración propia.

Para la coloración de Gram, primero se preparó un frotis bacteriano, con un asa metálica, previamente esterilizada y se fijó en calor la muestra en un portaobjetos. Luego de fijar la muestra, se cubrió con cristal violeta y se dejó actuar al colorante durante 1 minuto, posteriormente a este tiempo se lavó el exceso con agua destilada, se agregó Lugol durante un minuto y medio más, formando un complejo insoluble en agua con el cristal violeta, y se lavó con agua destilada.

Después, se agregó alcohol acetona por medio minuto, para eliminar el complejo formado con los anteriores tintes, en donde se disolvió la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que no retuvieron el complejo formado, por la delgada capa de peptidoglicano, en contraposición de las bacterias Gram positivas que fueron capaces de contener el complejo por su gruesa capa de peptidoglicano; luego se eliminó el exceso de alcohol acetona con agua destilada y se adicionó fucsina por un minuto como colorante contraste para las bacterias Gram negativas.

⁷⁹ SANZ CERVERA, Susana. Op cit. p. 102

Finalmente, se retiró el exceso de colorante contraste, con agua destilada, y se observó en el objetivo de inmersión del microscopio, en donde las bacterias Gram positivas se tiñen de violeta y las Gram negativas de rosa.

3.1.2 Barrido espectral. Se realizó una curva espectral con el fin de establecer la longitud de onda en la cual la biomasa es capaz de absorber energía de una forma considerable dentro del rango visible de 500 nm a 700 nm, ya que los espectros funcionan como huellas dactilares para identificar la sustancia de interés⁸⁰.

Primero se inocularon cada una de las cepas seleccionadas en caldo nutritivo y glucosa por 24 horas y posteriormente, con un espectrofotómetro, se midió la absorbancia a los medios de cultivo, cada 10 nm, desde 500 nm hasta 700 nm. En esta longitud de onda hallada se midió la absorbancia para los medios de cultivo usados en la investigación.

3.1.3 Preparación medio de cultivo con pH ajustado. Se empleó un medio de glucosa y caldo nutritivo compuesto por glucosa 10 g/L, peptona 2.5 g/L, extracto de levadura 1.0 g/L, NaCl 2.5 g/L y extracto de carne 0.5 g/L. (ver ANEXO A) con pH ajustado a 5; esto con el fin de evidenciar el crecimiento de las cepas en un medio comercial no selectivo empleado en el laboratorio y adaptar las cepas al pH al que se encuentra el efluente del reactor acidogénico⁸¹.

3.1.5 Curva de calibración. Con el fin de utilizar el método turbidimétrico para monitorear el crecimiento bacteriano, utilizando la absorbancia como una medida rápida y sencilla de la concentración de la biomasa, se realizó una curva estándar o de calibración para relacionar la densidad óptica con la densidad de la biomasa. La biomasa seca se determinó como SST (sólidos suspendidos totales) por el método gravimétrico, reportado por el IDEAM⁸², el cual se muestra en el **ANEXO D**. Se midió directamente al determinar el peso seco de un cultivo microbiano, determinado como SST o SSV en el medio⁸³. Para determinar los sólidos suspendidos totales se usa la Ecuación 8.

⁸⁰ DUYMOVICH, Claudio, et al. Espectrofotómetros y Fotocolorímetros: Guía práctica de actualización. En: ACTA BIOQUÍMICA CLÍNICA LATINOAMERICANA. Diciembre, 2005., vol. 39, no. 4, p. 529-539

⁸¹MORA, Carlos Eduardo. Op cit., p. 55

⁸² HERNÁNDEZ, Ana María. Sólidos Suspendidos Totales En Agua Secados a 103 – 105 °c. 2007.

⁸³ARNÁIZ FRANCO, Carmen; ISAC ORIA, Laura y LEBRATO MARTÍNEZ, Julián. Determinación De La Biomasa En Procesos Biológicos. I Métodos Directos E Indirectos. Elsevier, 2000.

Ecuación 8. Fórmula para determinar sólidos suspendidos totales.

$$SST = \frac{(A - B) * 1000}{V}$$

En donde:

SST: Sólidos Suspendidos Totales, en mg/L

A: Peso final del conjunto (filtro + cápsula) con el residuo seco, en mg.

B: Peso inicial del conjunto (filtro + cápsula), en mg.

V: Volumen de muestra filtrada, en mL.

La concentración de biomasa se definió como mg de peso seco de células por mililitro de medio de cultivo.

3.1.5.1 Obtención de datos. Para realizar la curva de calibración se preparó un medio de 100 mL, compuesto por glucosa y caldo nutritivo, con pH ajustado a 5.5, el cual contenía 10 mL de inóculo (10% v/v del volumen total⁸⁴) en Erlenmeyer.

Para la preparación del inóculo se prepararon 10 mL de medio caldo nutritivo y glucosa en el que estaba contenido la cepa 10 y se dejó incubar a 35°C por aproximadamente 24 horas en una incubadora con agitación oscilatorio a 150 rpm.

La realización de la curva de calibración se elaboró con agitación constante en el sistema de agitación axial a 200 rpm, construido en el laboratorio, a una temperatura de 35 °C, sin control de pH, durante 36 horas.

La determinación de biomasa por peso seco, se realizó tomando muestras por duplicado de 10 mL de medio de cultivo en tubos de centrifuga. Previamente se secaron cajas de Petri a 105 °C por dos horas. La biomasa fue filtrada al vacío en una membrana de celulosa de 0.45µm y se llevaron al horno a 105 °C por dos horas. Para la medición de la densidad óptica se tomaron muestras de 3 mL del medio de cultivo por duplicado y se midió la absorbancia a la longitud de onda hallada por el barrido espectral. Se usó como blanco glucosa y caldo nutritivo con pH ajustado.

⁸⁴ BECERRA MEJÍA, Camilo Andrés. Optimización De Un Medio De Cultivo Para La Producción De Biomasa De La Cepa Pseudomonas Putida UA 44 Aislada Del Suelo Bananero De Uraba –Antioquia. UNIVERSIDAD EAFIT, 2007. p. 136

3.1.6 Crecimiento microbiano. Se monitoreo el crecimiento microbiano empleando el método turbidimétrico, midiendo la absorbancia del cultivo microbiano a la longitud de onda hallada por el barrido espectral. Posteriormente, con la curva de calibración determinada previamente se relacionó la densidad óptica de las cepas con la concentración de la biomasa, para así basados en el crecimiento de la densidad de la biomasa seleccionar las cepas para la conformación del cultivo mixto.

Lo primero que se realizó fue adecuar una incubadora con un sistema de agitación axial, elaborado en el laboratorio, el cual trabajó a 300 rpm, siendo este constante durante todo el tiempo del crecimiento, para favorecer el contacto con el oxígeno.

Para medir el crecimiento de cada una de las cepas, se preparó 80 mL de medio glucosa y caldo nutritivo con pH ajustado el cual contenía 10 % v/v de inóculo.

Para la preparación del pre-inóculo se tomó una muestra de cepa en medio sólido, con un asa metálica y se adicionó a 10 mL de medio líquido de glucosa y caldo nutritivo y se incubó a 35 °C por 24 horas en una incubadora tipo Shaker con agitación oscilatorio a 230 rpm.

3.1.6.1 Obtención de datos. El cultivo fue incubado a 35°C por 72 horas en el sistema de agitación axial a 300 rpm. Al iniciar el proceso se tomaron muestras de 3 mL de caldo para medir la absorbancia del medio a 570 nm; iniciando en el momento que se mezcla el inóculo con el medio de cultivo, obteniendo 7 muestras para cada curva de crecimiento microbiano; en total 14. Las muestras eran tomadas de manera adecuada, en cabina de bioseguridad de flujo laminar para evitar contaminación con el exterior, ya que se generaría una posible alteración del proceso. Se realizó una coloración de Gram cada 24 horas. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas por duplicado.

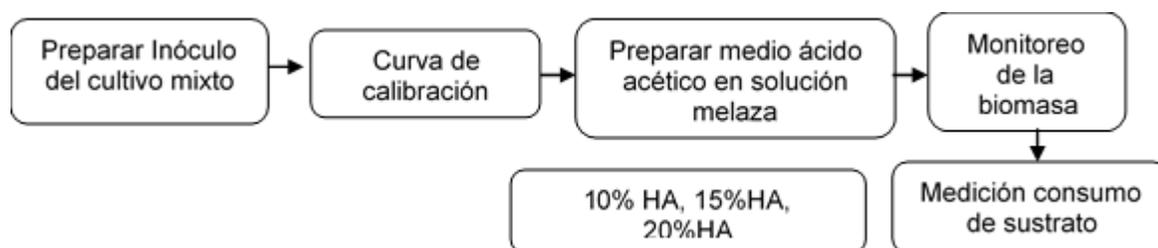
3.2 CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIO SINTÉTICO

De acuerdo a el proyecto desarrollado en la Universidad Antonio Nariño, sobre la producción de PHA bajo el concepto de biorrefinería, compuesto por tres etapas secuenciales, se plantea que la primera etapa correspondiente a la fermentación acidogénica, en la que se obtiene una corriente a la salida del reactor acidogénico rica en AGVs y trazas de melaza sin fermentar⁸⁵, corresponda a la corriente de alimentación al reactor de acumulación de PHA, de la tercera etapa; por ello para estimar los parámetros cinéticos del cultivo mixto, conformado por las cepas seleccionadas previamente, basado en el crecimiento, se empleó sustrato sintético de ácido acético en solución melaza.

⁸⁵ MORA, Carlos Eduardo. Op cit. p. 55

En la **figura 11** se describe la metodología para seleccionar la relación de sustrato, de un medio sintético conformado por ácido acético en solución melaza, basado en el crecimiento del cultivo mixto bacteriano conformado; sobre este medio se determinaron los parámetros cinéticos.

Figura 11. Metodología para la selección de la relación de sustrato de un medio sintético



Fuente: elaboración propia

3.2.1 Curva de calibración cultivo mixto. Se realizó una curva de calibración para el cultivo mixto en el que se determinó el peso seco, se midió la densidad óptica y se realizó la técnica de extensión en placa con rastrillo, esta última técnica se utilizó como un control de la posible detección de PHA por medio de la técnica de tinción en Agar con colorante Rojo Nilo⁸⁶ y también para evidenciar la no contaminación por parte de algún microorganismo diferente a los utilizados, comparando las morfologías macroscópicas, encontradas para las cepas que se seleccionaron para la conformación del cultivo mixto.

La biomasa seca se determinó como SST por el método gravimétrico, reportado por Méndez⁸⁷ el cual se muestra en el **ANEXO G**; para llevar a cabo el método se realizaron tres lavados con agua destilada con el fin de retirar cualquier interferente proveniente de la melaza. La concentración de biomasa del cultivo mixto se definió como mg de peso seco de células por mililitro de medio de cultivo, se realizó empleando la **ecuación 8**.

Para determinar la biomasa del cultivo mixto se empleó una metodología distinta a la empleada en la sección 3.1.4, debido a que el equipo necesario para realizar la filtración al vacío presentó un daño y por ello se tuvo que implementar una metodología que no hiciera uso de este.

⁸⁶ BELLO GIL, Daniel y BRAND, Helmut. Selección de bacterias productoras de PHA. En: ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 2007. vol. 41, no. 2, p. 10-18

⁸⁷ MÉNDEZ REYES, Daniel Alexander. Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria *burkholderia cepacia* B27 a partir de ácidos grasos. Universidad Nacional de Colombia, 2016. p. 137

3.2.1.1 **Obtención de datos.** Para realizar la curva de calibración se preparó un medio de 350 mL, compuesto por melaza a una concentración de 1600 mg DQO/L, con pH ajustado a 5.5, el cual contenía 10 mL de inóculo (10% v/v del volumen total⁸⁸) en Erlenmeyer. Este inóculo contenía las cepas seleccionadas para la conformación del cultivo mixto en una relación 1:1⁸⁹ Se dejó incubar a 35°C por aproximadamente 30 horas en el sistema de agitación, construido en el laboratorio, con agitación axial constante a 300 rpm, sin control de pH.

Para la preparación del inóculo se prepararon 50 mL de medio caldo nutritivo y glucosa para cada una de las cepas por separado en el que para cada uno estaba contenida las cepas seleccionadas para la conformación del cultivo mixto. Se dejó incubar a 35°C por aproximadamente 24 horas en el sistema de agitación, construido en el laboratorio, con agitación axial constante a 300 rpm.

La determinación de biomasa por peso seco, se realizó tomando muestras por triplicado de 5 mL de medio de cultivo en tubos de centrifuga, los cuales fueron centrifugados a 4500 rpm durante 10 minutos; luego se descartó el sobrenadante, correspondiente al medio, que puede causar interferencias y se resuspendió la biomasa en agua destilada hasta alcanzar el volumen inicial, se realizó el lavado dos veces más y posteriormente se llevó la muestra al horno, previamente se secaron cápsulas de porcelana a 105 °C por 24 horas.

Para la medición de la densidad óptica se tomaron muestras de 3 mL del medio de cultivo y se midió la absorbancia a 570 nm. Se usó como blanco la melaza a 1600 mg DQO/L con pH ajustado.

Para la técnica de extensión en placa con rastrillo se utilizó un medio, empelado en el laboratorio, conformado por, glucosa 10 g/L, peptona 2.5 g/L, extracto de levadura 1.0 g/L, NaCl 2.5 g/L, extracto de carne 0.5 g/L, agar 15 g/L. pH 7.0 ± 0.1 y 500 µL de colorante rojo de Nilo al medio (cantidad para 1L de medio) **(ANEXO A)**.

Una vez estéril el medio se adicionó en cajas de Petri en cabina de flujo laminar y se esperó a que este se gelificara para realizar la siembra. Paralelamente en tubos de falcón se agregaron 9.9 mL de solución salina al 0.85% y 0.1 mL de muestra del medio contenida en el Erlenmeyer, correspondiente a la dilución 10⁻² posteriormente se toma 0.1 mililitro de la dilución 10⁻² y se agrega en un segundo tubo con 9.9 mL de solución salina al 0.85%, correspondiente a la dilución 10⁻⁴, y así sucesivamente con todos los tubos hasta llegar a la dilución requerida.

⁸⁸ BECERRA MEJÍA, Camilo Andrés. Op cit. p. 136

⁸⁹ BHATIA, Shashi Kant, et al. Engineering of artificial microbial consortia of Ralstonia eutroPHA and Bacillus subtilis for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. En: Bioresource Technology. Jun. vol. 257, p. 92-101.

3.2.2 Preparación medio sintético de 1600 mg DQO/L. El grupo de investigación GRESIA de la Universidad Antonio Nariño, como ya se ha mencionado, tiene un proceso para la producción de PHA bajo el concepto de biorrefinería, en el que se ha propuesto que la primera etapa acidogénica (productora de AGV con trazas de azúcares) sea el sustrato de los microorganismos de la segunda y tercera etapa correspondiente a la selección de las bacterias acumuladoras de PHA y la acumulación de PHA, respectivamente.

Por lo anterior, se prepararon tres medios sintéticos de ácido acético en solución melaza, cuyos valores se obtuvieron en la corriente de salida de tres reactores ácido génicos con los que trabajó el autor Mora⁹⁰, en el grupo de investigación GRESIA de la universidad Antonio Nariño. Cada uno de los biorreactores fueron alimentados con melaza a una concentración de 2000 mg DQO/ L, obteniendo una conversión en la DQO de 20%, 40% y 30% de DQO en ácidos grasos volátiles, en donde, 10%, 15% y 20% correspondían a ácido acético, respectivamente; por lo que con estos porcentajes de concentración de DQO de H Ac. Se prepararon los medios sintéticos de ácido acético en solución melaza, teniendo en cuenta una DQO de 1600 mg/L, puesto que la concentración actual de la corriente compleja de salida del reactor acidogénico se encuentra entre los valores de 1500 a 2000 mg DQO/L⁹¹.

Se seleccionó el ácido acético ya que como se mencionó en la sección 2.2.2, en cultivos microbianos mixtos aeróbicos alimentados con este AGV, el autor Johnson obtuvo un 89% de acumulación de PHA.

3.2.2.1 Cantidades de melaza y acetato para la preparación de los sustratos. Para la preparación de la melaza se utilizó la relación de la concentración de melaza establecida en por el laboratorio, correspondiente a 2.72 g/L para una DQO de 2000 mg/L⁹².

Por otro lado, para la preparación del acetato de sodio se estableció una relación de concentración del acetato de sodio, midiendo la DQO de un gramo de acetato de sodio, aforado en un balón volumétrico, con agua destilada a 1L. Finalmente con la relación hallada de DQO para 1 g acetato/ L, se prepararon las concentraciones de ácido acético en los medios sintéticos.

⁹⁰ MORA, Carlos Eduardo. Op cit. p. 55

⁹¹ FONSECA AMAYA, Liseth Camila y SANCHEZ BEDOYA, María Fernanda. Evaluación de la influencia del sustrato principal (ácido acético y ácido acético/ melaza) en la selección de cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA, en un reactor airlift . Fundación universidad de américa, 2019. p. 122.

⁹² ORTEGÓN VELANDIA, María Fernanda. Evaluación del potencial acidogénico para producción de ácidos grasos volátiles (agv) a partir de lixiviados de los residuos sólidos orgánicos, como plataforma de biorefinería. Universidad Santo Tomás, 2016. p. 84.

En la **tabla 6** se presenta la cantidad de melaza y acetato para cada porcentaje de DQO, para cada uno de los medios sintéticos, para un volumen de 400 mL.

Tabla 6. Cantidad de melaza y Acetato para una DQO total de 1600 mg/L

PORCENTAJE DE MELAZA	mg DQO/L EQUIVALENTE MELAZA	CANTIDAD DE MELAZA (g)	mg DQO/L EQUIVALENTE ACETATO	CANTIDAD DE ACETATO (g)
90% DQO	1440	0.783	160	0.01226
85% DQO	1360	0.7398	240	0.02758
80% DQO	1280	0.696	320	0.04904

Fuente: elaboración propia.

Para cada uno de los medios, se agregan los componentes en agua destilada para hidratarlos, y se disuelven en la mezcla; posteriormente los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 30 minutos a 20 Psi y 121 °C.

➤ **Curva de calibración DQO.** Para el seguimiento del consumo de sustrato se midió la DQO del medio, cuantificando la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en la muestra⁹³. Se empleó esta técnica para realizar un monitoreo a las fuentes de carbono presentes en el medio, melaza y ácido acético.

Para la medición del consumo de sustrato en los medios sintéticos, no se monitoreo las fuentes de carbono por separado, debido a que para realizar el seguimiento a el consumo de AGV's, empleando las técnicas usadas en el laboratorio correspondientes a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)⁹⁴ y titulación de AGV's⁹⁵, se presentaron inconvenientes, la columna cromatográfica del equipo se encontraba dañada, y no se tenía la cantidad necesaria de reactivo para llevar a cabo el muestreo, respectivamente. Por otro lado, para el monitoreo de los azúcares reductores presentes en la melaza, para realizar la técnica DNS⁹⁶, no se tenían los reactivos (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para llevar a cabo la técnica; es por ello que únicamente se midió la demanda química de oxígeno⁹⁷.

⁹³ RODRÍGUEZ, Carlos Hernán; COY, Gustavo Alfonso y DUQUE, Marta Helena. Informes de Prevalidación de la Demanda Química de Oxígeno, Técnica Volumétrica – Método de Reflujo cerrado. IDEAM. Bogotá D.C. 2017

⁹⁴ MORA, Carlos Eduardo. Op cit. p. 55

⁹⁵ FONSECA AMAYA, Liseth Camila y SANCHEZ BEDOYA, Op cit. p. 122.

⁹⁶ FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Op cit. p. 120.

⁹⁷ ORTEGÓN VELANDIA, María Fernanda. Op cit. p. 84

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

La curva de calibración se realizó con el fin de determinar las concentraciones de DQO de las muestras extraídas de los medios sintéticos de ácido acético en solución melaza, por medio de la medición de la densidad óptica de la muestra, para así analizar el consumo de sustrato y observar cuál relación de sustrato tiene mejor rendimiento con respecto a la biomasa

El resultado de esta curva dio un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0.9876, por lo cual se puede afirmar que la preparación del reactivo y las soluciones patrón de biftalato de potasio se realizaron de manera adecuada.

3.2.3 Crecimiento microbiano del cultivo mixto en medio sintético. Para realizar la curva de crecimiento microbiano del cultivo mixto se preparó un medio de 400 mL, compuesto por ácido acético en solución melaza al 10%, 15% y 20% respectivamente con respecto a una concentración total de 1600 mg DQO/L, con pH ajustado a 5.5, el cual contenía 10 mL de pre-inóculo (10% v/v del volumen total) en Erlenmeyer. El pre-inóculo contenía las cepas seleccionadas para la conformación del cultivo mixto, en una relación 1:1⁹⁸.

Para la preparación del pre-inóculo se prepararon 50 mL de medio caldo nutritivo y glucosa para cada una de las cepas seleccionadas para conformar el cultivo mixto en el que para cada medio estaba contenida cada una de las cepas seleccionadas. Se dejó incubar a 35°C por aproximadamente 24 horas en el sistema de agitación, construido en el laboratorio, con agitación axial constante a 300 rpm.

Los medios de cultivo del cultivo mixto se dejaron incubar a 35°C por aproximadamente 72 horas en el sistema de agitación, construido en el laboratorio, con agitación axial constante a 300 rpm, sin control de pH. Para cada medio de cultivo se midió la densidad óptica, el pH, se determinó el consumo de sustrato, se realizó la técnica de extensión en placa con rastrillo y se realizó la detección de PHA por medio de la técnica de Negro de Sudan en solución alcohólica. Cada una de estas mediciones se realizó cada 12 horas.

⁹⁸ BHATIA, Shashi Kant, et al. Engineering of artificial microbial consortia of *Ralstonia eutropha* and *Bacillus subtilis* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. Op cit., p. 92-101.

Para monitorear el crecimiento microbiano del cultivo mixto se empleó el método turbidimétrico, por lo que se midió la densidad óptica del medio de cultivo a 570 nm cada 12 horas. Se usó como blanco el medio de cultivo de ácido acético en solución melaza al porcentaje de DQO utilizado, teniendo en cuenta una concentración total de 1600 mg DQO/L con pH ajustado.

Para detectar la acumulación de PHA se empleó la técnica de extensión en placa con rastrillo utilizando un medio empleado en el laboratorio conformado por, glucosa 10 g/L, peptona 2.5 g/L, extracto de levadura 1.0 g/L, NaCl 2.5 g/L, extracto de carne 0.5 g/L, agar 15 g/L. pH 7.0 ± 0.1 y 500 μ L de colorante rojo de Nilo al medio (cantidad para 1L de medio) **(ANEXO A)**. Para realizar la siembra en el medio gelificado se realizaron diferentes diluciones y se escogió una dilución adecuada para sembrar por triplicado.

Se empleó la técnica de Negro Sudán como una técnica de control para la detección semi-cualitativa del PHA⁹⁹, para ello se tomó 1 mL del medio de cultivo por triplicado se adicionó en un tubo eppendorf, se centrifugó la muestra, se realizó un lavado con agua destilada, para eliminar trazas de del medio de cultivo y se suspendió en 400 μ L de Negro de Sudán B 0.3% (SB) para luego ser introducidas en la incubadora a agitación constante de 230 rpm por 20 minutos a 35°C; posteriormente se centrifugó la muestra y se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el SB no fijado por las células. Finalmente, se suspendió el pellet de células que fijaron el SB en 1 mL de agua destilada, se homogenizó con ayuda del vortex, se realizó una dilución 1:9 y se midió la densidad óptica a 580 nm.

Por otro lado, para medir el consumo de sustrato se empleó el método colorimético DQO, para ello se tomaron muestras cada 12 horas hasta transcurridas 72 horas y se midió la DQO por duplicado (se realizaron diluciones 1:2).

⁹⁹ PORRAS, Mauricio A.; VILLAR, Marcelo A. y CUBITTO, María A. Op cit p. 28-32

4 RESULTADOS

4.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO

Para la conformación del cultivo mixto se siguió la metodología encontrada en la figura 9, en donde, se reactivaron las cepas, se realizó un barrido espectral, se hizo una curva de calibración para relacionar el peso seco de la biomasa con la absorbancia del medio de cultivo y se monitoreo el crecimiento de la biomasa por el método turbidimétrico. A continuación, se presentan los resultados.

4.1.1 Reactivación de las cepas. Se realizó una caracterización macroscópica y microscópica para verificar condiciones de axenidad a lo largo de la experimentación y

4.1.1.1 Caracterización macroscópica. Se realizó una caracterización macroscópica con el fin de garantizar que las cepas reactivadas tengan una única morfología, es decir, sean cultivos axénicos, y también para identificar cada cepa bacteriana. En el **cuadro 1** se puede observar la descripción de la morfología macroscópica (superficie, forma y borde) de las cepas que presentaron crecimiento. En las cepas 5 y 7 no se evidenció crecimiento transcurridas 72 horas por lo que estas cepas fueron descartadas en el proyecto de investigación por lo que se trabajó con once cepas.

Cuadro 1. Caracterización macroscópica de las colonias en Agar Nutritivo y Glucosa.

CEPA	Tiempo en que se evidencia crecimiento	Superficie	Forma	Borde
1	72	Convexa	Puntiforme	Redondeado
2	72	Plana convexa	Irregular y puntiforme	ondulado
3	24	Palpitada	Irregular	Ondulado
4	24	Plana	Puntiforme y rizada	Lobulado
5	NO SE EVIDENCIO CRECIMIENTO			
6	24	Convexa	Puntiforme	Ondulado
7	NO SE EVIDENCIO CRECIMIENTO			
8	48	Umbilicada	Circular	Redondeada
9	48	Convexa	Circular	Ondulado
10	72	Plana convexa	Circular	Redondo
11	24	Plana	Irregular	Ondulada
12	48	Plana convexa	Puntiforme	Redondeada

Cuadro 1. (Continuación)

CEPA	Tiempo en que se evidencia crecimiento	Superficie	Forma	Borde
13	48	Convexa	Circular	Regular

Fuente: elaboración propia.

4.1.1.2 Caracterización microscópica. Se realizó una caracterización microscópica para garantizar que las cepas reactivadas tengan una única morfología, es decir, sean cultivos axénicos, y también para identificar cada cepa bacteriana. En la **tabla 7** se realiza una descripción microscópica de la morfología, encontrada a un aumento de 100x, en donde se describe la forma, la agrupación y su clasificación en Grampositivas o Gramnegativas según la estructura de su pared celular basados en la coloración por medio de la tinción de Gram, metodología **sección 3.1.2**.

Tabla 7. Caracterización microscópica de las colonias en Agar Nutritivo.

Cepa	Foto de cepa	Clasificación según la tinción de su pared celular		Morfología colonial bacteriana forma	Morfología colonial bacteriana agrupación
		Gram positivas	Gram negativas		
1		X		Bacilos	Duplas

Tabla 7. (Continuación)

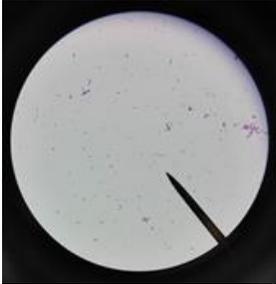
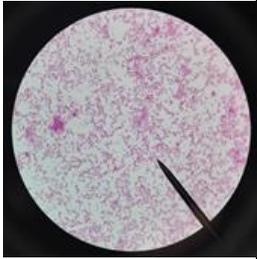
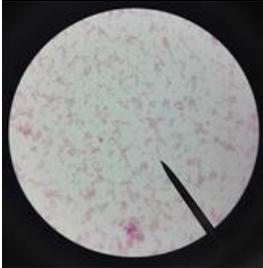
Cepa	Foto de cepa	Gram positivas	Gram negativas	Morfología colonial bacteriana Agrupación	Morfología colonial bacteriana agrupación
2		X		Bacilos	Duplas
3			X		
4			X	Bacilos	Empalizadas

Tabla 7. (Continuación)

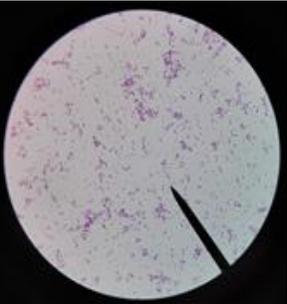
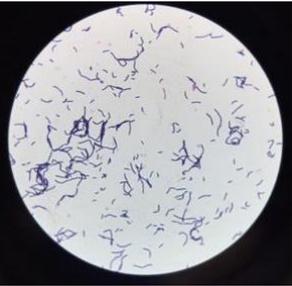
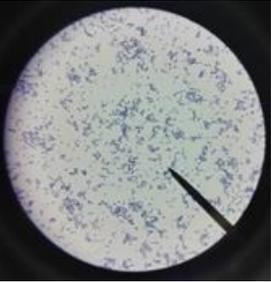
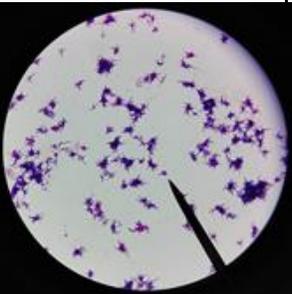
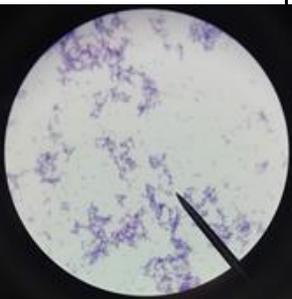
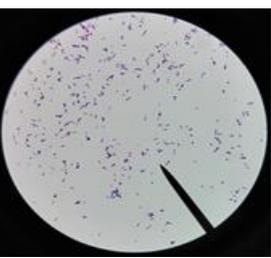
Cepa	Foto de cepa	Gram positivas	Gram negativas	Morfología colonial bacteriana Agrupación	Morfología colonial bacteriana agrupación
6		X		Bacilos	Empalizadas en minoría en cadena y duplas
8		X		Bacilos	Cadena y en minoría en forma de estrella
9		X		Bacilos	Duplas

Tabla 7. (Continuación)

Cepa	Foto de cepa	Gram positivas	Gram negativas	Morfología colonial bacteriana Agrupación	Morfología colonial bacteriana agrupación
10		X		Bacilos	Empalizadas
11		X		Bacilos	En forma de estrella
12		X		Bacilos	Cadena
13		X		Bacilos	Cadena

Fuente: elaboración propia

4.1.2 Barrido espectral. Se realizó una curva espectral, procedimiento sección 3.1.3 para cuatro cepas seleccionadas aleatoriamente; por practicidad se seleccionó esta cantidad de cepas, ya que, se tuvo una limitación de los reactivos de los medios de cultivo, debido a que se trabajaron once cepas. Además, para realizar el seguimiento del crecimiento de los microorganismos de un cultivo mixto se debe seleccionar una longitud de onda determinada¹⁰⁰.

En la **tabla 8** se presentan los datos obtenidos del barrido espectral.

Tabla 8. Datos del barrido espectral para las cepas de trabajo

LONGITUD DE ONDA(λ)	AMPLITUD			
	CEPA 3	CEPA 9	CEPA 12	CEPA 13
500	0.144	0.125	0.111	0.156
510	0.137	0.148	0.109	0.152
520	0.132	0.106	0.103	0.148
530	0.125	0.103	0.096	0.137
540	0.121	0.105	0.098	0.135
550	0.235	0.1	0.093	0.125
560	0.511	0.096	0.433	0.127
570	0.128	0.098	0.094	0.13
580	0.111	0.087	0.615	0.128
590	0.106	0.087	0.081	0.12
600	0.084	0.087	0.07	0.112
610	0.099	0.082	0.078	0.123
620	0.097	0.086	0.082	0.115
630	0.093	0.077	0.077	0.11
640	0.091	0.073	0.081	0.107
650	0.09	0.071	0.069	0.101
660	0.089	0.071	0.076	0.1
670	0.083	0.067	0.063	0.099
680	0.084	0.057	0.069	0.1
690	0.081	0.238	0.064	0.094
700	0.109	0.065	0.064	0.093

Fuente: elaboración propia

4.1.3 Curva de calibración. Para la curva de calibración se seleccionó la cepa 10, aleatoriamente, por motivos de practicidad, debido a que se dispone de once

¹⁰⁰ NUÑEZ ZEPEDA, Miguel. Estandarización y evaluación de técnicas Analíticas para medir el crecimiento de un cultivo mixto para biolixiviación de minerales. Universidad de Sonora, 2016. p. 74.

cepas y una limitación de material como lo fue la membrana de celulosa usada al momento de filtrar la biomasa.

Con la curva de calibración realizada se expresó la absorbancia de los medios de cultivo para cada una de las cepas, en términos de concentración celular (mg/L) para reportar los datos hallados en unidades del sistema internacional, procedimiento sección 3.1.5. En la **tabla 9** se presentan un promedio de los datos medidos experimentalmente de peso seco y densidad óptica. En el **ANEXO E** se encuentran los datos con los duplicados correspondientes.

Tabla 9. Datos experimentales de densidad óptica y pesos seco

Cepa 10				
Nº muestra	Wf-Wo (g)	ΔW (mg)	ΔW (mg/mL)	Abosrbancia
				λ 570 nm
1	0,0018	1,8	0,18	0,071
2	0,0023	2,3	0,23	0,103
3	0,0046	4,6	0,46	0,356
4	0,0054	5,4	0,54	0,368
5	0,0099	9,9	0,99	0,727

Fuente: elaboración propia

4.1.4 Crecimiento microbiano. Se realizaron curvas de crecimiento para cada una de las cepas, según el procedimiento de la **sección 3.1.5.**; basados en el crecimiento se seleccionaron las cepas que conformaron el cultivo mixto. En la **tabla 10** se encuentran un promedio de datos obtenidos experimentalmente expresados en mg/L. En el **ANEXO F** se encuentran los datos con los duplicados correspondientes.

Tabla 10. Datos experimentales de la concentración de la biomasa

CONCENTRACIÓN CELULAR (mg/L)	TIEMPO (h)/ CEPAS	0	6	12	24	30	48	54	72
	1	114,64	125,71	405,36	1081,79	1488,21	2857,14	2294,46	1891,07
2	187,86	279,64	370,36	541,07	729,64	600	480	289,29	
3	151,43	219,29	428,93	616,07	772,14	1108,21	1525,71	995	
4	86,79	107,14	312,14	665	1016,43	1974,64	1903,93	2090,36	
6	86,07	108,21	332,86	731,07	1032,14	1233,21	1283,93	1691,79	
8	114,29	123,57	333,57	652,14	880,71	1026,96	1061,25	990	
9	141,43	153,93	282,5	424,64	682,5	1168,93	1341,96	1066,07	
10	67,86	79,29	178,93	336,07	468,21	1797,86	1635	705	
11	120,36	156,07	278,57	420	810,36	966,43	1143,75	857,14	
12	200,36	212,86	500,36	695,71	1183,57	1602,14	1440,89	1279,64	
13	117,5	137,86	405,71	923,93	1136,79	1647,5	1633,21	1521,79	

Fuente: elaboración propia.

4.2 CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO

4.2.1 Curva de calibración del cultivo mixto. Para la curva de calibración de cultivo mixto se siguió el procedimiento de la **sección 3.2.1**. Para, al igual que la curva de calibración para la conformación del cultivo mixto, relacionar la absorbancia con el peso seco del cultivo mixto. En la **tabla 11** se presentan un promedio de los datos medidos experimentalmente de peso seco y densidad óptica. En el **ANEXO N** se encuentran los datos con los duplicados correspondientes.

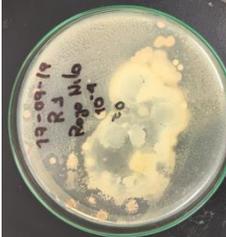
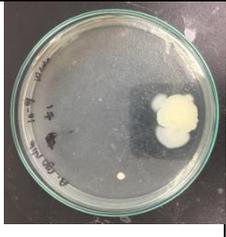
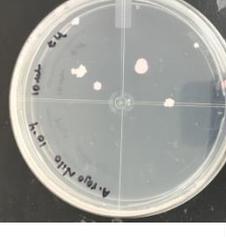
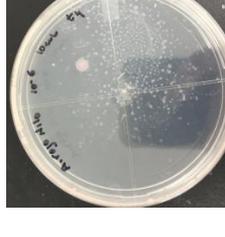
Tabla 11. Datos experimentales de densidad óptica y peso seco

W inicial (g)	W final (g)	ΔW (g)	PROMEDIO ΔW (g)	PROMEDIO ΔW (g)/ml	PROMEDIO ΔW (mg)/L	D.O
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0	0,0000
25,6861	89,6364	0,0008	0,0021	0,0004	415,6	0,1320
89,4529	89,4559	0,0031				
32,4411	32,4434	0,0023				
92,7262	92,7304	0,0042	0,0042	3,0000	846,7	0,2243
90,9674	90,9721	0,0047				
88,6581	88,6619	0,0038				
90,4230	90,4291	0,0061	0,0063	4,0000	1253,3	0,3003
91,6433	91,6502	0,0069				
82,3845	82,3903	0,0058				
25,6861	25,6952	0,0091	0,0091	5,0000	1813,3	0,4047
20,0048	20,0135	0,0087				
23,0044	23,0138	0,0094				
94,1350	94,1451	0,0100	0,0134	6,0000	2672,7	0,5697
85,8121	85,8257	0,0136				
94,8548	94,8712	0,0164				
29,8075	29,8231	0,0156	0,0156	7,0000	3120,0	0,6250
32,8179	32,8324	0,0145				
30,7374	30,7541	0,0167				

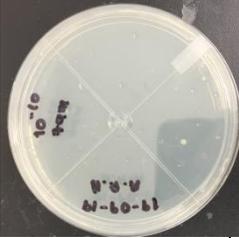
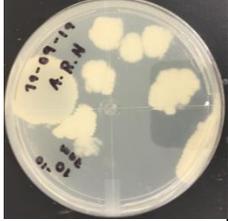
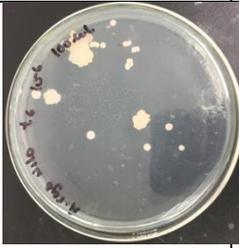
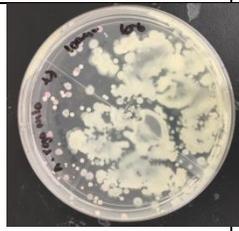
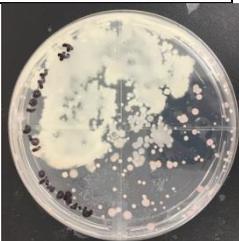
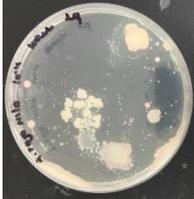
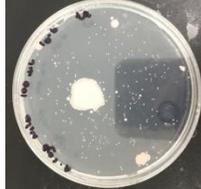
Fuente: elaboración propia

4.2.1.1 Detección probable PHA por tinción Agar rojo Nilo. Para la curva de calibración del cultivo mixto se realizó un seguimiento de la detección probable de PHA por medio de la técnica de tinción en Agar rojo Nilo por duplicado para dos diluciones seleccionadas. En el **cuadro 2** se presentan las extensiones en placa realizadas para el medio de cultivo cada 12 horas.

Cuadro 2. Detección probable de PHA por tinción Agar rojo Nilo para la curva de calibración del cultivo mixto.

Curva de calibración 1				
Tiempo	Imagen			
	Dilución 1		Dilución 2	
T0				
T1				
T2				
T3				
T4				

Cuadro 3. (Continuación)

Curva de calibración 1				
Tiempo	Imagen			
	Dilución 1		Dilución 2	
T5				
T6				
T7				
T8				
T9				

Fuente: elaboración propia

4.2.2. Crecimiento microbiano del cultivo mixto en medio sintético. Para el crecimiento microbiano del cultivo mixto en medio sintético se siguió el procedimiento de la sección 3.2.3, en el que se siguió el crecimiento microbiano por medio del método turbidimétrico, se realizó un seguimiento al pH, se cuantificó el consumo de sustrato y se realizó una detección probable del PHA por las técnicas de Agar rojo Nilo y Tinción negro de Sudán.

En las **tablas 12, 13** y 14 se encuentran promedios de los datos para cada uno de los medios correspondiente a los medios sintéticos de 10%, 15% y 20% de H.Ac en solución melaza, respectivamente; en donde, se encuentran datos de biomasa, consumo de sustrato, seguimiento de pH y datos semicualitativos de acumulación de PHA representados en absorbancia.

Tabla 12. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 1-10% H.Ac en solución melaza

MEDIO 1- 10% H.Ac en solución melaza				
Tiempo (h)	X (mg/L)	Consumo sustrato (mg DQO/L)	pH	Acumulación cualitativa de PHA Negro Sudan
0	630	1697.7	5.47	0.060
12	885	1673.6	4.99	0.129
24	1085	1653.6	4.99	0.189
36	1675	1624.7	5.07	0.192
48	1945	1620.2	4	0.261
60	2105	1618	4.3	0.200
72	1895	1616.7	4.46	0.169

Fuente: elaboración propia

Tabla 13. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 2- 15% H.Ac en solución melaza

MEDIO 2-15% H.Ac en solución melaza				
Tiempo (h)	X (mg/L)	Consumo de sustrato (mgDQO/l)	pH	Acumulación cualitativa de PHA Negro Sudan
0	585		5.46	0.0723
12	1125	1650.2	4.92	0.1513
24	2390	1595.8	5.47	0.1476
36	2990	1570.2	5.52	0.1393
48	3225	1559.1	6.37	0.2696
60	3685	1539.0	7.32	0.2766
72	3450	1535.8	6.26	0.2836

Fuente: elaboración propia

Tabla 14. Resumen de datos obtenidos en el medio sintético 3- 20% H.Ac en solución melaza

MEDIO 3-20% H.Ac en solución melaza				
Tiempo (h)	X (mg/L)	Consumo de sustrato (mgDQO/l)	pH	Acumulación cualitativa de PHA Negro Sudan
0	610	1649.1	5.49	0.06066667
12	985	1624.7	5.02	0.08533333
24	2025	1555.9	5.29	0.15333333
36	2820	1522.4	5.33	0.17366667
48	2880	1517.9	6.05	0.268
60	3260	1510.8	6.4	0.12366667
72	3210	1507.6	7.4	0.23

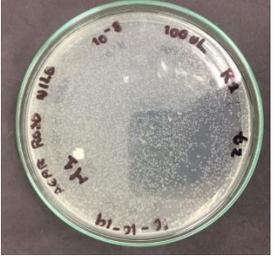
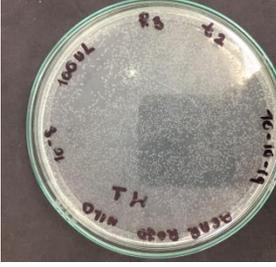
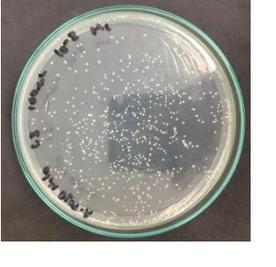
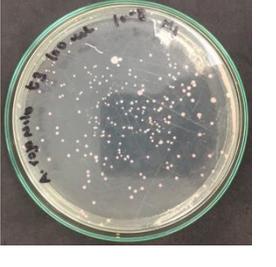
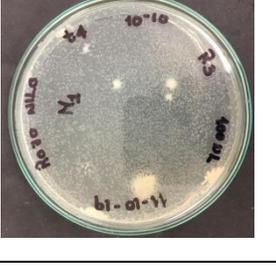
Fuente: elaboración propia

4.2.2.1 Muestreo de medios sintéticos. Para las curvas de crecimiento microbiano del cultivo mixto para cada uno de los medios 10%, 15% y 20% de H.Ac en solución melaza se realizó un seguimiento de la detección probable de PHA por medio de la técnica de tinción en Agar rojo Nilo por triplicado En el **cuadro 3** se presentan las extensiones en placa realizadas para el medio de cultivo cada 12 horas.

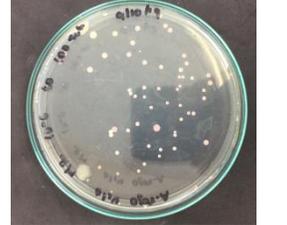
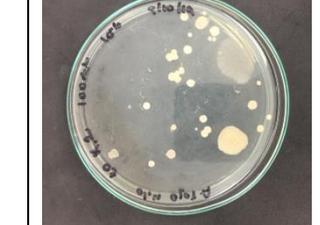
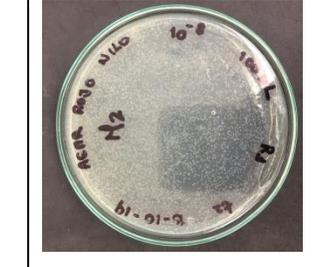
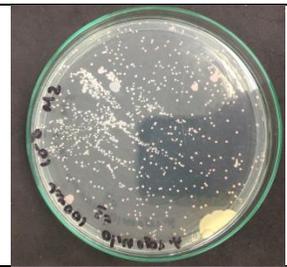
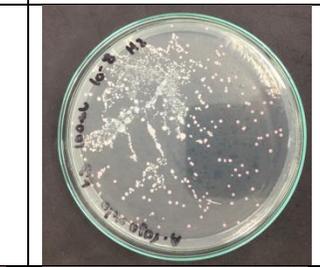
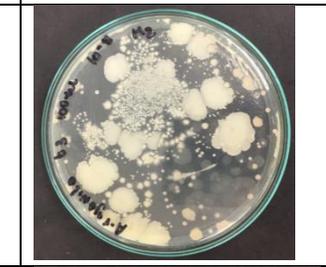
Cuadro 4. Extensiones en placa para los medios sintéticos 10%, 15% y 20% H.Ac en solución melaza.

Cultivo mixto	
Tiempo	Imagen acetato 10%
T0	

Cuadro 3. (Continuación)

T1			
T2			
T3			
T4			
T5			

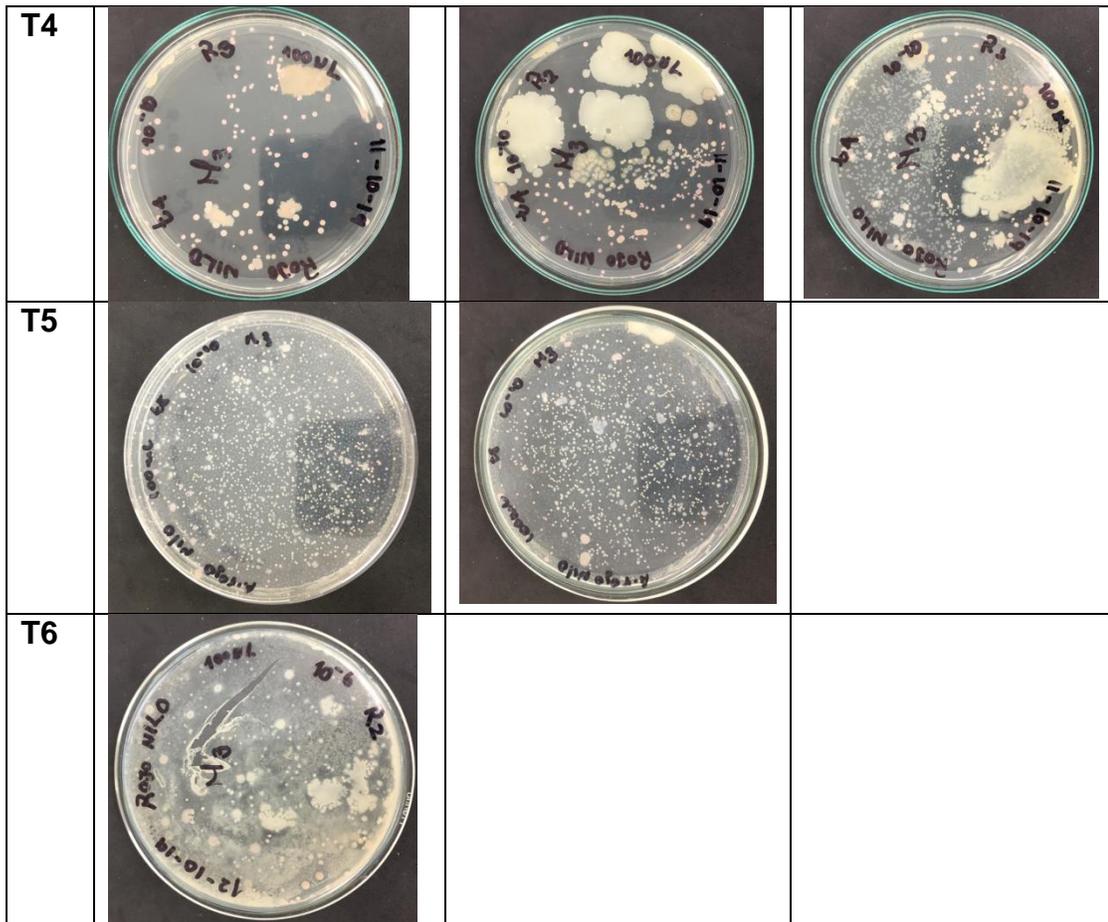
Cuadro 3. (Continuación)

T6			
TIEMPO	IMAGEN ACETATO 15%		
T0			
T2			
T3			
T4			

Cuadro 3. (Continuación)

T5			
T6			
TIEMPO IMAGEN ACETATO 20%			
T0			
T2			
T3			

Cuadro 3. (Continuación)



Fuente: elaboración propia.

En el cuadro 3 se pudo observar que el cultivo mixto conformado por las cepas 1, 4, 6, 10 y 13 muestran las morfologías que se describieron en la sección 4.1.1, denominada caracterización macroscópica. Además, se pudo observar que hubo colonias que pigmentaron de rosado, al encontrarse en un medio de agar rojo nilo, por lo que se puede detectar la posible presencia de PHA.

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 CONFORMACIÓN DEL CULTIVO MIXTO

5.1.1 Reactivación de las cepas. Se realizó la reactivación de las cepas en agar nutritivo con glucosa observando la aparición de colonias entre las 24h a 72h a excepción de las cepas 5 y 7, en las que no se observó crecimiento, por lo tanto, estas dos cepas no se tuvieron en cuenta para el presente estudio, como se mencionó en el capítulo anterior (sección 4.1.1).

Para la reactivación de las cepas, se establecieron las características de las morfologías macroscópicas, evidenciados en el crecimiento en caja de Petri, y microscópicas, establecidas por medio de la tinción de Gram de cada una de las cepas, a fin de corroborar las morfologías establecidas en estudios previos y también para de forma rápida y sencilla controlar que las cepas no presentaran contaminación.

En la **sección 4.1.1** se presentan los resultados obtenidos experimentalmente, en los que se pudo establecer que las características obtenidas son las mismas a las que se encontraban en investigaciones previas de las cepas.

Por medio de las características microscópicas obtenidas al realizar la tinción de Gram se evidenció que las cepas en su totalidad corresponden a bacilos. También, se observó que las cepas 3, 4 y 6 son bacilos Gram negativos por lo que presentan un inconveniente para la producción de PHA con aplicaciones biomédicas, ya que, las bacterias Gramnegativas contienen lipopolisacáridos (LPS), endotoxinas en la membrana celular externa, que puede co-purificarse con polímero PHA crudo durante el proceso de extracción¹⁰¹. Los LPS pueden ser eliminados por medio de tratamientos para el polímero PHA como tratamiento con agentes oxidantes, con disolventes o con extracción de solventes, pero esto conlleva a un aumento del costo de producción y además cambios en las propiedades del biopolímero por lo que las cepas Gram negativas obtenidas no son recomendables para uso en aplicaciones biomédicas del PHA¹⁰².

¹⁰¹ Giin-Yu Amy Tan, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. Basel: MDPI AG, 2014.vol 6. no 6. p. 706-754

¹⁰² *Ibid.*, p. 706-754

5.1.2 Barrido espectral. A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 8**, se construye la Gráfica 1, en donde se evidencian los picos de absorbancia máxima para las cepas seleccionadas aleatoriamente 3, 9, 12 y 13. Como se pudo observar la longitud de onda a la que se obtiene el mayor pico de absorbancia para cada cepa varía, por lo que se calculó una longitud de onda promedio entre los picos de absorbancia máximos hallados de forma experimental, obteniendo una longitud de onda promedio de 570 nm, en la que no se favorece la medición de la absorbancia de alguna cepa sobre otra.

Como se mencionó en la sección 4.1.2 se debe seleccionar una longitud de onda, para al momento de conformar el cultivo mixto microbiano, medir la absorbancia del medio de cultivo, es por ello que se determinó la longitud de onda promedio en la que van a ser medidas cada una de las cepas y el cultivo mixto, como lo hizo el autor Martínez¹⁰³, quien realizó una investigación en la producción de PHA empleando cultivos mixtos microbianos, determinando una longitud de onda promedio para llevar a cabo la medición de la densidad óptica del medio en el que se encontraba inoculado el cultivo mixto microbiano y así realizar un seguimiento en el crecimiento.

En una búsqueda en literatura de la longitud de onda a la que se registran los bacilos acumuladoras de PHA se encontró que para la cepa USBA 355 *Tistlia consotensis*, productora de incrustaciones citoplasmáticas de PHA, se estableció la curva de crecimiento midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 580 nm, reportado por el autor Blanco.¹⁰⁴ En otro estudio, realizado sobre la cepa *Cupriavidus necátor* NCIMB 11842, en el que se evaluaron diferentes concentraciones de glicerol como fuente de carbono para producir PHA, se midió la producción de biomasa registrada a través de la medida de la absorbancia del medio a 600nm¹⁰⁵. Por lo tanto, se puede observar que la longitud de onda determinada se encuentra cercana a los valores que se reportan en literatura.

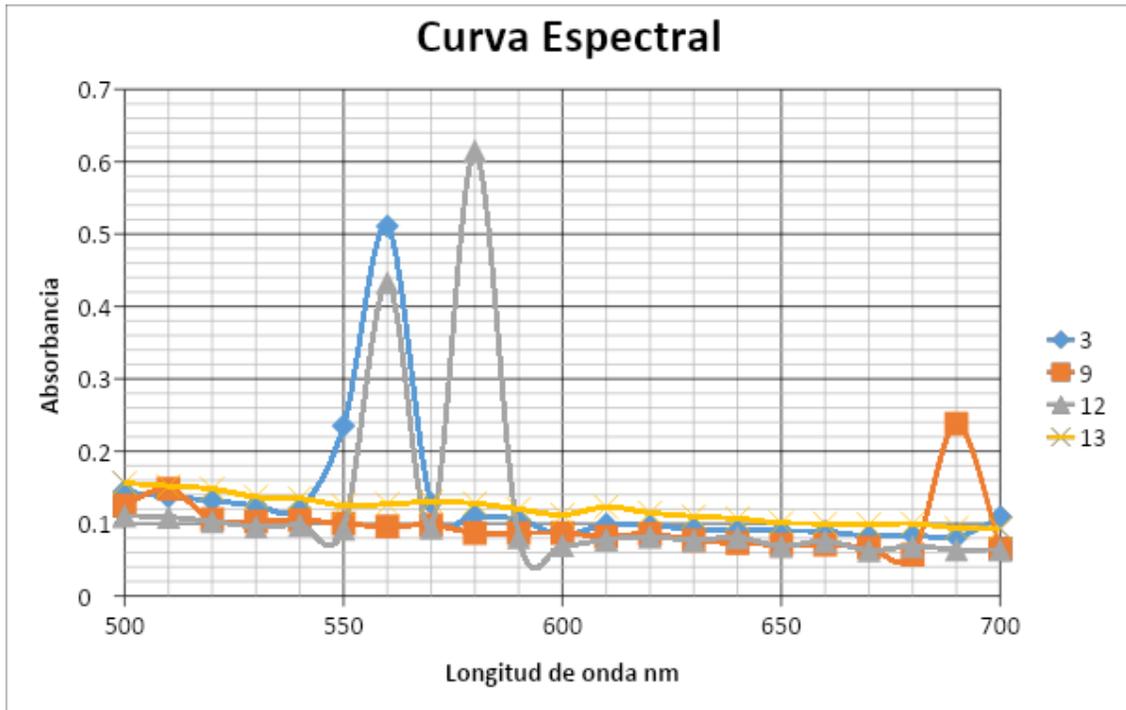
En la longitud de onda hallada, 570 nm, se tomó lectura de la cantidad de luz absorbida por los bacilos en el medio.

¹⁰³ MARTÍNEZ, Guadalupe. Producción de plásticos biodegradables en bacterias. Universidad de la república. 2013. P.226

¹⁰⁴ BLANCO MARIN Karina. Detección De Gránulos De Polihidroxialcanoatos En La Cepa USBA 355 *Tistlia Consotensis*. Pontificia Universidad Javeriana, 2010. p 36

¹⁰⁵NARANJO VASCO, Javier Mauricio. Op cit. p. 127

Gráfica 1. Curva espectral para las cepas 3, 9,12 y 13.

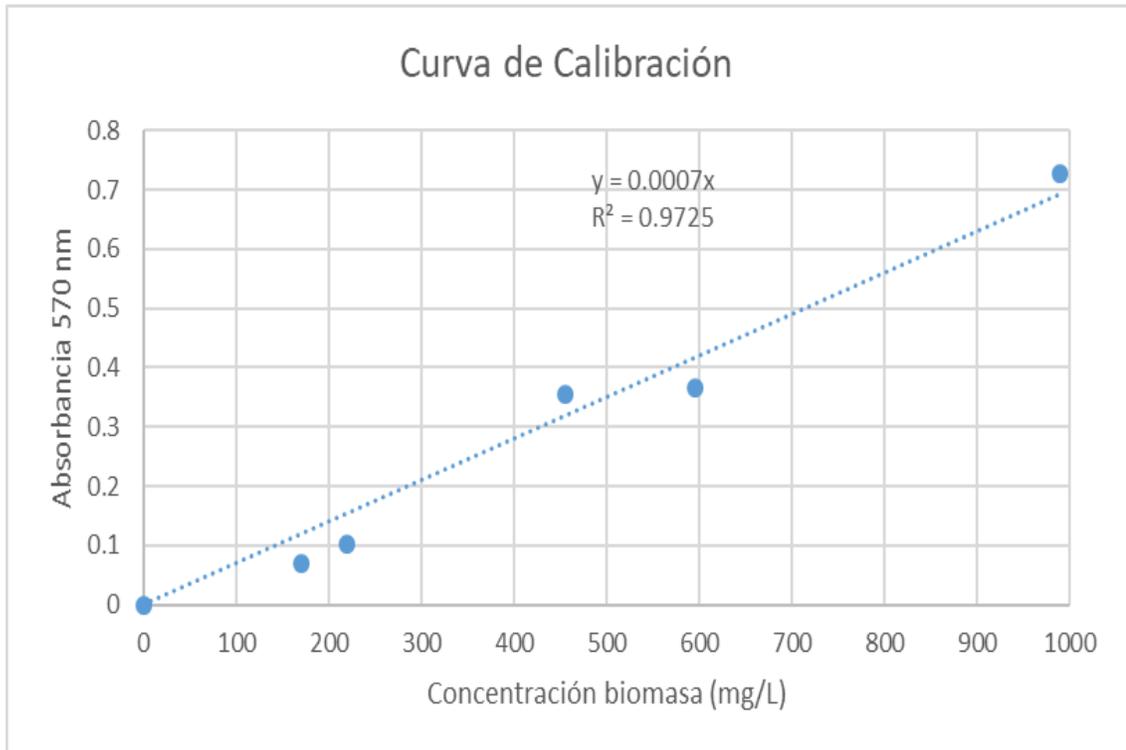


Fuente: elaboración propia

5.1.3 Curva de calibración. Se realizó una curva de calibración con el fin de representar las cepas bacterianas en términos de masa seca microbiana midiendo la absorbancia del medio de cultivo a 570 nm y hallando el peso seco por método gravimétrico, por duplicado.

A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 9**, se construye la **gráfica 2**, en donde se puede observar la curva de calibración obtenida experimentalmente en la cual se muestra la relación entre la absorbancia y peso seco presentada con su respectiva ecuación lineal, la cual servirá para poner la absorbancia en términos de concentración de la biomasa.

Gráfica 2. Curva de calibración cepa 10.



Fuente: elaboración propia

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

Ecuación 9. Ecuación de curva de calibración

$$Y(Abs) = 0.0007 * X\left(\frac{mg}{L}\right)$$

Utilizando esta ecuación se puede determinar, mediante medidas de absorbancia, el peso seco.

Por medio del coeficiente de correlación lineal de 0.9725 se puede afirmar que los puntos de dispersión en la gráfica se ajustan a una regresión lineal y por tanto los datos guardan una correlación directamente proporcional.

5.1.4. Curvas de crecimiento microbiano. Se establecieron las curvas de crecimiento para cada una de las cepas expresadas en concentración de masa seca determinado mediante una curva de calibración para relacionar peso seco de las bacterias con medidas de absorbancia; esto con el fin de seleccionar las cepas, que basadas en el crecimiento, conformarán el cultivo mixto microbiano sobre el cual se evaluará el sustrato sintético de ácido acético en solución melaza.

A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 10**, se construye la **gráfica 3**, en donde se puede observar como es el cambio de la concentración de la biomasa en función del tiempo determinado experimentalmente para cada cepa.

Como se puede observar algunas cepas tuvieron mayor crecimiento frente a otras por lo que se dividió la gráfica en dos grupos para un mejor análisis, en donde se presentan las curvas con comportamiento de mayor crecimiento (**gráfica 4**) y otra gráfica en donde se encuentran las curvas con comportamiento de menor crecimiento (**gráfica 5**).

Para las curvas de crecimiento para cada una de las cepas (**gráfica 3**) No se presentó fase de adaptación a las condiciones del medio que los rodeaba probablemente a que los pre-inóculos y el medio del inóculo de las cepas estaban sembrados en el mismo medio compuesto por agar nutritivo y glucosa, cultivado por 24 horas (medio de cultivo joven) y esto probablemente provocó que no se observará fase de latencia.

Sin embargo hubo una alteración en las condiciones de crecimiento que posiblemente conllevaría a una fase de latencia corta en el que el microorganismo adaptará el pH externo con respecto al intracelular¹⁰⁶, ya que se requería que las cepas crecieran a un pH de 5, el pH del inóculo se ajustó a 5.5 y el medio del pre-inóculo en el que estaban las cepas se encontraba a pH 7.0 ± 0.1 ; pero debido a las aproximaciones del método de recuento empleado correspondiente al método turbidimétrico, en el que se realizó una curva de calibración para relacionar la densidad óptica con el peso seco de los microorganismos, las bacterias trabajan internamente adaptándose al medio aumentando su masa celular pero no el número de células, por lo que la fase de latencia usualmente es difícil de determinar por medio de esta técnica¹⁰⁷.

En la **tabla 15** se muestran los tiempos de duración de las fases de crecimiento microbiano para cada una de las cepas.

¹⁰⁶ RODRÍGUEZ VARGAS, María Rosa. Variabilidad De La Inactivación Microbiana Y De La Fase De Latencia De Los Microorganismos Supervivientes a Un Proceso De Acidificación. Universidad Complutense de Madrid, 2016. p. 261

¹⁰⁷BENINTEDE Silvia y SANCHEZ Cecilia. Crecimiento Bacteriano. En: Universidad Nacional De Colombia. 2013. p 8

Tabla 15. Tiempo de duración de las fases de crecimiento microbiano para cada una de las cepas.

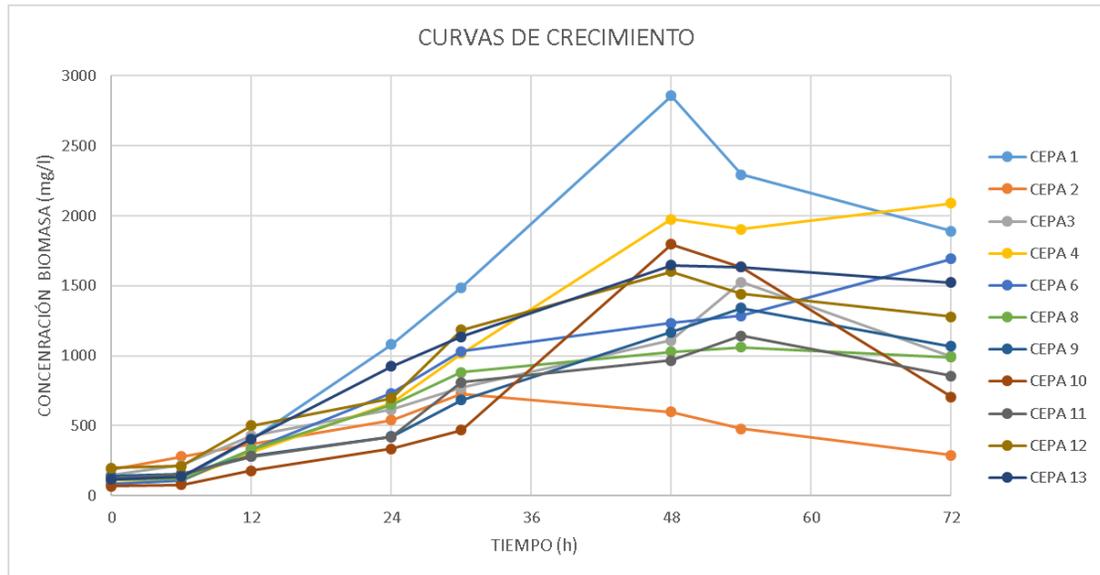
Cepa	Tiempo duración fases (h)		
	Crecimiento exponencial	Declinación del crecimiento	Endógena
1	0-48	-	48-72
2	0-30	-	30-72
3	0-54	-	54-72
4	0-48	48-72	-
6	0-30	30-54	54-72
8	0-30	30-72	-
9	0-54	-	54-72
10	0-48	-	48-72
11	0-54	-	54-72
12	0-48	-	48-72
13	0-48	48-72	-

Fuente: elaboración propia

Para la conformación del cultivo mixto, se requirió que la concentración de la biomasa sea mayor en un menor tiempo, por ello se trabajó en la fase exponencial, ya que, en esta fase se puede observar la capacidad que tienen las bacterias para crecer constante y rápidamente¹⁰⁸. Sin embargo, se necesitó tener un rango del tiempo del crecimiento exponencial en el que esté cada una de las cepas, debido a que, en este tiempo varía para cada una de ellas; por ello se tomó un tiempo de análisis de 0-30 horas, dado que, en un tiempo superior a 30 horas algunas cepas podrían encontrarse en fase de declinación del crecimiento o en fase endógena.

¹⁰⁸ CALDERÓN VARGAS Juan Fernando. Op cit. p. 78

Gráfica 3. Curvas de crecimiento para cada cepa



Fuente: elaboración propia

Para determinar las velocidades de formación de la biomasa de las **gráficas 4 y 5** se empleó la **Ecuación 1** en donde se estudia la concentración de la biomasa como una función del tiempo; para la investigación se trabajaron los cálculos en la fase exponencial ya que en esta fase se puede observar la capacidad que tienen las bacterias para crecer constante y rápidamente¹⁰⁹, tomando la fuente de carbono que se suministre, por lo que se puede evidenciar el comportamiento de adaptación del microorganismo en determinado sustrato, importante al momento de describir la cinética de crecimiento bacteriano.

Por otro lado, se pudo observar de manera rápida y sencilla que las cepas posiblemente no presentaron contaminación ya que, al comparar las tinciones de Gram realizadas, para la caracterización microscópica de los microorganismos, mostradas en la tabla 7, con las tinciones de Gram realizadas para la curva de crecimiento para cada una de las bacterias, se observó que las morfologías y las agrupaciones fueron similares.

También se observó en las tinciones de Gram para la curva de crecimiento de cada una de las cepas, con el paso del tiempo los tamaños de los bacilos aumentaron como se observa en el cuadro 3.

La **ecuación 2** describe el comportamiento de la concentración con respecto al tiempo, compuesta por dos parámetros constantes μ (h^{-1}) y X_0 (mg/L), al linealizar

¹⁰⁹ Ibíd. p. 78

la función exponencial se obtiene una ecuación en donde la pendiente va ser igual a μ en h^{-1} y el intercepto va ser $\ln X_0$ (mg/L)¹¹⁰.

Las gráficas correspondientes a las linealizaciones se muestran en el **ANEXO J** y en la **tabla 16** se presentan las velocidades específicas de crecimiento y la biomasa máxima alcanzada de biomasa obtenidas para cada una de las cepas con su respectiva correlación lineal R^2 , obteniendo que las dispersiones de los datos tienen un buen ajuste a una regresión lineal.

Tabla 16. Velocidades específicas de crecimiento y biomasa máxima

CEPA	μ (h^{-1})	R^2
1	0,0932	0,9585
2	0,0426	0,9826
3	0,0551	0,9438
4	0,0857	0,9658
6	0,0874	0,9597
8	0,0732	0,9517
9	0,0529	0,9661
10	0,0676	0,9697
11	0,0606	0,9698
12	0,0597	0,9381
13	0,0822	0,9512

Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 4** se puede observar las cepas en las que se obtuvieron comportamientos mayores de concentraciones de biomasa, en comparación con los comportamientos de concentraciones mostradas en la **gráfica 5**.

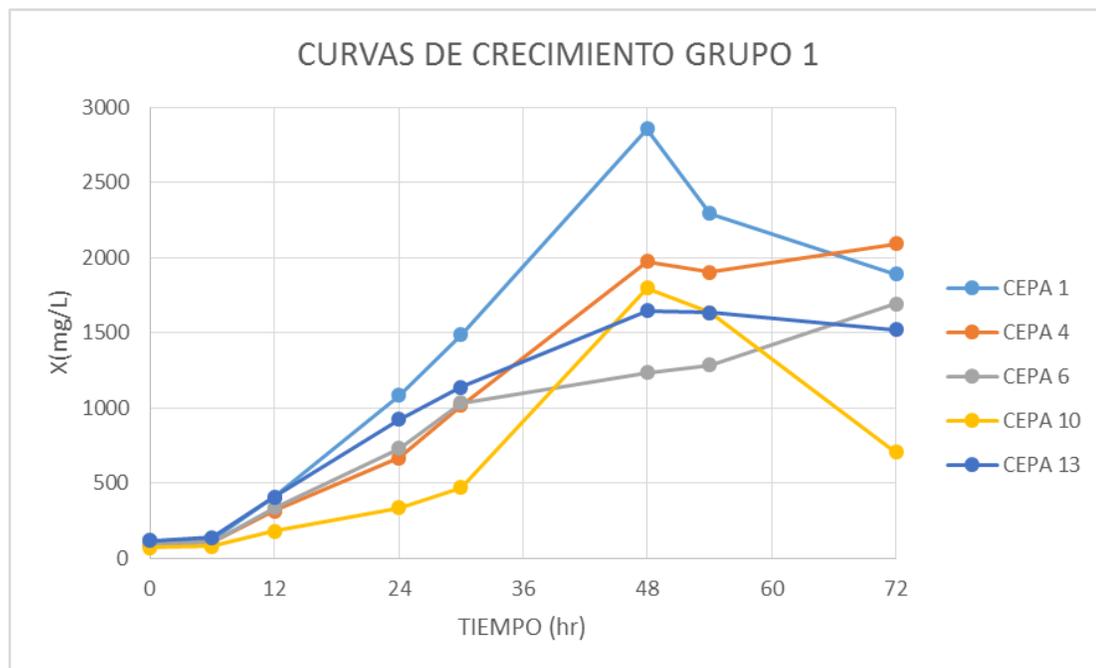
Como se mencionó anteriormente el tiempo de análisis abarca las primeras 30 horas de incubación, observando en dicho intervalo que las cepas 1, 4, 6, 10 y 13 presentan un comportamiento de crecimiento similar de mayor concentración de biomasa, en el que las velocidades de formación fueron altas (tabla 16) lo que indica que la velocidad total de toda la serie de reacciones, en virtud de las cuales se sintetizan las substancias celulares es mayor y por tanto lo es su capacidad de crecimiento con el paso del tiempo. Además, las cepas 1, 4, 10 y 13, que presentaron una concentración de biomasa mayor en las 30 horas, tuvieron una fase exponencial que dura aproximadamente hasta las 48 horas, tiempo en el que la concentración de la biomasa siguió por encima de las demás cepas. Por tanto, se seleccionaron este grupo de cepas (1, 4, 6, 10 y 13) para la conformación del cultivo mixto.

¹¹⁰ CALDERÓN VARGAS Juan Fernando. Op cit. p. 78

Las cepas 4 y 6 como se mencionó en la sección 5.1.1, al ser Gram negativas presentan endotoxinas en la membrana celular, sin embargo, estas cepas fueron tenidas en cuenta para la conformación del cultivo mixtos por ello se recomienda que de ser extraído el biopolímero no sea usado para aplicaciones en el área biomédica.

Para la selección de las bacterias que conformaron el cultivo mixto microbiano se escogieron este grupo de cepas (cepas 1,4,6,10 y 13) ya que presentaron un comportamiento similar en cuanto a su crecimiento y alcanzaron concentraciones máximas y velocidades de formación altas (tabla 16), lo que indica que la velocidad total de toda la serie de reacciones, en virtud de las cuales se sintetizan las sustancias celulares es mayor y por tanto lo es su capacidad de crecimiento con el paso del tiempo.

Gráfica 4. Curva de crecimiento Cepas grupo 1.



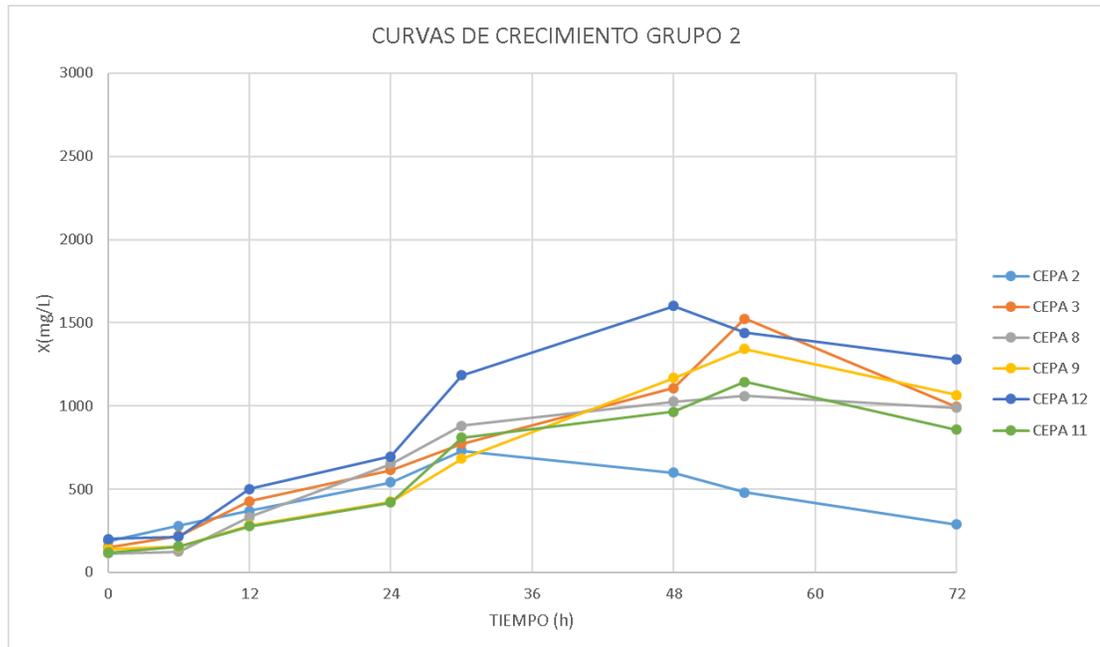
Fuente: elaboración propia

En la **gráfica 5** se puede observar las cepas en las que se obtuvieron menores concentraciones de biomasa en comparación con las concentraciones mostradas en la **gráfica 4**.

Estas cepas debido a su baja concentración en la biomasa y velocidades específicas de crecimiento, no se seleccionaron para conformar el cultivo mixto sobre el que se realizará el estudio de los parámetros cinéticos en medio sintético

de ácido acético en solución melaza, ya que se requieren cepas que tengan una alta generación de biomasa.

Gráfica 5. Curvas de crecimiento cepas grupo 2.



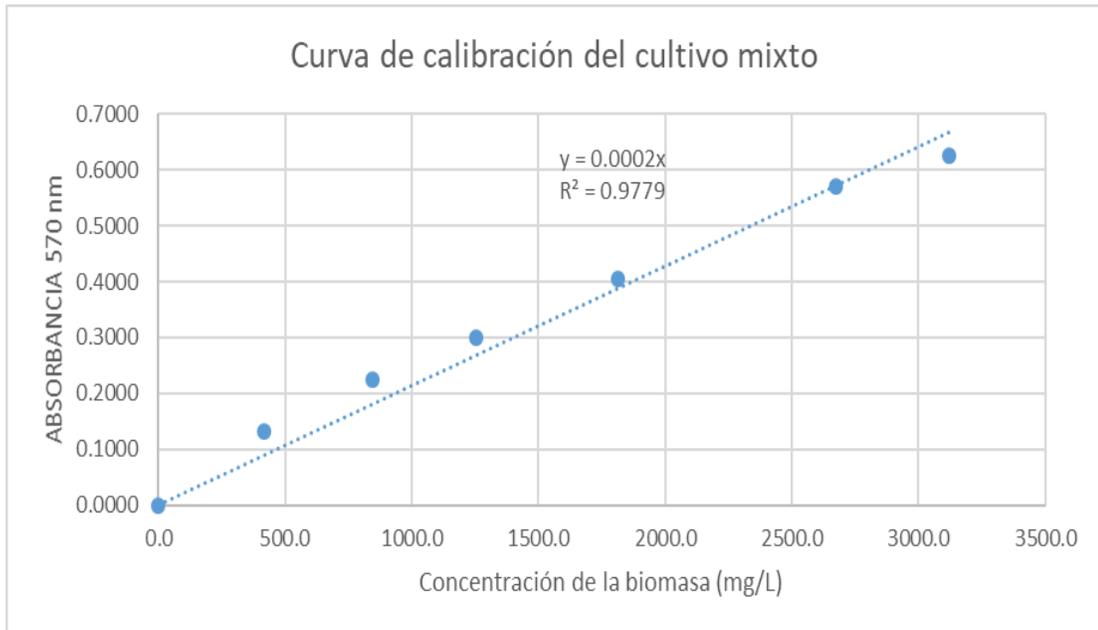
Fuente: elaboración propia.

5.2. CRECIMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIOS SINTÉTICOS

5.2.1 Curva de calibración cultivo mixto. Se realizó una curva de calibración con el fin de representar el cultivo mixto microbiano conformado por las cepas 1, 4, 6, 10 y 13 en términos de masa seca microbiana midiendo la absorbancia del medio de cultivo a 570 nm y determinando el peso seco empleando el método gravimétrico. Se realizó por triplicado.

A partir de los datos obtenidos en la **Tabla 9**, se construye **gráfica 6**, en donde se puede observar la curva de calibración del cultivo mixto obtenida experimentalmente en la cual se muestra la relación entre la absorbancia y peso seco del cultivo mixto microbiano presentada con su respectiva ecuación lineal, la cual servirá para poner la absorbancia en términos de concentración de la biomasa del cultivo mixto microbiano conformado.

Gráfica 6. Curva de calibración del cultivo mixto microbiano.



Fuente: elaboración propia

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

Ecuación 10. Ecuación de la línea para el cultivo mixto

$$Y(Abs) = 0.0002 * X\left(\frac{mg}{L}\right)$$

Utilizando esta ecuación se puede determinar, mediante medidas de absorbancia, el peso seco.

Por medio del coeficiente de correlación lineal de 0.9779 se puede afirmar que los puntos de dispersión en la gráfica se ajustan a una regresión lineal y por tanto los datos guardan una correlación directamente proporcional.

5.2.2 Cinética cultivo mixto microbiano medios sintéticos. Se evaluó el cultivo mixto microbiano conformado por las cepas 1,4,6,10 y 13 en medios sintéticos de ácido acético en solución melaza al 10%, 15% y 20% respectivamente para una DQO total de aproximadamente 1600 mg/L, para ello se utilizó el método turbidimétrico, realizando previamente una curva de calibración a el cultivo mixto para relacionar las medidas de densidad óptica con la concentración de la biomasa del cultivo mixto dado por la Ecuación 10 y paralelamente se determinó el consumo de sustrato por el método de colorimetría de DQO (ANEXO K).

Se empleó esta técnica para realizar un monitoreo a las fuentes de carbono presentes en el medio, melaza y ácido acético. Para la medición del consumo de sustrato en los medios sintéticos, no se monitoreo las fuentes de carbono por separado, debido a que para realizar el seguimiento a el consumo de AGV's, empleando las técnicas usadas en el laboratorio correspondientes a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹¹¹ y titulación de AGV's¹¹², se presentaron inconvenientes, la columna cromatográfica del equipo se encontraba dañada, y no se tenía la cantidad necesaria de reactivo para llevar a cabo el muestreo, respectivamente. Por otro lado, para el monitoreo de los azúcares reductores presentes en la melaza, para realizar la técnica DNS¹¹³, no se tenían los reactivos (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para llevar a cabo la técnica; es por ello que únicamente se midió la demanda química de oxígeno¹¹⁴.

Al analizar el sustrato inicial para los tres medios de cultivo, se evidencia que hay un incremento del sustrato experimental en comparación con el sustrato teórico (1600 DQO mg/L), esto pudo suceder por el prolongamiento del tiempo de esterilización, el cual provocó la caramelización de los azúcares y concentración de los mismos, razón por la cual se encuentran valores experimentales superiores en comparación al sustrato inicial teórico¹¹⁵.

Tomando los datos determinados experimentalmente correspondientes a el crecimiento de la biomasa y el consumo de sustrato (**ANEXO K**) se obtienen las **gráficas 7, 8 y 9** en donde se observa como es el crecimiento del cultivo mixto microbiano conformado por las cepas 1,4,6,10 y 13; en el sustrato sintético de 10%, 15% y 20% de ácido acético en solución melaza, respectivamente, así como también se observa el consumo de sustrato, el seguimiento de pH y el seguimiento semi-cuantitativo de la acumulación de PHA, en función del tiempo.

Es posible notar que, para las tres curvas del crecimiento microbiano, empiezan desde la fase exponencial, esto posiblemente se debe a que se preparó un pre-inóculo 24 horas antes de iniciar el experimento (en medio sintético de solución melaza a 1600 mg DQO/L); esto se realizó para dar comienzo a la fase de adaptación y evitar contratiempos en el proceso.

¹¹¹ MORA, Carlos Eduardo. Op cit. p. 55

¹¹² FONSECA AMAYA, Liseth Camila y SANCHEZ BEDOYA, Op cit. p. 122.

¹¹³ FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Op cit. p. 120.

¹¹⁴ ORTEGÓN VELANDIA, María Fernanda. Op cit. p. 84

¹¹⁵ FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Op cit p 120.

5.2.2.1 Medio 1- 10% DQO H. Ac en solución melaza. En la Gráfica 7 se puede observar cómo es el crecimiento del cultivo mixto microbiano conformado por las cepas 1, 4, 6, 10 y 13; en el cual se puede identificar que la fase de crecimiento exponencial tiene una duración aproximada de 36 horas desde el inicio del experimento, en donde la biomasa aumenta progresivamente, para el medio 1 correspondiente a 10% DQO H. Ac en solución melaza (ANEXO K). en esta misma grafica se observa que el consumo de sustrato al compararlo con el crecimiento microbiano, se tuvo que al igual que el crecimiento exponencial, en el que los constituyentes celulares de la bacteria aumentan, el consumo del sustrato se da hasta las 36 horas considerablemente, siendo este el tiempo en el que se registra el mayor consumo de sustrato correspondiente a aproximadamente 29 mg DQO/L, este alto consumo se debe a que en dicho tiempo la bacteria tiene el mayor incremento de biomasa correspondiente a 590 mg/L en peso seco, por lo que toma del medio la fuente de carbono para llevar a cabo el crecimiento microbiano.

En la **Gráfica 8**, el comportamiento del pH pasó de 5.5 a 5 en las primeras 12 horas y posteriormente se mantuvo constante hasta las 36 horas, por lo que se puede afirmar que el ácido orgánico se mantuvo en su distribución ácida, debido a que, posiblemente la transferencia para satisfacer la tasa de respiración de los microorganismos fue insuficiente, lo que limitó el consumo de AGV manteniendo por ende el pH ácido¹¹⁶.

También, por medio de la **Gráfica 8**, se puede observar la acumulación semi-cualitativa del PHA¹¹⁷, el cual al inicio del experimento presenta producción de inclusiones citoplasmáticas, esto se debe a que se realizó un pre-inóculo, por lo que, los microorganismos almacenaron intracelularmente el biopolímero y esto se ve reflejado al momento de realizar el primer muestreo; Posteriormente se observa que la acumulación de PHA se incrementa gradualmente hasta transcurridas 24 horas del inicio del experimento; entre las 24 y 36 horas no se observa una acumulación de PHA considerable.

Posteriormente se observa una fase de declinación en el crecimiento (Gráfica 7) comprendida entre las 36 y 60 horas, en el que paralelamente se tiene una caída considerable de pH que pasa de 5 a aproximadamente 4, por lo que posiblemente este factor influyó en el crecimiento de los microorganismos provocando una disminución en el incremento de la biomasa, pasando de 590 mg/L a 270 mg/L en el intervalo de tiempo entre las 36 y 48 horas y posteriormente pasando de 270 mg/L a 160 mg/L entre las 48 y 60 horas. Por otra parte, hubo un leve consumo de sustrato entre las 36 y 60 horas, tiempo en el que disminuye el aumento de la concentración de la biomasa, presentando un crecimiento lento, por lo, que el

¹¹⁶ MONTAÑO HERRERA, Liliana. Op cit. p 105

¹¹⁷ PORRAS, Mauricio A.; VILLAR, Marcelo A. and CUBITTO, María A. Op cit, p. 28-32

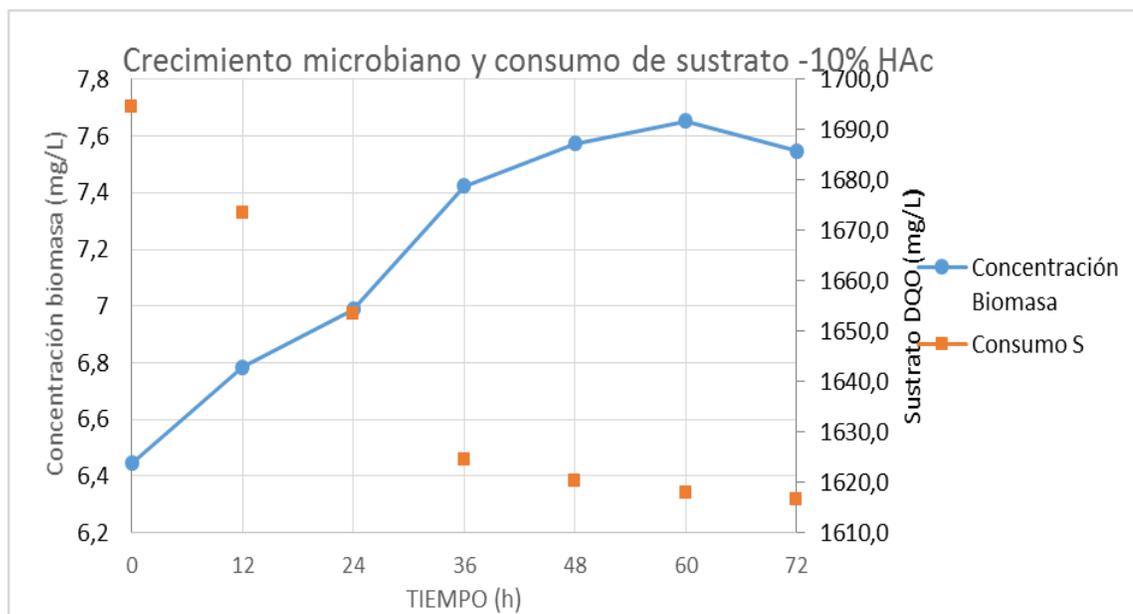
consumo de sustrato es mínimo, correspondiente a aproximadamente el 8.5% del consumo total del sustrato.

La acumulación semi-cualitativa del PHA entre las 36 y 60 horas obtiene su máxima acumulación, evidenciada a las 48 horas, en donde las bacterias presentan una disminución en su crecimiento, por lo que las bacterias posiblemente emplearon una cantidad considerable del sustrato que consumieron, como reserva de energía (PHA), posteriormente se observa que hubo un consumo de PHA.

Finalmente, se observa una fase endógena pasadas 60 horas del inicio del experimento, en el que se observa que el pH se mantuvo ácido y a su vez se observó que hay una disminución en la acumulación de PHA, posiblemente alguna minoría de microorganismos lo consumen para mantenimiento celular. Posterior a las 60 horas se puede observar que no hay un consumo de sustrato significativo, se consume cerca del 1.7% del consumo de sustrato total.

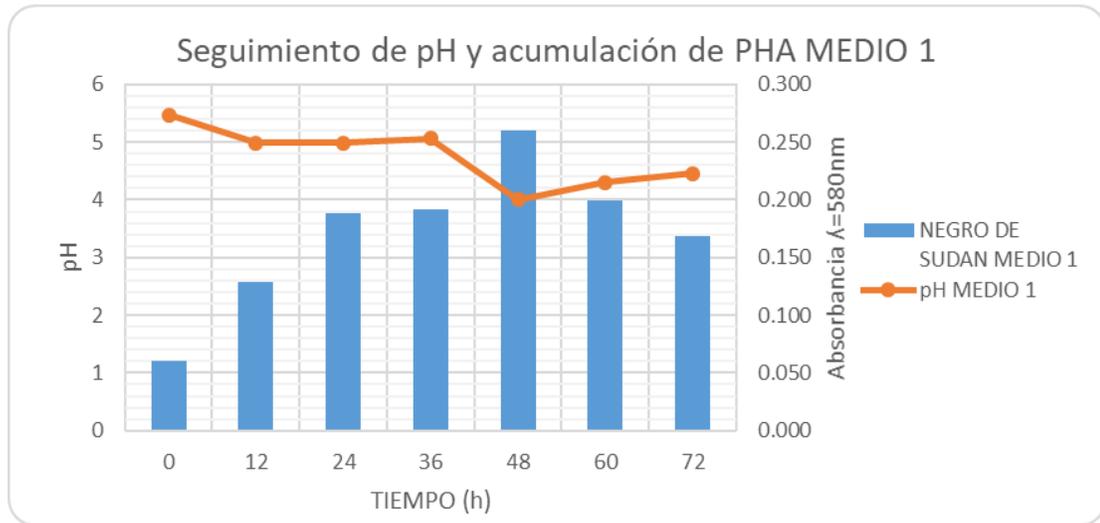
El consumo de sustrato total fue de aproximadamente 5%.

Gráfica 7. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo, 10% H.Ac



Fuente: elaboración propia

Gráfica 8. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-10% DQO H.Ac



Fuente: elaboración propia.

5.2.2.2 Medio 2- 15% DQO H.Ac en solución melaza. En la Gráfica 9 se observa el crecimiento del cultivo mixto microbiano conformado por las cepas 1, 4, 6, 10 y 13 en un medio de cultivo compuesto por 15% de H. Ac en solución melaza. Es posible notar que la fase de crecimiento exponencial se da transcurridas 36 horas del inicio del experimento para el medio de cultivo, tiempo en el que se observó el aumento de la biomasa gradualmente. En este intervalo de tiempo se observó mediante la Gráfica 10, el comportamiento del pH manteniéndose constante transcurridas 36 horas del inicio del experimento con un valor de aproximadamente 5.5, por lo que, en este periodo de tiempo se encuentra en su distribución ácida. Por otra parte, se evidencia que en las primeras 12 horas se presenta una acumulación semi-cualitativa considerable, mientras que en el lapso entre 12 y las 36 horas las inclusiones citoplasmáticas se encuentran constantes. Por otro lado, al comparar el consumo de sustrato con el crecimiento microbiano del co-cultivo se observa que, en la fase de crecimiento exponencial se consume una cantidad considerable del sustrato hasta transcurridas 36 horas del inicio del experimento, en este tiempo la fase de crecimiento exponencial llega a su fin; el mayor incremento de consumo de sustrato en el experimento está comprendido dentro de este periodo, ubicado temporalmente entre las 12 y 24 horas, correspondiente a un consumo de 54 mg DQO/L, esto se debe probablemente a que en este intervalo de tiempo se da el mayor incremento de concentración de biomasa de aproximadamente 1265 mg/L en peso seco.

Posteriormente se observa una fase de declinación en el crecimiento corta entre las 36 y 48 horas y luego nuevamente se evidencia crecimiento entre las 48 y 60 horas, esto se pudo presentar debido a que el pH del medio pasa de 5.5 hasta 6.3 entre las 36 y 48 horas, este cambio en las condiciones de crecimiento posiblemente haya generado una corta fase de adaptación a las nuevas

condiciones del medio y posteriormente al alcanzar un pH neutro entre las 48 y 60 horas, esto pudo favorecer el crecimiento de los microorganismos.

El aumento del pH se pudo presentar porque el acetato presenta una actividad amortiguadora por lo que puede llegar a controlar el pH. En un estudio realizado, evaluaron la capacidad del acetato y el fosfato para controlar el pH durante la fermentación, encontrando que el acetato es un tampón más fuerte que el fosfato, y obteniendo a su vez que el pH aumentó al aumentar las concentraciones de acetato, en donde este actúa como un sistema de amortiguación interno.¹¹⁸

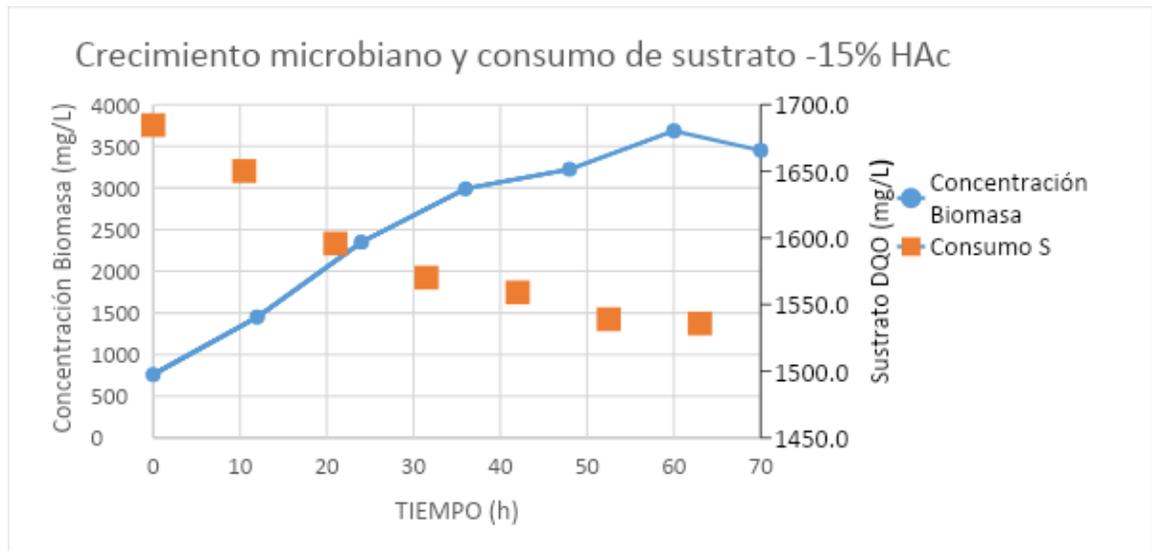
Por otra parte, al observar en la acumulación semi-cualitativa del PHA entre las 36 y 48 horas, se observa que se alcanzó casi el doble de la acumulación reportada a las 36 horas, posiblemente porque el cambio de pH favoreció el almacenamiento intracelular de PHA; posterior a las 48 horas se observa que la acumulación de PHA no tuvo variaciones.

Con respecto al consumo del sustrato, entre las 36 y 48 horas se observó que hubo un leve consumo de sustrato, debido posiblemente los microorganismos lo utilizaron para acumular PHA intracelularmente. Posterior a esto, se observó nuevamente consumo de sustrato apreciable entre las 48 y 60 horas debido a que los microorganismos consumen una mínima cantidad de sustrato del medio para el crecimiento de los microorganismos.

Finalmente, a las 60 horas se evidencia una fase endógena, en donde, para el consumo del sustrato se observó que pasadas 60 horas no hay cambio aparente en el consumo de sustrato. El consumo de sustrato total para el medio correspondiente a 15% mg DQO/L de H.Ac en solución melaza, fue de 8.8%

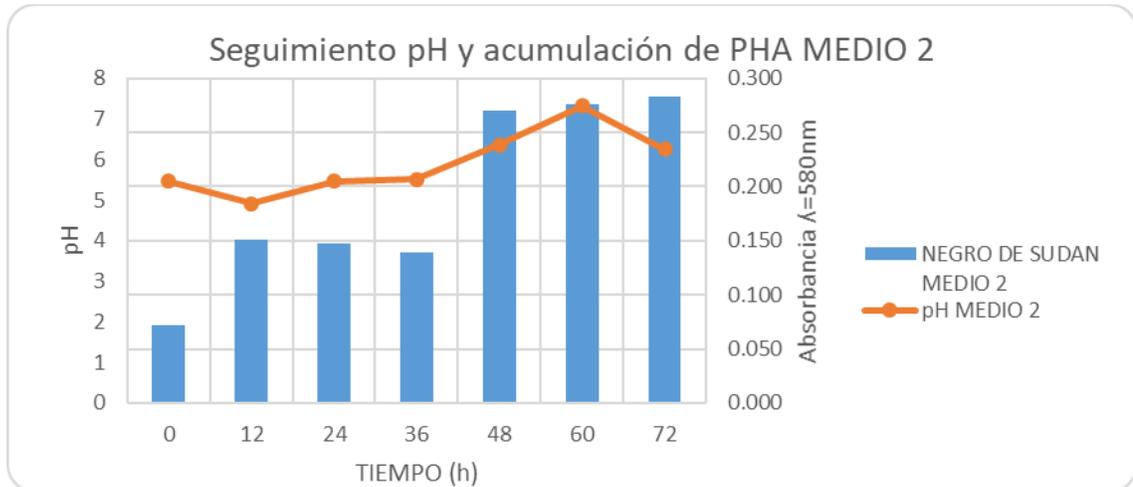
¹¹⁸ XU, Ji Fei; MI, Yuan-Ting y REN, Nan-Qi. Buffering action of acetate on hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49. En: *Electronic Journal of Biotechnology*. Sep 2016,. vol. 19, no. 5, p. 2-11

Gráfica 9. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo, 15%DQO H.Ac



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 10. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-15% DQO H.Ac



Fuente: elaboración propia.

5.2.2.3 Medio 3 - 20% DQO H. Ac en solución melaza. En la Gráfica 11 se presenta el crecimiento microbiano y el consumo de sustrato correspondiente al medio del 20% DQO de ácido acético en solución melaza. Es posible observar que al igual que en los medios de 10% y 15% de ácido acético en solución melaza, la fase de crecimiento exponencial se presentó hasta transcurridas 36 horas del inicio del experimento y que el seguimiento del pH en las primeras 36 horas, mostrado en la Gráfica 12, se mantiene constante en un pH aproximado de 5.3; También se observó que la acumulación semi-cualitativa del PHA aumenta paulatinamente desde el inicio del experimento hasta las 36 horas.

Por otro lado, el consumo de sustrato se da en mayor medida transcurridas 36 horas del inicio del experimento, debido a que, en dicho periodo de tiempo tuvo lugar la fase de crecimiento exponencial, siendo en este intervalo de tiempo en donde se consumió más cantidad de sustrato en el experimento, correspondiente a un consumo de 68.8 mg DQO/L entre las 12 y 24 horas, esto se debió, probablemente a que en este periodo de tiempo se da el mayor incremento de concentración de biomasa de aproximadamente 1040 mg/L en peso seco.

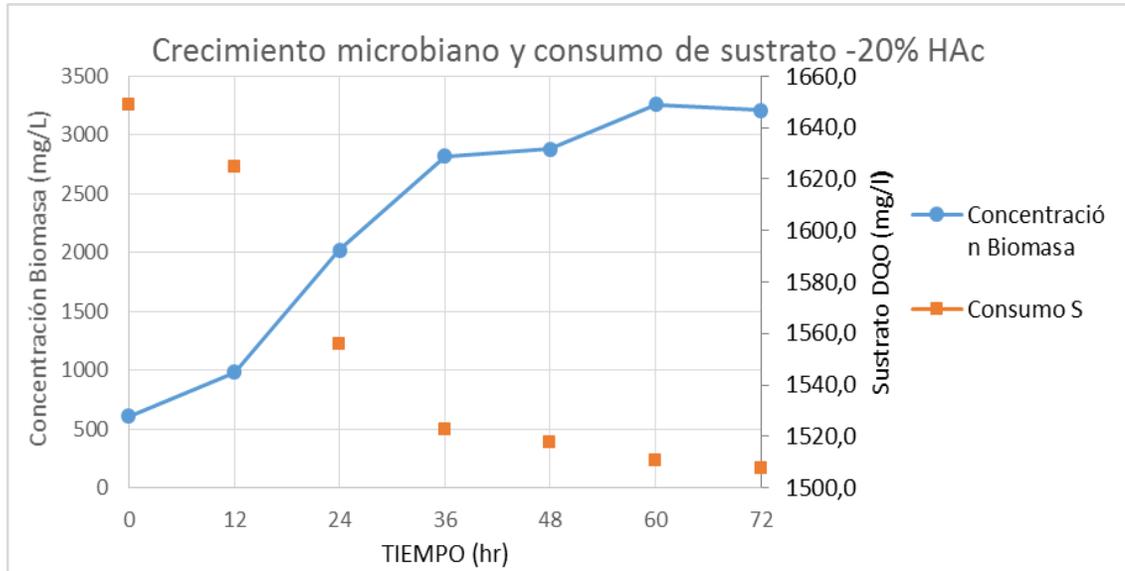
Después, se presentó una corta fase de declinación en el crecimiento de 36 a 48 horas, seguido nuevamente por una fase de crecimiento de 48 a 60 horas, esto se debió a, como ya se explicó anteriormente para el medio de 15% de H. Ac en solución melaza, el acetato actuó como amortiguador por lo que el pH tuvo un incremento pasando de 5.3 a 6 y de 6 a 6.4 en los periodos de tiempo comprendidos entre las 36 a 48 horas y 48 a 60 horas, respectivamente; este cambio en el pH posiblemente ocasionó que los microorganismos presentaron una corta fase de adaptación entre las 36 y 48 y posteriormente continuaron creciendo hasta las 60 horas.

Para el consumo del sustrato, entre las 36 y 48 horas se observó que hubo un leve consumo de sustrato, debido posiblemente a que los microorganismos lo utilizaron para acumular PHA intracelularmente, identificando, que en las 48 horas se registra la mayor acumulación de PHA. Posterior a esto, el consumo de sustrato fue apreciable entre las 48 y 60 horas.

Finalmente, de las 60 a 72 horas se evidenció que hay una fase endógena, en donde, hubo un consumo de sustrato despreciable de apenas de apenas 3 mg DQO/L, equivalente al 2.3% del consumo total del sustrato.

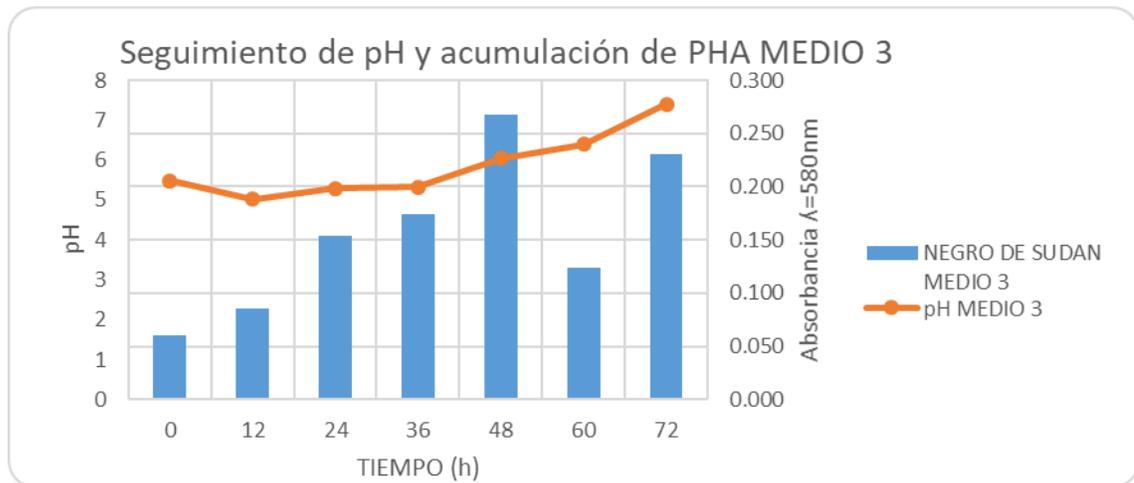
El consumo total sustrato del medio 3 correspondiente a 20% mg DQO/L de H.Ac en solución melaza fue de 8.6%.

Gráfica 11. Crecimiento microbiano y consumo de sustrato en función del tiempo, 20% DQO H.Ac



Fuente: elaboración propia.

Gráfica 12. Seguimiento de pH y acumulación de PHA-20%DQO H. Ac



Fuente: elaboración propia.

5.2.3. Comparación medios sintéticos. En la Gráfica 13 se observa una comparación entorno a los tres medios de cultivo sintético 10%, 15% y 20% de ácido acético en solución melaza, en cuanto a su crecimiento microbiano, consumo de sustrato, control semi-cualitativo de la acumulación del PHA por medio de la técnica de tinción de Negro Sudán y el seguimiento del pH.

Se puede observar que, en cuanto al crecimiento, el medio sintético que tuvo un comportamiento de crecimiento microbiano mayor fue el medio 2, correspondiente

a 15% H. Ac en solución melaza, seguido por el medio 3, 20% H. Ac en solución melaza y por último el medio 1, 10% H. Ac en solución melaza, en donde se alcanza una biomasa máxima de 2990 mg/L, 2820 mg/L y 1675 mg/L, respectivamente en la fase de crecimiento exponencial.

El pH para los tres medios, en las primeras 36 horas del experimento, tiempo en el que es posible observar la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos, mantienen un pH aproximado de 5 en el medio 1 y de 5.5 en el medio 2 y 3; sin embargo, como ya se mencionó, en el medio en el que se aprecia mayor crecimiento de la biomasa es en el medio 2, seguido por el medio 3 y por último el medio 1, en donde el consumo de sustrato fue de 114.4 mg DQO/L, 126. mg DQO/L y 70 mg DQO/L, respectivamente, esto se pudo presentar debido a que la tasa de transferencia de respiración fue mejor en el medio 2 por lo que los microorganismos pudieron consumir los AGV y esto se ve reflejado en el crecimiento microbiano en el medio de cultivo; también a que el acetato actuó como amortiguador por lo que el pH tuvo un incremento en los medios de cultivo 2 y 3, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos y el consumo de sustrato.

Después de transcurridas 36 horas del inicio del experimento, los medios 2 y 3 presentaron un aumento del pH significativo pasando de un pH alrededor de 5 a 6, en donde el medio 2 a las 48 horas se neutraliza; en contra posición a el medio 1, que pasadas 36 horas tiene un decrecimiento apreciable en el pH pasando de un pH cercano a 5 a un pH de 4. Este pH bajo del medio 1 posiblemente influyó en el crecimiento de los microorganismos ya que, los ácidos orgánicos débiles a pH bajos, "al no estar disociados en medio ácido, penetran en el citosol y ejercen un efecto inactivante, ya que, al acceder la forma no disociada de un compuesto ácido al citosol, como el pH de éste es prácticamente neutro, la sustancia se disocia, liberándose el anión y el protón y la célula tiene que utilizar energía para bombear los protones que acidifican el citoplasma hacia el exterior. A pH externos elevados, el ácido disociado no puede penetrar en la célula y por tanto no es efectivo"¹¹⁹. Por lo que, según lo expuesto, el medio 1 al utilizar energía, producto de la regulación del pH extracelular, posiblemente también influyó en el bajo comportamiento de crecimiento de los microorganismos, además se pudo presentar la ionización de moléculas de los nutrientes, disminuyendo la disponibilidad para el organismo.

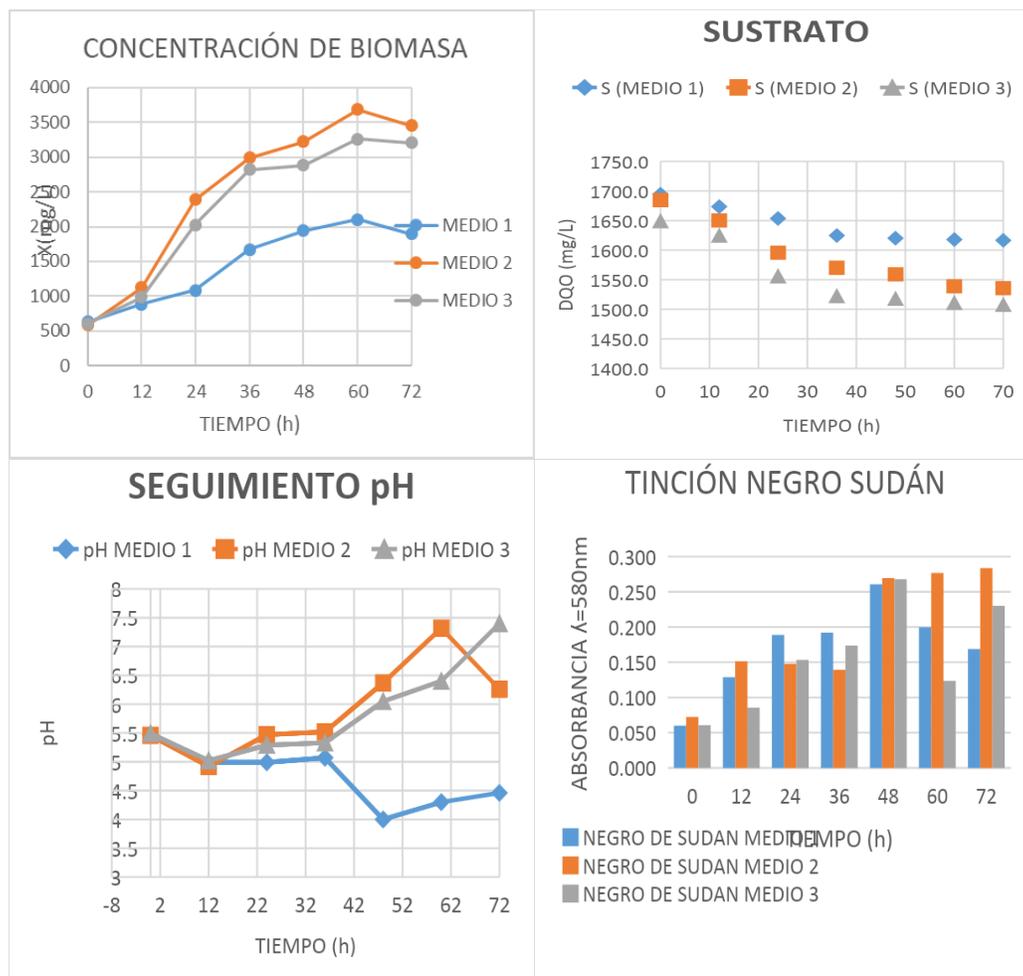
Con respecto a el control semi-cualitativo del PHA, se observó que en las primeras 36 horas del experimento la acumulación del PHA se incrementa con el paso del tiempo, alcanzando una máxima acumulación a las 48 horas, en donde el medio 2 es el que alcanza mayor acumulación, seguido muy de cerca por el medio 3 y el medio 1. Transcurridas 48 horas la acumulación de PHA disminuye para los

¹¹⁹ RODRÍGUEZ VARGAS, María Rosa. Op cit. p. 261

medios 1 y 3, pero en el medio 2 la acumulación sigue incrementándose paulatinamente hasta las 72 horas.

Se observó, que para los tres medios sintéticos de H.Ac en solución melaza correspondientes al 10%, 15% y 20%, el cultivo mixto presentó una probable acumulación durante la fase exponencial de crecimiento, por lo que los microorganismos al presentar crecimiento y acumulación de PHA en la fase exponencial, posiblemente pertenecieron al segundo grupo de bacterias productoras de PHA, que no requiere una limitación de un nutriente para llevar a cabo la acumulación; alcanzando su máxima concentración en la fase de declinación del crecimiento.

Gráfica 13. Comparación crecimiento microbiano, consumo de sustrato, control semicuantitativo de la acumulación del PHA para los medios sintéticos 10%, 15% y 20% de H Ac en solución melaza



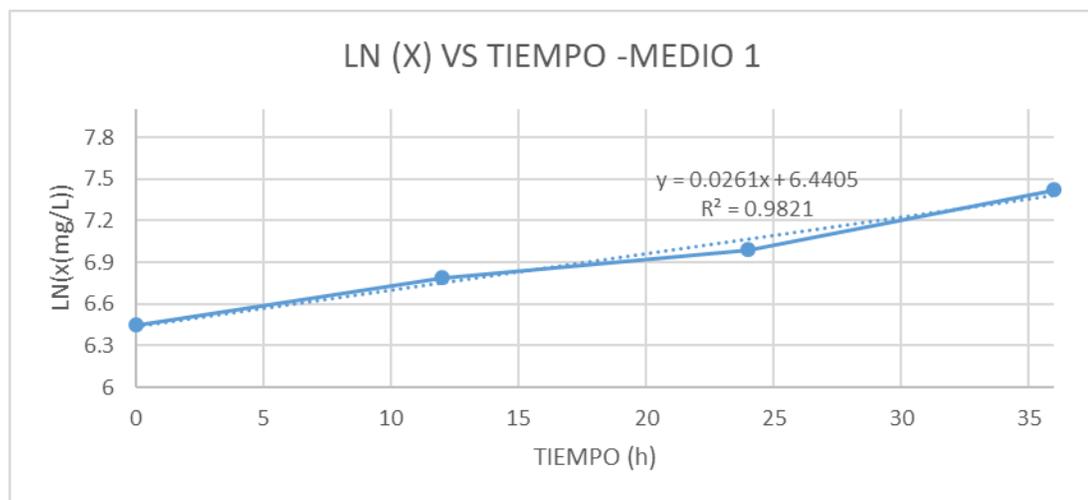
Fuente: elaboración propia

5.2.4. Parámetros cinéticos cultivo mixto, medios sintéticos. Con los datos obtenidos de las curvas de crecimiento se determinaron parámetros cinéticos, empleando el modelo de crecimiento exponencial descrito en la **sección 1.11.1.1**, modelo que se basa en Monod, seleccionado para determinar las velocidades específicas de crecimiento μ_x y los rendimientos de biomasa $Y_{x/s}$ para cada uno de los medios sintéticos correspondientes a 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución melaza en la fase de crecimiento exponencial,

El valor de μ_x se calculó gráficamente linealizando la ecuación 2, la cual describe el comportamiento de la concentración con respecto al tiempo, compuesta por dos parámetros constantes μ y X_0 que al linealizar la función exponencial se obtiene una ecuación de la recta en donde la pendiente va ser igual a μ en h^{-1} y el intercepto va ser $\ln X_0$.¹²⁰

En la **gráfica 14** se muestra la linealización de la función exponencial, del medio 1, 10% H. Ac en solución melaza; se obtuvo un R^2 de 0,9821, donde su pendiente es 0,017, correspondiente a μ y el intercepto es 6.4405 igual a $\ln X_0$. (Ver análisis tabla 17).

Gráfica 14. Determinación μ , medio 1, 10% H. Ac en solución melaza.

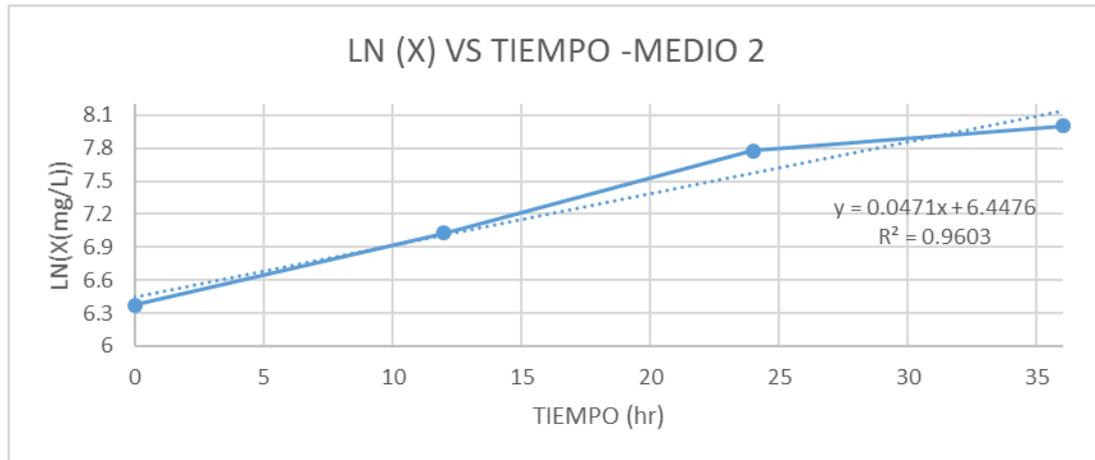


Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 15** se muestra la linealización de la función exponencial, del medio 2, 15% H. Ac en solución melaza; se obtuvo un R^2 de 0,9603, donde su pendiente es 0,0471, correspondiente a μ y el intercepto es 6.4476 igual a $\ln X_0$. (Ver análisis tabla 17).

¹²⁰ CALDERÓN VARGAS Juan Fernando. Op cit. p. 78

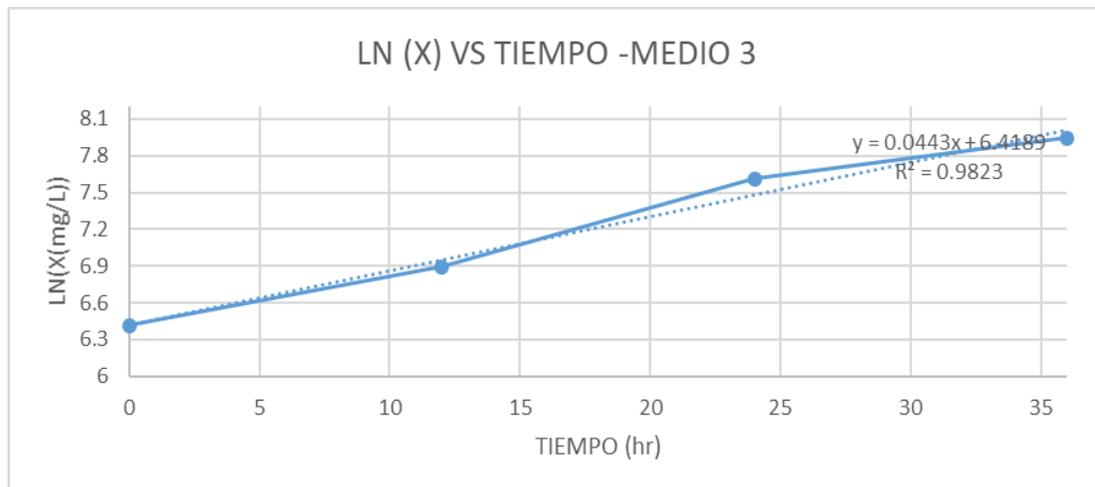
Gráfica 15. Determinación μ , medio 2, 15% H. Ac en solución melaza.



Fuente: elaboración propia.

El mismo análisis se realizó para el medio 3, 20% H. Ac en solución melaza; en la **gráfica 16** se muestra la linealización de la función exponencial, en el que se obtuvo un R^2 de 0,982, en donde su pendiente es 0,0443, correspondiente a μ y el intercepto es 6.4189 igual a $\ln X_0$. (Ver análisis tabla 17).

Gráfica 16. Determinación μ , medio 3, 20% H. Ac en solución melaza.



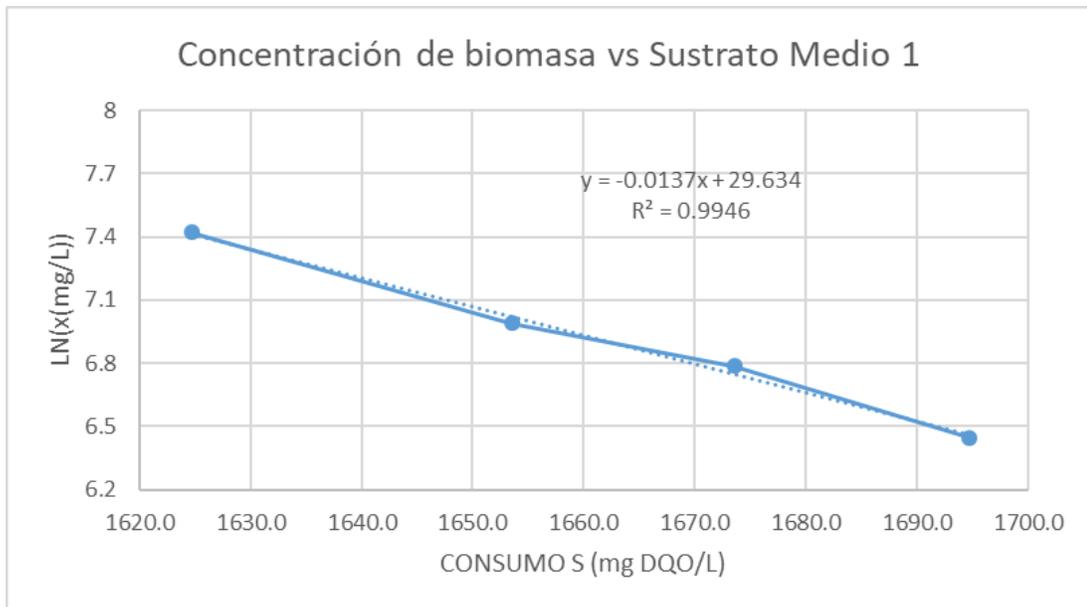
Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, el cálculo del rendimiento global de la biomasa para cada uno de los medios sintéticos correspondientes a 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución

melaza, se realizó por medio de regresión lineal en gráficas de concentración de biomasa vs concentración de sustrato¹²¹.

En la **gráfica 17** se presenta la linealización del medio 1, 10% H. Ac en solución melaza; se obtuvo un R^2 de 0,9946, donde su pendiente es 0,0137 mg DQO/mg biomasa, correspondiente a el rendimiento de la biomasa. (Ver análisis tabla 17).

Gráfica 17. Determinación Y_x/s , Medio 1, 10% H. Ac en solución melaza.

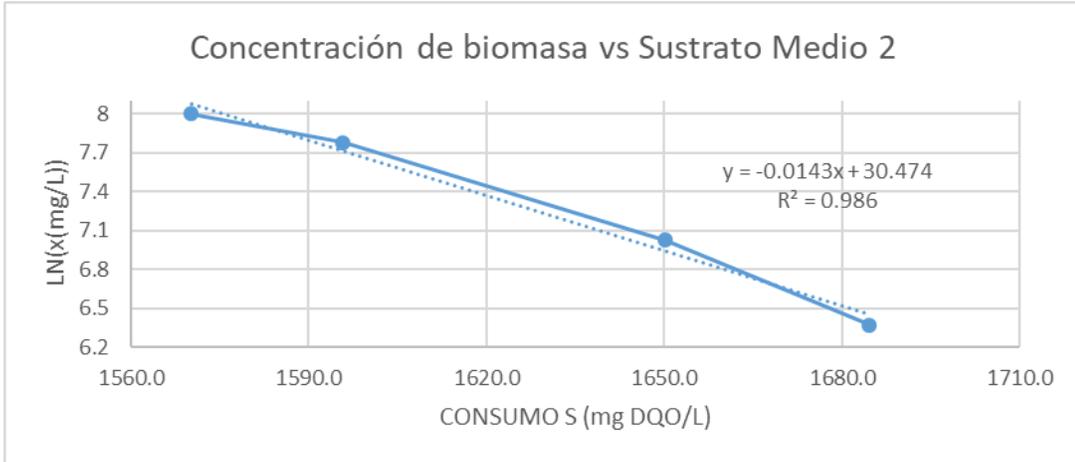


Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 18** se presenta la linealización del medio 1, 15% H. Ac en solución melaza; se obtuvo un R^2 de 0,986, donde su pendiente es 0,0143 mg DQO/mg biomasa, correspondiente a el rendimiento de la biomasa. (Ver análisis tabla 17).

¹²¹ DORAN, Pauline M. Bioprocess engineering principles. 2. ed. Amsterdam: Academic Pres, 2013. p 750

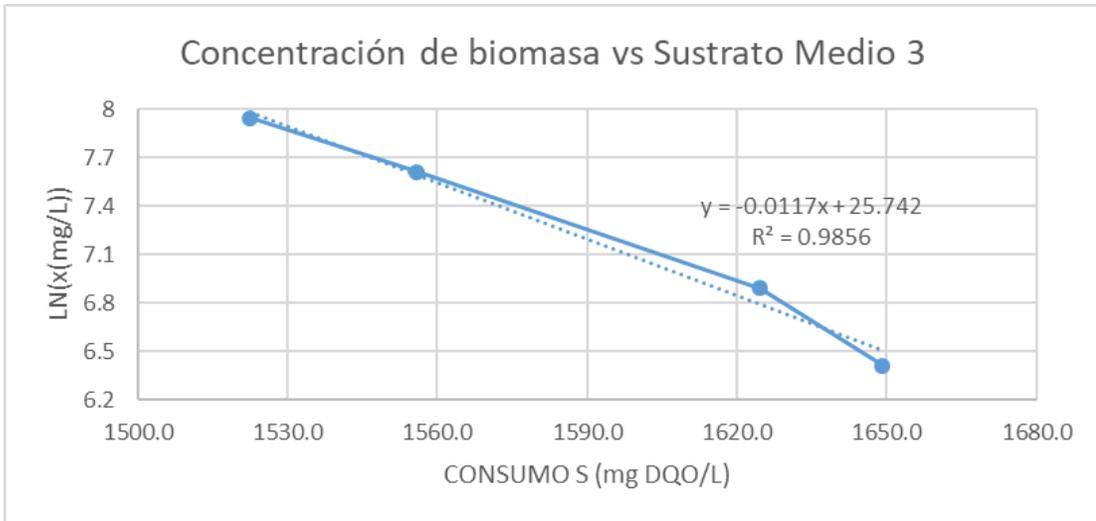
Gráfica 18. Determinación $Y_{x/s}$, Medio 2, 15% H. Ac en solución melaza.



Fuente: elaboración propia.

En la **gráfica 19** se presenta la linealización del medio 3, 20% H. Ac en solución melaza; se obtuvo un R^2 de 0,9856, donde su pendiente es 0,0117 mg DQO/mg biomasa, correspondiente al rendimiento de la biomasa. (Ver análisis tabla 17).

Gráfica 19. Determinación $Y_{x/s}$, Medio 3, 20% H. Ac en solución melaza.



Fuente: elaboración propia.

En la **tabla 17** se encuentran los parámetros cinéticos correspondientes a las velocidades específicas de crecimiento μ_x y los rendimientos de biomasa $Y_{x/s}$ para cada uno de los medios sintéticos correspondientes a 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución melaza, hallados gráficamente.

Se puede observar que el medio que alcanzó mayor velocidad específica de crecimiento y rendimiento de la biomasa en el sustrato es el medio 2, 15 % H. Ac en solución melaza, en comparación a los otros dos medios sintéticos.

Para los rendimientos biomasa – sustratos encontrados para cada medio sintético indican que en el medio 2, 15 % H. Ac en solución melaza, se forman más mg de biomasa microbiana que en los otros medios sintéticos, cuando se consume 1 mg DQO del medio. El rendimiento de la biomasa para el medio 2 corresponde a 0.0143 mg DQO/mg biomasa, seguido por el medio 1, con un valor de 0.0137 mg DQO/mg biomasa, sin embargo, el medio 2 crece casi al doble de la velocidad específica de crecimiento del medio 1. Los coeficientes de correlación del rendimiento de la biomasa en el sustrato indican al ser próximos a 1 (0.9946, 0.986 y 0.9856 para los medios 1, 2 y 3, respectivamente), que los datos experimentales se ajustan a el modelo empleado.

Por otro lado, la velocidad específica de crecimiento aumentó al aumentar la concentración en DQO del acetato de sodio y al disminuir la concentración en DQO de la melaza, encontrando la mayor velocidad de formación de biomasa, como ya se mencionó, en el medio 2, 15 % H. Ac en solución melaza con un valor de 0.0471 h⁻¹, seguido por el medio 3, 20 % H. Ac en solución melaza con un valor de 0.0443 h⁻¹, obteniendo valores próximos, sin embargo, el medio 2, por cada mg DQO consumido crece 1.22 veces más que en el medio 3.

Tabla 17. Comparación parámetros cinéticos, medios sintéticos 10%, 15% y 20% de H. Ac en solución melaza

PARÁMETRO	MEDIO 1	MEDIO 2	MEDIO 3
$\mu(h^{-1})$	0,0261	0,0471	0,0443
R ²	0,9821	0,9603	0,9823
Y _{X/S} (mg Biomasa/mg DQO)	0,0137	0,0143	0,0117
R ²	0,9946	0,986	0,9856

Fuente: elaboración propia.

5.2.5 Selección relación de sustrato. Por tanto, según lo analizado anteriormente en la sección 4.2, se tiene que el medio sintético 2, correspondiente a 15% H. Ac en solución melaza, fue el medio en el que se obtuvo un comportamiento de crecimiento mayor, alcanzando la mayor cantidad de biomasa máxima correspondiente a 3685 mg de biomasa en donde el pH alcanzó la neutralidad ya que el acetato presente en el medio sirvió como tampón químico; con un rendimiento en la biomasa mayor de 0.0143 mg DQO/mg biomasa, en donde, se forman más mg de biomasa microbiana que en los otros medios sintéticos, cuando se consume 1 mg DQO del medio.

También, se tiene que la velocidad específica de crecimiento es mayor en este medio, creciendo casi al doble de la velocidad específica de crecimiento del medio 1. Además, para el control semi-cuantitativo del PHA, se observó que el medio 2 es el que alcanza mayor acumulación cuando se alcanza la máxima acumulación a las 48 horas, incrementándose paulatinamente hasta las 72 horas.

Es por ello que el medio 2, se seleccionó para ajustar un modelo cinético para el cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA, proveniente de un sistema de lodos activados.

5.3. MODELAMIENTO CULTIVO MIXTO EN MEDIO SINTÉTICO

De acuerdo a la clasificación de los modelos cinéticos (sección 1.11), modelos estructurados y no estructurados, se realizó una revisión en la literatura sobre los modelos cinéticos no estructurados, debido a que estos modelos son sencillos y brindan una aproximación del comportamiento microbiano, considerando el sistema sin complejidad, asumiendo una distribución uniforme en el cultivo, es decir, consideran el cultivo homogéneo, por lo que generalmente usan el término población microbiana o biomasa, expresada como masa de células secas por unidad de volumen¹²².

Debido a lo expuesto en el párrafo anterior, los modelos no estructurados son útiles cuando se está en la etapa inicial de una investigación, etapa en la que se encuentra el presente trabajo, proporcionando ecuaciones con sentido físico.

Los modelos no estructurados se pueden dividir en tres grupos, los modelos de crecimiento, los modelos de consumo de sustrato y modelos de formación de producto¹²³.

¹²² ALCON MARTIN, Almudena. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprosesos: aplicación a la producción de Xantano . Universidad complutense de Madrid, 1999. p. 471.

¹²³Ibíd., p. 471.

Los modelos no estructurados de crecimiento, tienen en cuenta el crecimiento del microorganismo con la concentración de la biomasa y otros factores como el sustrato limitante, que hace depender el crecimiento de la concentración de la biomasa con la concentración de un sustrato ¹²⁴. El modelo más sencillo que se encuentra en este grupo es la ley de Malthus, **Ecuación 1**, debido a que tiene en cuenta únicamente la evolución de la biomasa con respecto al tiempo.

Seguida por la ecuación logística, Ecuación 3, empleada para el crecimiento y que también depende de la concentración de la biomasa en función del tiempo.

Posterior a la ecuación logística, Monod propuso una expresión, similar a la ecuación propuesta por Michaelis Menten, en donde se tenía en cuenta la dependencia de la concentración de biomasa y sustrato limitante, en el crecimiento microbiano, **Ecuación 5**, El sustrato limitante está incluido en la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}), asumiendo que la producción de la biomasa depende exclusivamente del sustrato limitante¹²⁵.

Para el medio de cultivo 2, correspondiente a 15% H. Ac en solución melaza, seleccionado para ajustar un modelo cinético para el cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA, se realizó un ajuste por medio de los modelos nombrados anteriormente, modelo logístico representado por la **Ecuación 4**, ajustado por medio del programa Excel empleando la función solve; en el **Anexo L** se encuentran los resultados obtenidos. El modelo de la ley de Malthus o modelos de crecimiento exponencial, **Ecuación 2**; el modelo de Monod, teniendo en cuenta la linealización a la ecuación de Monod correspondientes a Eadie-Hofstee, **Ecuación 5**, ajustando los datos obtenidos experimentalmente de concentración de biomasa y consumo de sustrato; los resultados obtenidos se encuentran en el **Anexo M**.

En la **Tabla 1** se presentan los parámetros obtenidos para el medio 2, por medio del ajuste de la ecuación logística, la ecuación de crecimiento exponencial (datos obtenidos en la sección 4.2.4- Tabla 12) y la linealización de la ecuación de Monod Eadie Hofstee.

Tabla 18. Comparación de parámetros de velocidad de formación de biomasa.

PARÁMETRO	CRECIMIENTO EXPONENCIAL	ECUACIÓN LOGÍSTICA	ECUACIÓN EADIE-HOFSTEE
μ (h^{-1})	0,0471	0,0586	0.0005
X_o ($\ln(mg/ml)$)	6,5733	6,3242	-

¹²⁴ *Ibíd.*, p 471

¹²⁵ *Ibíd.*, p 471

K	-	-	1671.3
R ²	0,9623	0,9476	0.9997

Fuente: elaboración propia.

El modelo de crecimiento exponencial o ley de Malthus, considera que el crecimiento es equilibrado, en donde la masa celular media no se ve afectada por la proliferación de la población; este tipo de comportamiento se puede presentar en la fase de crecimiento exponencial, por lo que, para fases como la declinación en el crecimiento, es incapaz de predecir la concentración de la biomasa, debido a que en dicha fase la velocidad de incremento de la masa bacteriana disminuye¹²⁶.

Por tanto, para el ajuste del modelo exponencial, se tuvo en cuenta la fase de crecimiento exponencial obteniendo una velocidad de formación de la biomasa de 0.0471 h⁻¹, con un coeficiente de correlación de 0.9623.

El coeficiente de correlación de 0.9623 indica que los datos no presentaron un ajuste cercano al modelo, ya que, al no ser un valor próximo a 1 indica que los datos no son precisos en cuanto a la cinética microbiana; esto pudo deberse a que el método turbidimétrico empleado para el monitoreo del crecimiento microbiano no fue un método apropiado para ajustar los parámetros cinéticos, debido a que se pudo presentar un error humano al diluir la muestra al momento de pipetear, ya que se producen desviaciones de la ley de Lambert-Beer al tener suspensiones concentradas, absorbancias mayores de 0.3¹²⁷, afectando las mediciones realizadas a la absorbancia del medio. Otro factor que pudo influir en el ajuste al modelo cinético posiblemente fue la curva de calibración del cultivo mixto, la cual presentó un ajuste de 0.9779, por lo que pudo provocar un error al momento de relacionar la absorbancia medida con la concentración de la biomasa.

Por otro lado, en el modelo logístico se obtuvo una velocidad de formación de la biomasa de 0.0586 h⁻¹, con un coeficiente de correlación de 0.9476 y un porcentaje de error de mínimos cuadrados de 0.006%. Como este modelo, al igual que el modelo de crecimiento exponencial, tienen en cuenta la concentración de la biomasa en función del tiempo, ambos modelos tuvieron velocidades de formación de la biomasa cercanos.

El coeficiente de correlación de 0.9476, muestra que los datos no son precisos en cuanto a la cinética microbiana, esto se pudo presentar por los mismos motivos que para el modelo de crecimiento exponencial, el método turbidimétrico para el

¹²⁶ *Ibíd.*, p 471

¹²⁷ DUYMOVICH, Claudio, et al. *Op cit.*p. 529-539

seguimiento de la biomasa no fue apropiado y también por el ajuste obtenido en la curva de calibración del cultivo mixto.

Finalmente, con el modelo de Eadie-Hofstee, correspondiente a la linealización de la ecuación de Monod, se obtuvo una velocidad de formación de la biomasa de 0.0005 h^{-1} , con un coeficiente de correlación de 0.9997, valor que al ser próximo a 1, indica que los datos se ajustan al modelo cinético. Sin embargo, el modelo de Monod asume que la producción de la biomasa depende exclusivamente de la concentración del sustrato limitante¹²⁸, y el monitoreo del consumo de sustrato se midió empleando el método colorímetro DQO, técnica que determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra, es decir, mide el consumo de sustrato total en el medio, el cual fue aproximadamente 8.6%. Por lo que es necesario realizar la medición de otras variables del proceso para medir el consumo del sustrato limitante¹²⁹ como lo es cuantificar el consumo de azúcares, consumo de AGV o el consumo de nitrógeno.

Por tanto, aunque se obtuvo una alta correlación en los datos por la linealización de Eadie-Hofstee de la ecuación de Monod, el consumo de sustrato total cuantificado causa una desviación de las consideraciones del modelo por lo que este mejor ajuste no necesariamente describe una buena relación entre el modelo y los datos¹³⁰.

No se realizó un ajuste de los modelos de consumo de sustrato, debido a que en ellos se tiene en cuenta un coeficiente de mantenimiento (m_s), que relaciona el consumo de sustrato para el mantenimiento de la biomasa en estado viable y el método turbidimétrico, con el que se monitoreo el crecimiento de la biomasa, no es una medida de la viabilidad celular.

Para los modelos no estructurados de formación del producto, se buscó por medio de literatura los modelos utilizados para ajustar parámetros cinéticos para la producción de PHA, encontrando que para llevar a cabo el modelamiento se requiere cuantificar distintas variables que muestran las siguientes investigaciones sobre producción de PHA.

En el trabajo Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxialcanoatos empleando la bacteria burkholderia cepacia b27 a partir de ácidos grasos, el autor Méndez¹³¹, se cuantificó la biomasa, el amonio residual, PHAs y aceite vegetal residual (sustrato). Con estos datos medidos

¹²⁸ MENDOZA CALERO, Rolando. Op cit., p. 1-145

¹²⁹ DUARTE TORRES, Alberto. Op cit. p. 123-148

¹³⁰ MÉNDEZ REYES, Daniel Alexander. Op cit. p. 137

¹³¹ *Ibíd.* p. 137

experimentalmente se realizó el ajuste a varios modelos cinéticos empíricos reportados en literatura.

Otra investigación que trata sobre las variables de modelos cinéticos utilizados en la producción de PHA es la tesis modelado matemático de la acumulación de polihidroxicanoatos (pha) en cultivos mixtos durante el tratamiento de aguas residuales, el autor Montaña¹³², en el que se mide la producción de PHA, biomasa, concentración de oxígeno disuelto, concentración de nitrógeno y concentración de AGV para ajustar los parámetros cinéticos del modelo de Haldane.

También en el artículo Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxicanoatos de Cadena Media (PHAMCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi, el autor Vanegas¹³³ cuantificó la biomasa, el nitrógeno y los azúcares presentes en el medio, para ajustar los parámetros cinéticos de los modelos de Gompertz, logístico y Baranyi.

En este trabajo no se realizó la extracción del PHA, metabolito de interés, además de otras variables en el proceso como la concentración de nitrógeno, nutriente que está asociado a la producción intracelular del PHA cuando este se encuentra limitado, medición del oxígeno disuelto, concentración de AGV; variables que son importantes, como se expuso anteriormente, para ajustar los parámetros cinéticos de los modelos no estructurales de formación de producto PHA, que no fueron medidos por la falta de disponibilidad de equipos o reactivos, es por esto que no se pudo ajustar modelos como haldane, Gompertz, logístico o Baranyi.

¹³² MENDOZA CALERO, Rolando. Op cit., p. 1-145

¹³³ VANEGAS, Diana M. y RAMÍREZ, Margarita E. Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxicanoatos de Cadena Media (PHA MCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. En: INFORMACIÓN TECNOLÓGICA.2015. vol. 27, no. 2, p. 87-96

6. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron las cepas 1,4,6,10 y 13, que basadas en el crecimiento a pH 5, presentaron un comportamiento similar en cuanto a su crecimiento y alcanzaron concentraciones máximas y velocidades de formación de la biomasa altas en comparación con las demás cepas, seleccionadas para la conformación el cultivo mixto microbiano sobre el cual se evaluó el sustrato sintético de ácido acético en solución melaza
- Se seleccionó el medio sintético 2, correspondiente a la relación de sustrato, 15% H. Ac en solución melaza, que basado en el crecimiento del cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA provenientes de un sistema de lodos activados, conformado por las cepas 1,4,6,10 y 13, obtuvo un comportamiento de crecimiento mayor, alcanzando una concentración de biomasa máxima correspondiente a 3685 mg/L y un rendimiento en la biomasa mayor de 0.0143 mg biomasa/mg DQO, en comparación a los otros dos medios sintéticos, en donde el medio alcanzó la neutralidad en cuanto a el pH.
- Para el medio sintético 2, correspondiente a la relación de sustrato, 15% H. Ac en solución melaza, el modelo cinético que presento mayor ajuste con un coeficiente de correlación de 0.9997, fue la linealización de la ecuación de Monod por Eadie-Hofstee. Sin embargo, debido a que se cuantifico el consumo de sustrato total, esto posiblemente causa una desviación de las consideraciones del modelo por lo que este mejor ajuste no necesariamente describe una buena relación entre el modelo y los datos.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización del sustrato complejo melaza para establecer las concentraciones de vitaminas y micronutrientes presentes en la melaza, ya que la producción de PHA se ve afectada por altas concentraciones de biotina que estimula el crecimiento microbiano, pero no la acumulación de PHA o puede presentarse inhibición de crecimiento por compuestos como los fenoles.
- Trabajar a pH neutros o alcalinos ya que se favorece el crecimiento de la biomasa como se puede evidenciar en el medio 2 y 3 del cultivo mixto en sustrato sintético en comparación con el medio 1.
- Investigar el efecto de la concentración de oxígeno sobre la producción de PHA y consumo de sustrato, ya que, en investigaciones realizadas sobre cultivos mixtos, acumuladores de PHA, se obtienen mejores rendimientos de PHA cuando se tienen condiciones con limitación de oxígeno que cuando se alimenta en exceso.
- Determinar la longitud de onda a la cual se detecta el PHA y realizar una curva de calibración que relacione la densidad óptica y la concentración del PHA.
- Para realizar un ajuste en modelos cinéticos, como los modelos modificados de Monod, Haldane, Gompertz, Baranyi, entre otros se recomienda cuantificar los AGV y los azúcares del Medio 2 para seguir el consumo del sustrato limitante en el medio, cuantificar el nitrógeno, medir el oxígeno disuelto.
- Utilizar otro tipo de método para medir el crecimiento microbiano, debido a que el método turbidimétrico no es apropiado para ajustar parámetros cinéticos.
- Realizar pruebas químicas y análisis molecular para identificar los tipos de microorganismos que conforma el cultivo mixto.
- Emplear otro tipo de biorreactor, como puede ser un biorreactor por lote alimentado a pulsos, siendo este una de las mejores estrategias para evitar la inhibición por sustrato y alcanzar altas fracciones de PHA.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA Edith; FONSECA, Andrea; JIMÉNEZ, Santiago; SÁNCHEZ, Astrid; LUNA, Héctor y LEÓN, Iván. Identificación De Bacterias Acumuladoras De Polihidroxicanoatos Con Técnicas De Tinción Convencionales. Universidad el bosque: 2018, p 45.

APELLA, María C y ARAUJO Paula Z. Microbiología de agua. Conceptos básicos. En: Solar Safe Water.2010. Vol 1. no. 2, p. 33-50

ARCOS HERNÁNDEZ, Mónica Vanessa. Degradación De Aguas Residuales Y Producción De Polihidroxicanoatos Mediante Un Biorreactor Discontinuo. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2007. p. 138

ARNÁIZ FRANCO, Carmen; ISAC ORIA, Laura y LEBRATO MARTÍNEZ, Julián. Determinación De La Biomasa En Procesos Biológicos. I Métodos Directos E Indirectos. Elsevier, 2000.

ARTURO ROMERO, Salvador. Aprovechamiento de la biomasa como fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. En: Real Academia De Ciencias Exactas Físicas Y Naturales (España). 2010, vol. 104, no. 2, p. 331-345

BARBOSA Marcela, ESPINOZA HERNÁNDEZ Armando, MALAGÓN ROMERO Dionisio and MORENO SARMIENTO Nubia. Producción de POLI- β -HIDROXIBUTIRATO(PHB)por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697.2005. p. 45-54

BECERRA MEJÍA, Camilo Andrés. Optimización De Un Medio De Cultivo Para La Producción De Biomasa De La Cepa Pseudomonas Putida UA 44 Aislada Del Suelo Bananero De Uraba –Antioquia. UNIVERSIDAD EAFIT, 2007. p. 136

BELLO GIL ,Daniel y BRAND,Helmut. Selección de bacterias productoras de PHA. En: ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 2007. vol. 41, no. 2, p. 10-18

BENINTENDE Silvia y SANCHEZ Cecilia. Crecimiento Bacteriano. En: Universidad Nacional De Colombia. 2013. p 8

BHATIA, Shashi Kant, et al. Engineering of artificial microbial consortia of *Ralstonia eutropha* and *Bacillus subtilis* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. En: Bioresource Technology. Jun. vol. 257, p. 92-101.

BILLMEYER, Fred. Ciencia De Los Polímeros. 1 ed. Barcelona: Reverté SA, 1975. p. 610

BLANCO MARIN Karina. Detección De Gránulos De Polihidroxialcanoatos En La Cepa USBA 355 Tistlia Consotensis. Pontificia Universidad Javeriana, 2010. p 36

BROOKS Geo F; CARROLL, Karen C; BUTEL, Janet S; MORSE, Stephen A y MIETZNER, Timothy A. "Jawetz" Microbiología Médica. 25 ed. ES: McGraw-Hill Interamericana - M.U.A, 2015. p. 83

CALDERÓN VARGAS, Juan Fernando. Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Fundación Universidad América, 2017. p. 78

CORDÓN PÁEZ, Santiago y PÉREZ MARTÍNEZ, Jorge Alejandro. Ajuste De Un Modelo Matemático Para El Crecimiento De *Streptococcus Pyogenes* En 2 Sustratos Para La Producción De Ácido Hialurónico a Escala De Laboratorio. FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA, 2016. p. 129

CORTES DE LUNA Omar. Producción De Polihidroxibutirato (PHB) Con Cultivo Mixto Fotoheterotrófico. Instituto Politecnico Nacional, 2016. p. 63

CUI, Y, ZHANG, Y, LU, P.y PENG, Z. Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. En: Scientific reports. 2017, Vol 6, no. 1, p 30-44.

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

DIONISI, Davide; MAJONE Mauro; PAPA, Viviana y BECCARI Mario. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. En: Biotechnology and Bioengineering. Mar 2004, vol. 85, no. 6, p. 569-579

DORAN, Pauline M. Bioprocess engineering principles. 2. ed. Amsterdam: Academic Pres, 2013. p 750

DUARTE TORRES, Alberto. Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. , Enero. 1995. vol. 33, no. 9, p. 123-148

DUYMOVICH, Claudio, et al. Espectrofotómetros y Fotocolorímetros: Guía práctica de actualización. En: ACTA BIOQUÍMICA CLÍNICA LATINOAMERICANA. Diciembre, 2005,.vol. 39, no. 4, p. 529-539

FAJARDO CASTILLO, Erika Esperanza y SARMIENTO FORERO, Sandra Constanza. Evaluación De Melaza De Caña Como Sustrato Para La Producción De *Saccharomyces Cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana, 2007a. p. 120

FONSECA AMAYA, Liseth Camila y SANCHEZ BEDOYA, María Fernanda. Evaluación de la influencia del sustrato principal (ácido acético y ácido acético/melaza) en la selección de cultivo mixto de bacterias acumuladoras de PHA, en un reactor airlift . Fundación universidad de américa, 2019. p. 122.

FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A. y REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. En: Journal of Biotechnology. Sep 2014,. vol. 185, p. 19-27

GARCÍA, Luis A, NOVA Julián, FRANCO R, Ana and HIGUITA, Luz. Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. En: REVISTA QUID. Diciembre, 2015. vol. 25, p. 69-78

GIIN-YU Amy Tan, et al. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. Basel: MDPI AG, 2014.vol 6. no 6. p. 706-754

GONZALES ACEBO, Dayana y HERNÁNDEZ GARCÍA, Armando. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. En: Modelamiento Matemático Y Optimización Del Proceso De Producción De Polihidroxialcanoatos. 2013. vol. 44, no. 1, p 1-14.

GONZÁLEZ GARCÍA, Yolanda; MEZA CONTRERAS, Juan Carlos; GONZALES REYNOSO, Orfil; CÓRDOVA LÓPEZ, Jesús Antonio, Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Revista Internacional De Contaminación Ambiental. Febrero 2013. vol. 29, no. 1, p. 77-115

HERNÁNDEZ DURAN Melissa, COLÍN CASTRO Claudia Adriana, ORTEGA PEÑA Silvestre, CERÓN GONZALES Guillermo y FRANCO CENDEJADAS Rafael. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. En: Medi Graphic. vol. 3, no. 1, p. 10-18

HERNÁNDEZ, Ana María. Sólidos Suspendidos Totales En Agua Secados a 103 – 105 °c. 2007.

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

JOHNSTON, Brian; RADECKA, Iza; Hill, David; CHIELLINI, Emo; Ilieva, VASSILKA Ivanova; SIKORSKA, Wanda; MUSIOŁ, Marta; ZIĘBA, Magdalena; MAREK, Adam A; KEDDIE, Daniel; MENDREK, Barbara; DARBAR, Surila; ADAMUS, Grazyna y KOWALCZUK, Marek. The Microbial Production of

Polyhydroxyalkanoates from Waste Polystyrene Fragments Attained Using Oxidative Degradation. En: Polymers. 2018. vol. 10, no. 9, p. 957

KHANNA, Shilpi y SRIVASTAVA, Ashok K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. En: Process Biochemistry. vol. 40, no. 2, p. 607-619
LEE,S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. En: Biotechnology and Bioengineering. Jan 5,. vol. 49, no. 1, p. 1-14

LEMOS, Paulo C.; SERAFIM, Luísa S. y REIS, Maria A. M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. En: Journal of Biotechnology. 2006, vol. 122, no. 2, p. 226-238

LEÓN GIL, Carlos Albeiro. Estandarización Y Validación De Una Técnica Para Medición De La Demanda Bioquímica De Oxígeno Por El Método Respirométrico Y La Demanda Química De Oxígeno Por El Método Colorimétrico. Universidad tecnológica de Pereira, 2009 p. 169

MAJONE M; DIRCKS K y BEUN J J. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. En: Water Science and Technology.1999. vol. 39, no. 1, p. 61

MARTÍNEZ, Guadalupe. Producción de plásticos biodegradables en bacterias. Universidad de la república. 2013. P.226

MÉNDEZ REYES, Daniel Alexander. Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxiálcanoatos empleando la bacteria *burkholderia cepacia* B27 a partir de ácidos grasos. Universidad Nacional de Colombia, 2016. p. 137

MENDOZA CALERO, Rolando. Obtención de polihidroxiálcanoatos (PHA) a partir de cultivos mixtos microbianos usando efluentes ricos en ácidos grasos volátiles como sustrato. En: Revista Científica Y Tecnológica UPSE. vol. 2, no. 1, p. 1-145

MOELLER Gabriela y TOMASINI ORTIZ Ana Cecilia. Microbiología De Lodos Activados. IDEAM, 2004. p. 148-208

MONTAÑO HERRERA, Liliana. Modelado Matemático De La Acumulación De Polihidroxiálcanoatos (PHA) En Cultivos Mixtos Durante El Tratamiento De Aguas Residuales. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011. p. 105

MORA, Carlos Eduardo. Evaluación de la producción de ácidos grasos volátiles (AGVS) a diferentes alturas en dos tipos de reactores anaerobios (ASTBR Y UFBR.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55.

NARANJO VASCO, Javier Mauricio. Producción De Polihidroxibutirato a Partir De Residuos Agroindustriales. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, 2010. p. 127

NUÑEZ ZEPEDA, Miguel. Estandarización y evaluación de técnicas Analíticas para medir el crecimiento de un cultivo mixto para biolixiviación de minerales. Universidad de Sonora, 2016. p. 74.

ORTEGÓN VELANDIA, María Fernanda. Evaluación del potencial acidogénico para producción de ácidos grasos volátiles (agv) a partir de lixiviados de los residuos sólidos orgánicos, como plataforma de biorefinería. Universidad Santo Tomás, 2016. p. 84.

PISCO, Ana Rita Saloio. Polyhydroxyalkanoates production by glycogen-accumulating organisms (GAOs) from by-products of the sugar industry. Universidad de Lisboa, 2008. p. 83.

PORRAS, Mauricio A.; VILLAR, Marcelo A. y CUBITTO, María A. Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. En: Journal of Biotechnology. Aug 2017, vol. 255, p. 28-32

PUNRATTANASIN, Warangkana. The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics. Virginia Tech, 2001. p 131

RAMOS, Fernando Daniel. Producción de PHA estudios experimentales y diseño óptimo de biorrefinerías. Universidad Nacional del Sur, 2019. p. 355

REIS M; Serafim L; LEMOS P; RAMOS A, AGUIAR F and VAN LOOSDRECHT, M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. En: Bioprocess and Biosystems Engineering. 2003l. vol. 25, no. 6, p. 377-385

RODRÍGUEZ VARGAS, María Rosa. Variabilidad De La Inactivación Microbiana Y De La Fase De Latencia De Los Microorganismos Supervivientes a Un Proceso De Acidificación. Universidad Complutense de Madrid, 2016. p. 261

RODRÍGUEZ, Carlos Hernán; COY, Gustavo Alfonso y DUQUE, Marta Helena. Informes de Prevalidación de la Demanda Química de Oxígeno, Técnica Volumétrica – Método de Reflujo cerrado. IDEAM. Bogotá D.C. 2017

RODRÍGUEZ, S Lady y ORREGO, Carlos. Aplicaciones De Mezclas De Biopolímeros Y Polímeros Sintéticos: Revisión Bibliográfica. En: Revista Científica Del Centro De Investigaciones Y Desarrollo Científico De La Universidad Distrital Francisco José De Caldas. 2016,. vol. 2, no. 25, p. 252-264

SALINAS BONILLA Mónica, PAJARES Silvia, VIGUERAS Gabriel y SIGALA Juan Carlos. Material Didactico Manual De Practicas De Microbiología Básica. 2016.

SANZ CERVERA, Susana. Técnicas De Microbiología. 2a edición ed. Universidad Rioja: 2011. p. 102

SERAFIM, Luisa, LEMUS Paulo; OLIVIERA, Rui, y REIS, Maria. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. En: Biotechnology and Bioengineering. 2004. vol. 87, no. 2, p. 145-160

SERRANO RIAÑO, Julieth Yadira. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. En: Teoría Y Praxis Investigativa. vol. 5, no. 2, p. 79-84

SIERRA MOJICA Winston Aaron. Propuesta de proyecto de educación ambiental (Escoplasticos). Bogotá D.C.: Fundación Universidad América, 2016. p. 97.

STAINER John; WHEELS Mark y PAINTER Page. Microbiología. 2 ed. España: Reverté,

STEINBÜCHEL, Alexander y FÜCHTENBUSCH, Bernd. Bacterial and other biological systems for polyester production. En: Trends in Biotechnology. 1998. vol. 16, no. 10, p. 419-427

VALERO VALDIVIESO, Manuel Fernando; ORTEGÓN, Yamileth y USCATEGUI, Yomaira. BIOPOLÍMEROS: AVANCES Y PERSPECTIVAS. En: Dyna. 2013. vol. 80, no. 181, p. 171-180

VANEGAS, Diana M. y RAMÍREZ, Margarita E. Correlación del Crecimiento de Pseudomonas fluorescens en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHA MCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. En: INFORMACIÓN TECNOLÓGICA. 2015. vol. 27, no. 2, p. 87-96

VANEGAS, Diana M. y RAMÍREZ, Margarita E. Correlación del Crecimiento de Pseudomonas fluorescens en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHA MCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. En: Información Tecnológica. vol. 27, no. 2, p. 87-96

WANG, Jianping y YU, Jian. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of Alcaligenes eutrophus on acetate under nutrient-rich conditions. En: Process Biochemistry. 2000, vol. 36, no. 3, p. 201-207

XU, Ji Fei; MI, Yuan-Ting y REN, Nan-Qi. Buffering action of acetate on hydrogen production by *Ethanoligenens harbinense* B49. En: *Electronic Journal of Biotechnology*. Sep 2016,. vol. 19, no. 5, p. 2-11

ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVOS EMPLEADOS

PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Se reactivaron las 13 cepas que estaban conservadas en un refrigerador a una temperatura de 4°C en un medio de cultivo sólido ya empleado en el laboratorio. Éste medio de cultivo está conformado por los compuestos mostrados en la tabla 3:

Tabla 1. Compuestos del medio de cultivo A.N modificado

Caldo nutritivo	8 g/ L
Glucosa	10 g/ L
Agar-agar	15 g/ L

Fuente: elaboración propia.

Se agregan los componentes en agua destilada para hidratarlos, y se disuelven en la mezcla; posteriormente el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 20 Psi y 121 °C. para esterilizarlos.

PREPARACIÓN CALDO DE ACUMULACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Se preparó un caldo de acumulación de acuerdo a los protocolos del laboratorio, con el fin de cultivar cada una de las cepas en medio líquido; éste está compuesto por:

Tabla 2. Compuestos del medio de cultivo del caldo de acumulación

GLUCOSA	10 g / L
CALDO NUTRITIVO	10 g / L

Fuente: elaboración propia.

Se agregan los componentes en agua destilada para hidratarlos, y se disuelven en la mezcla; posteriormente el caldo de acumulación fue esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 20 Psi y 121 °C. para esterilizarlos.

PROTOCOLO PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA IDENTIFICAR COLONIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS, USANDO ROJO DE NILO COMO INDICADOR DE FLUORESCENCIA

COMPONENTES

- 8 gramos de caldo nutritivo
- 15 gramos de agar-agar
- 10 gramos de glucosa
- 500 μ L de colorante rojo de Nilo (en solución)

*Cantidades por litro

PREPARACIÓN

Se agregan los componentes en un litro de agua destilada para hidratarlos, y se disuelven en la mezcla posteriormente se autoclavan a 15 libras, 121°C durante 15 minutos para esterilizarlos. Después se le agregan 500 μ L del colorante rojo de Nilo al medio (cantidad para 1L de medio). Luego servir los medios en las cajas de Petri estériles, hasta aproximadamente la mitad de la caja.

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE ROJO DE NILO A UNA CONCENTRACIÓN DE 0,5 μ g/mL

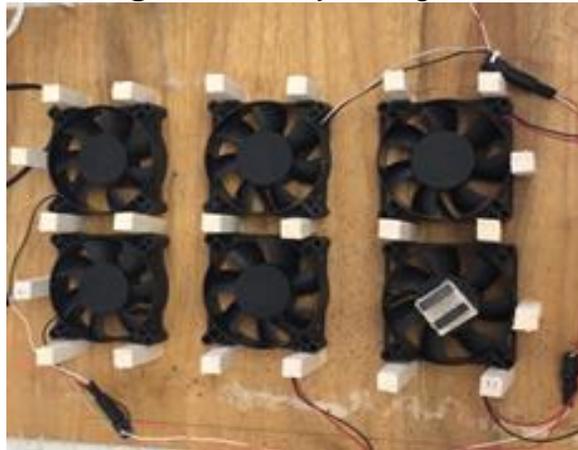
Se pesan 0,0005 mg de colorante rojo de nilo en polvo y se agregan a 500 μ L de DMSO (1mg/L), se agita bien y posteriormente se agregan al medio autoclavado.

ANEXO B. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE AGITACIÓN

Se realizó la construcción de un sistema de agitación con el fin de garantizar la homogeneidad de los cultivos, de forma axial, constante y uniforme en los Erlenmeyer.

Para la construcción del sistema de agitación se utilizó un Triple de 45cmX30cm y a esta superficie se adhirieron ventiladores de CPU de aproximadamente 10 cm de diámetro. En el centro del aspa de cada ventilador se incorporaron dos imanes pequeños, los cuales son responsables de generar el campo magnético para mover el agitador magnético contenido en cada Erlenmeyer. Posteriormente se añadieron palos de balsa 2x2cm con longitud de 5 cm en cada vértice del ventilador con el fin de dar sostén al sistema. Finalmente se usaron adaptadores de Jack para realizar la conexión del circuito cerrado del sistema de agitación y se conectó a una batería de 5V. El montaje del sistema se muestra en la **Imagen 1**, el cual cuenta con una capacidad para agitar seis Erlenmeyer.

Imagen 1. Montaje de agitador.



Fuente: elaboración propia

En la **Imagen 2** se puede observar el montaje final para la agitación de los cultivos, dentro de la incubadora con control de temperatura.

Imagen 2. Montaje agitador en la incubadora.



Fuente: elaboración propia.

ANEXO C. COLORACIÓN NEGRO DE SUDÁN

PREPARACIÓN DE SUDAN NEGRO AL 0.3%

1. Para prepara 50 mL se pesan 0.15 g de sudan negro B, y se le adicionan 50 mL de etanol al 70 %
2. Filtrar la tinción con una membrana

TÉCNICA DE SUDÁN NEGRO EN EPPENDORF

1. Sacar 1 mL de la muestra obtenida
2. Colocar la muestra obtenida en un tubo eppendorf
3. Centrifugar a durante 10 minutos
4. Descartar el sobrenadante
5. Adicionar 440 μ L de sudan negro al 0.3 %
6. Dejar incubar durante 20 minutos a 37^aC con agitación constante
7. Centrifugar a durante 10 minutos
8. Descartar el sobrenadante
9. Adicionar 450 μ L de agua destilada
10. Centrifugar a durante 10 minutos
11. Descartar el sobrenadante
12. Repetir pasos 9, 10 y 11, hasta completar tres lavados con agua destilada
13. Adicional 1 mL de agua destilada
14. Homogeneizar la solución con ayuda del vórtex
15. Medir en el espectrofotómetro, diluyendo la muestra 1:10 (2700 μ L de agua destilada + 300 μ L de la muestra)

ANEXO D. PROTOCOLO SSV IDEAM

1. Toma de muestra

Tome la muestra en tal forma que no contenga partículas flotantes grandes o aglomerados sumergidos de materiales no homogéneos.

Refrigere la muestra a 4°C hasta el momento del análisis para minimizar la descomposición microbiológica de los sólidos. Antes de iniciar el análisis lleve la muestra a temperatura ambiente. Efectúe el análisis dentro de los siete días siguientes a la toma de la muestra.

2. Aparatos, reactivos y materiales

- i. Aparatos
 1. Horno digital
 2. Balanza analítica
 3. Bomba de vacío
- ii. Reactivos
 1. Agua destilada
- iii. Materiales
 1. Aparato completo para la filtración, para membranas de 47 mm de diámetro, capacidad de 250 mL, para ser utilizado para filtración al vacío o a presión, con recipiente receptor de filtrado.
 2. Filtros de fibra de vidrio, diámetro 47 mm
 3. Capsulas de cerámica 65 mm de diámetro para pesar
 4. Pinzas metálicas para manejo de las capsulas de cerámica y de los filtros de vidrio
 5. Microespátula metálica para manejo de los filtros de fibra de vidrio
 6. Desecador para SST
 7. Probetas de vidrio 100, 250, 500 ML
 8. Frasco lavador

3. PROCEDIMIENTO

Preparación del filtro o disco de fibra de vidrio: siempre maneje el disco mediante pinzas metálicas y/o microespátula metálica. No manipule el filtro con la mano

1. Marque cada capsula de cerámica con un numero de forma consecutiva
2. Coloque el disco sobre el soporte, con el lado rugoso hacia arriba, aplique vacío
3. Deje el vacío durante 1 minuto adicional para secar el disco
4. Cuidadosamente con la ayuda de una microespátula o de unas pizas, retire el disco y colóquelo dentro de la capsula de cerámica correspondiente
5. Seque el conjunto (capsula + membrana) en el horno precalentado a 105°C por 1 hora.

6. Lleve el conjunto a un desecador y deje enfriar por aproximadamente por 15 minutos hasta temperatura ambiente
7. Pese y registre el peso del conjunto.
8. Repita el ciclo de secado enfriado y pesado. Registre el nuevo peso.
9. La máxima variación aceptada en el peso del conjunto es de cinco unidades en la cuarta cifra decimal. Si se cumple con este requisito se puede decir que se ha alcanzado peso constante. En caso contrario se debe someter a un nuevo ciclo de secado hasta que cumpla con el requisito anterior.

Procesamiento de la muestra

10. Saque del desecador el conjunto correspondiente a la muestra que va a procesar. Instale un disco en el equipo de filtración. Haga vacío en el sistema y fije el disco con una pequeña cantidad de agua destilada
11. Agite invirtiendo el recipiente varias veces
12. De la muestra recién agitada, tome rápidamente una alícuota medida con probeta, transfiera cuantitativamente al filtro y registre el volumen total filtrado.
13. Deje el vacío por un minuto más para retirar el exceso de humedad del filtro
14. Retire cuidadosamente el disco con ayuda de una microespátula y colóquelo en la capsula correspondiente
15. Seque el conjunto en el horno a 103-105°C durante 1 hora
16. Lleve el conjunto a un desecador y deje enfriar aproximadamente por 15 minutos hasta temperatura ambiente
17. Pese y registre el peso del conjunto
18. Repita el ciclo de secado enfriado y pesado. Registre el nuevo peso
19. La máxima variación aceptada en el peso del conjunto es de cinco unidades en la cuarta cifra decimal.

**ANEXO E.
REPETICIÓN DE DATOS CURVA DE CALIBRACIÓN CEPA 10**

Tabla 3: Repeticiones de datos curva de calibración cepa 10

Tiempo	Wo (g)	Wf (g)	Wf- Wo (g)	□W (mg)	Abosrbanci
					□ 570 nm
t0	76.980 2	76.982	0.001 8	1.8	0.071
	91.257 9	91.262 1	0.004 2	4.2	
t1	80.947 1	80.949 5	0.002 4	2.4	0.088
	89.652 8	89.857 3	0.205 3	205. 3	
t2	90.547 7	90.55	0.002 3	2.3	0.103
	82.988 8	82.993 8	0.005	5	
t3	90.098 1	90.100 5	0.002 4	2.4	0.356
	83.039 6	83.044 2	0.004 6	4.6	
t4	89.695 5	89.700 9	0.005 4	5.4	0.368
	86.841 9	86.841 4	- 0.000 5	-0.5	
t5	94.613 6	94.615 9	0.002 3	2.3	0.339
	86.530 2	86.532	0.001 8	1.8	
t6	89.694 1	89.704	0.009 9	9.9	0.727
	-	-	-	-	

Fuente: elaboración propia

ANEXO F.
DATOS POR REPETICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BIOMASA Y
COLORACIÓN DE GRAM

Tabla 4: Repetición 1 datos de concentración celular

PRIMERA REPETICIÓN (mg/mL)												
t i e m p o	1	2	3	4	6	8	9	1 0	1 1	1 2	1 3	
0	0. 1 9 2 6 0 5	0. 3 3 0 8 9	0. 1 9 6 4 2 4	0. 1 6 7 1 4 5	0. 1 8 1 1 4 8	0. 1 2 5 9	0. 1 2 8 9	0. 1 4 0 5	0. 1 5 4 1 5	0. 1 7 4 9 8	0. 2 7 5 3 1	0. 1 9 1 3 2
6	0. 2 2 6 9 7 6	0. 2 9 5 7 1 8	0. 2 0 9 1 5 4	0. 1 7 4 7 8 3	0. 1 8 3 6 9 4	0. 1 2 0 0 4 4	0. 1 5 3 1 4 2	0. 1 6 8 4 4 2	0. 1 4 5 8 7 4	0. 1 4 5 9 0 4	0. 2 9 6 9 9 1	0. 1 9 6 4 2 4
2 4	0. 9 8 6 9 5 7	0. 9 1 0 5 7 7	0. 4 1 9 1 9 9	0. 6 5 4 7 0 4	0. 4 3 5 7 4 8	0. 9 6 1 4 9 7	0. 6 6 9 4 8	0. 3 9 7 5 8 8	0. 1 9 6 2 2 5	1. 2 3 2 6 4 6	0. 9 6 0 2 4 4	
3 0	1. 0 4 6 7 8 8	0. 7 3 7 4 4 9	0. 2 5 2 4 3 6	0. 4 9 4 3 0 6	0. 4 4 8 4 7 8	1. 0 9 2 6 1 6	0. 7 9 8 5 5 3	0. 3 8 7 3 7 4	0. 1 2 6 4 0 9	0. 0 8 4 4 0 9	1. 0 3 4 0 5 8	
4 8	1. 5 3 5 6 2	0. 5 7 3 2 2	0. 2 9 5 7 1 8	2. 0 7 0 2 8	0. 6 5 0 8 5	0. 7 4 5 0 8 7	1. 2 3 3 9 1 9	1. 7 7 2 3 9 8	0. 9 3 8 5 6	0. 0 8 4 4 4	1. 5 6 9 9 1	
5 4	2. 9 0 2 8 2 2	0. 0 8 4 4	0. 0 8 4	2. 0 5 1 1 8 5	0. 8 0 2 3 7 2	0. 0 8 4 4	0. 7 4 1 4 2 8	1. 7 1 8 9 3 2	0. 0 8 4 4	0. 0 8 4 4	1. 6 0 4 3 6 2	
7 8	1. 6 9 2 1 9 9	0. 0 8 4 4	0. 0 8 4	2. 2 6 5 0 4 9	1. 5 9 2 9 0 5	0. 0 8 4 4	1. 6 8 4 5 6 1	0. 7 7 1 8 2	0. 0 8 4 4	0. 0 8 4 4	1. 4 6 3 0 5 9	

Fuente: elaboración propia

Tabla 5: Repetición 2 datos de concentración celular

SEGUNDA REPETICIÓN (mg/mL)											
t	1	2	3	4	6	8	9	1	1	1	1
i								0	1	2	3
e											
m											
p											
o											
0	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.
	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1
	6	0	2	4	5	4	7	1	8	1	8
	8	0	6	5	6	8	8	6	8	6	2
	4	2	9	5	2	0	6	2	7	7	4
	1	4	7	0	5	5	0	2	8	9	2
	8	3	6	4	5	2	2	5	6	2	1
6	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.
	1	3	3	2	2	1	1	1	2	2	2
	5	4	0	6	6	5	5	2	5	6	3
	8	4	3	5	7	0	4	2	4	6	9
	2	0	3	1	7	5	4	5	9	4	7
	3	9	5	6	1	9	1	9	8	3	0
	4	2	6	6	2	6	5	2	2	9	6
2	1.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.	0.
4	2	5	7	5	8	4	3	3	7	7	7
	9	4	6	6	3	2	9	7	3	3	5
	5	6	0	4	1	6	3	3	1	6	0
	0	4	3	3	6	8	7	3	0	1	1
	2	9	6	2	5	3	3	7	8	7	7
	3	9	3	1	1	7	9	1	4	6	9
3	1.	0.	0.	0.	1.	0.	0.	0.	0.	0.	1.
0	8	5	6	7	0	4	6	8	6	7	0
	8	1	2	2	9	2	5	1	6	6	3
	6	2	1	7	6	3	7	3	9	9	1
	9	1	6	2	4	0	2	8	9	2	5
	6	2	0	6	3	1	5	2	8	7	1
	8	8	6	5	5	8	9	9	4	4	2
4	1.	0.	0.	0.	1.	0.	1.	1.	0.	0.	0.
8	5	0	0	9	2	0	2	4	0	0	8
	2	8	8	7	7	8	3	2	8	8	9
	0	4	4	0	5	4	5	8	4	4	4
	3	4	4	4	9	4	1	6	4	4	0
	4			0	2		9	8			2
	4			8	8		2	8			8
5	1.	0.	1.	0.	1.	1.	1.	1.	0.	1.	0.
4	6	5	1	9	2	0	2	0	9	1	6
	2	5	3	7	9	5	6	0	1	6	2
	3	2	0	0	8	1	8	8	4	6	2
	4	8	8	4	8	8	2	5	3	4	8
	5	6	0	0	4	8	9	9	9	5	7
	7	4	6	8	2			8	6		9
7	2.	0.	0.	0.	1.	1.	0.	0.	0.	1.	0.
8	0	3	8	9	3	6	8	5	6	2	9
	0	2	9	9	6	3	1	3	7	4	8
	1	8	4	3	7	1	7	5	6	1	9
	5	8	0	3	5	0	6	0	3	5	5
	3	1	2	2	8	9	4	4	4	5	0
	8	6	8	2	4	5	8	2	5	7	3

Fuente: elaboración propia

ANEXO G. PROTOCOLO DETERMINACIÓN BIOMASA CULTIVO MIXTO

Reactivos

- Muestra del caldo de fermentación
- agua destilada estéril

Materiales

- Tubos Falcon de 15 mL

Procedimiento

1. Pesar tubos Falcon en balanza analítica
2. Tomar 5 mL de muestra del caldo de fermentación en los tubos Falcon.
3. Centrifugar a 9000 g durante 10 minutos.
4. Descartar el sobrenadante
5. Adicionar al pellet 5 mL de agua destilada y resuspender la biomasa con ayuda de vortex.
6. Centrifugar a 9000 g por 10 min.
7. Descartar sobrenadante.
8. Reconstituir la biomasa con 5 mL de agua destilada.
9. Centrifugar a 9000 g por 10 min.
10. Descartar sobrenadante.
11. Secar a 75 oC durante 24 horas
12. Pesar el tubo Falcon con el pellet seco, cuantificar.

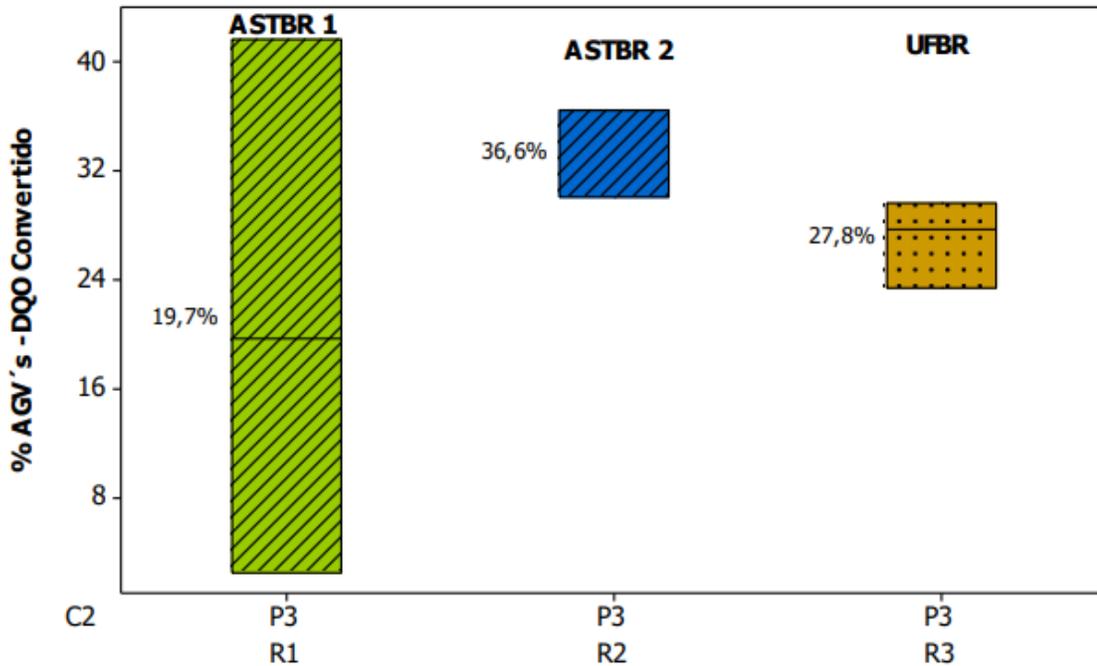
Nota 1: Si se observa que el medio de cultivo en el proceso de centrifugación el medio no tiende a dejar un sobrenadante claro, se recomienda diluir el medio de cultivo con agua destilada antes del primer centrifugado, para facilitar la precipitación de la biomasa. Si se necesita determinar también la concentración de sustratos remanentes en el medio de cultivo tales como amonio, se debe conservar el sobrenadante que resulta de la primera centrifugación.

**ANEXO H.
RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS REACTORES ACIDO GÉNICOS**

RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS REACTORES ACIDO GÉNICOS

En la figura 1 se encuentran los resultados de porcentaje de DQO convertido a ácidos grasos volátiles en los tres reactores.

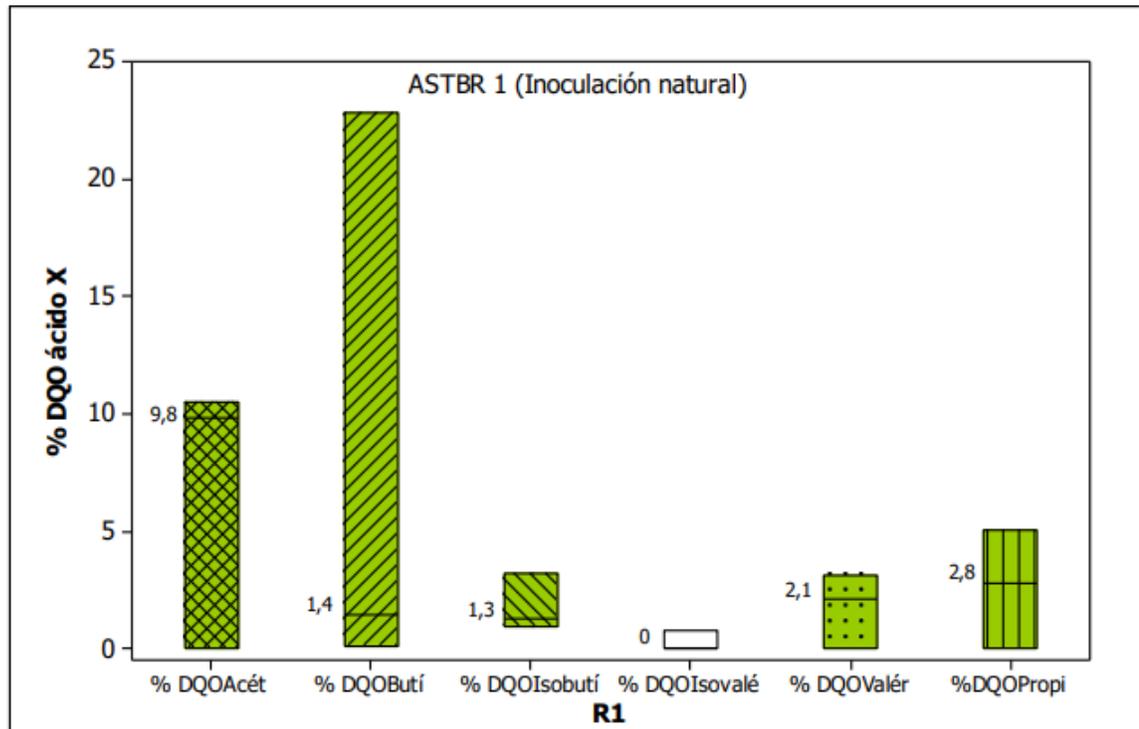
Figura 1: % de DQO AGV's convertidos



Fuente: MORA Carlos Eduardo. Evaluación De La Producción De Ácidos Grasos Volátiles (Agvs) a Diferentes Alturas En Dos Tipos De Reactores Anaerobios (Astbr Y Ufbr.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55

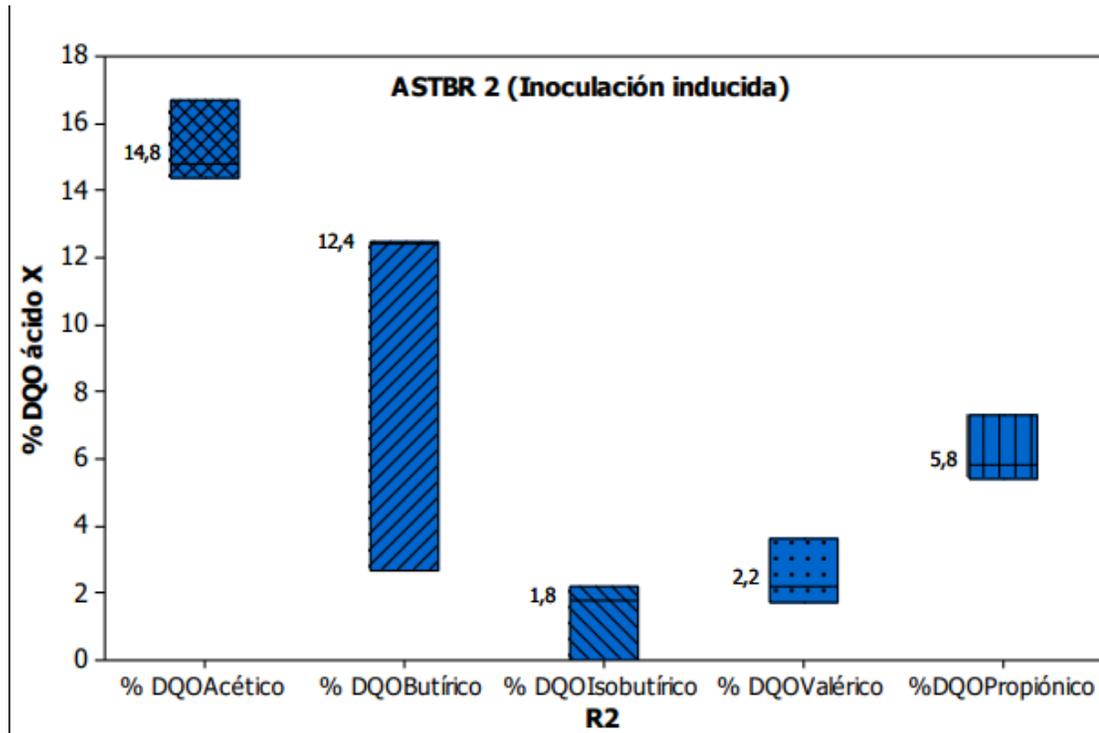
El porcentaje en unidades de DQO, con el que se midió la concentración de cada tipo de ácido en los reactores es evidenciable en las siguientes graficas:

Figura 2: % DQO ácido graso en R1



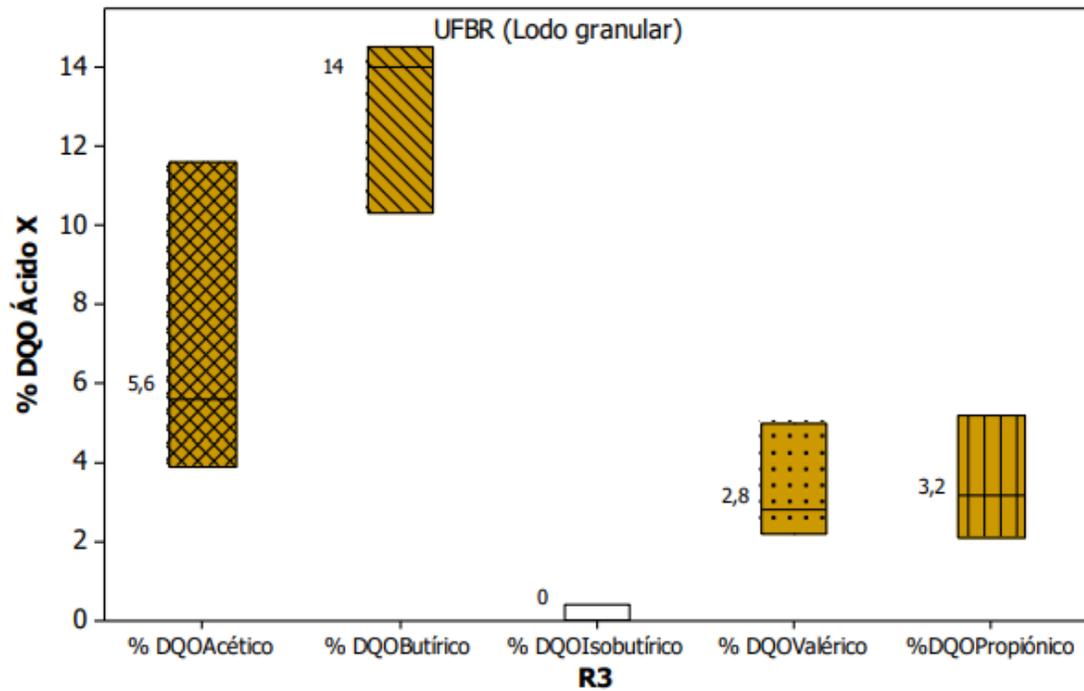
Fuente: MORA Carlos Eduardo. Evaluación De La Producción De Ácidos Grasos Volátiles (Agvs) a Diferentes Alturas En Dos Tipos De Reactores Anaerobios (Astbr Y Ufbr.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55

Figura 3: % DQO ácido graso en R2



Fuente: MORA Carlos Eduardo. Evaluación De La Producción De Ácidos Grasos Volátiles (Agvs) a Diferentes Alturas En Dos Tipos De Reactores Anaerobios (Astbr Y Ufbr.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55

Figura 4: % DQO ácido graso en R3

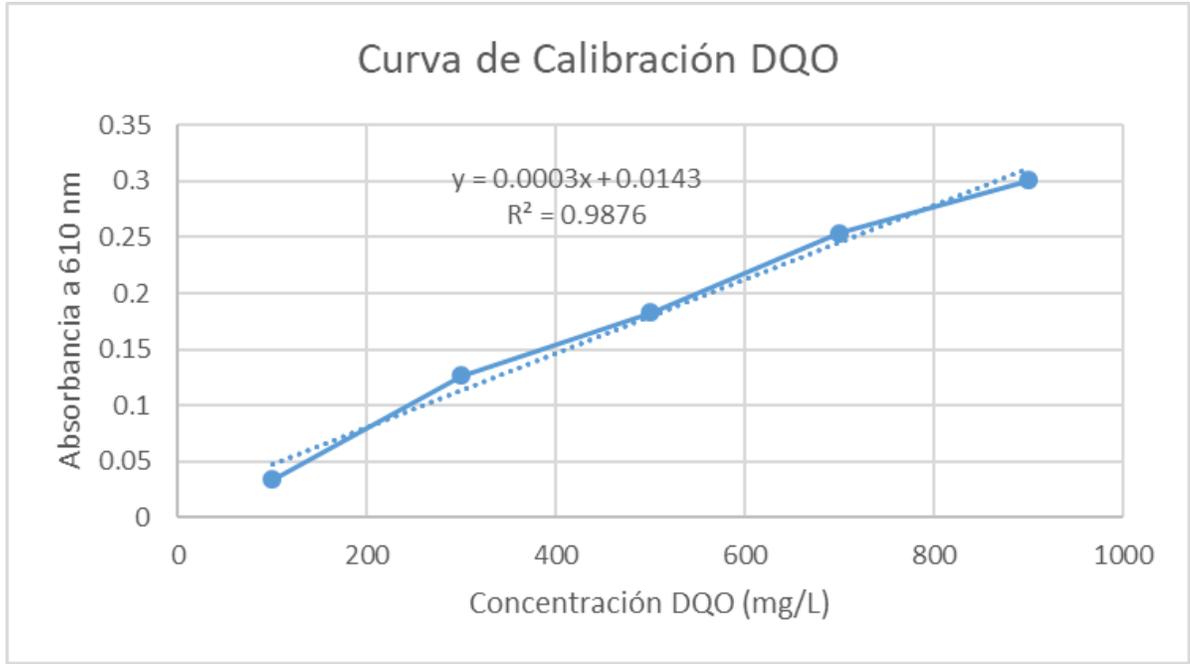


Fuente: MORA Carlos Eduardo. Evaluación De La Producción De Ácidos Grasos Volátiles (Agvs) a Diferentes Alturas En Dos Tipos De Reactores Anaerobios (Astbr Y Ufbr.). Universidad Antonio Nariño, 2017. p. 55

Se observó que el ácido acético fue el que más se generó en los dos reactores ASTBR, mientras que en el UFBR la mayor transformación se dio a ácido butírico.

ANEXO I.
Curva de calibración DQO entre 100 a 900 mg DQO/L

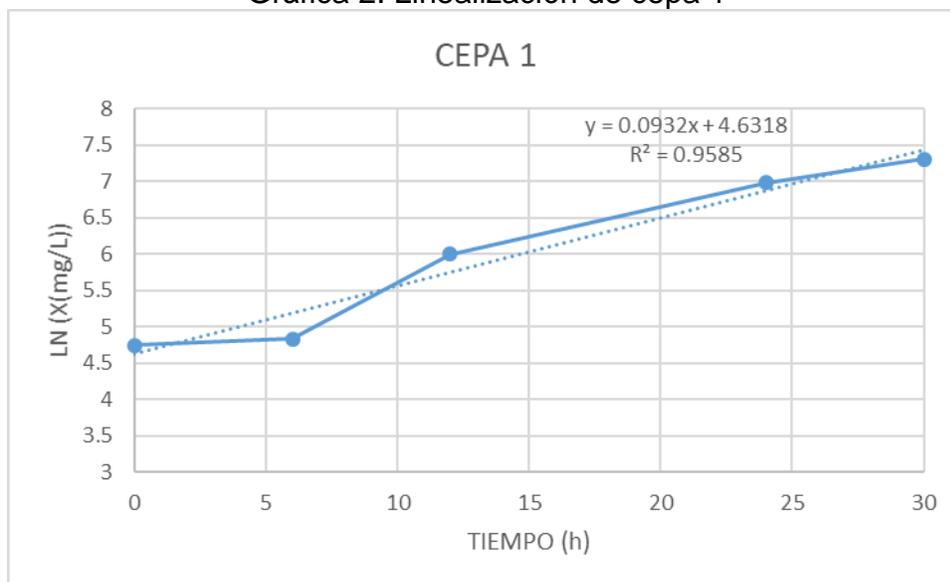
Grafica 1. Curva de calibración DQO (100-900 mgDQO/l)



Fuente: elaboración propia

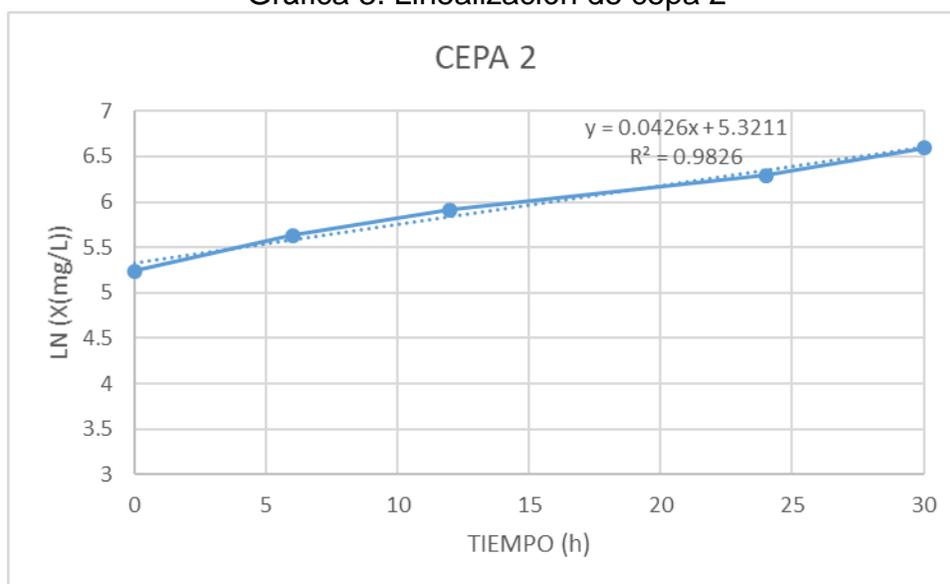
ANEXO J. LINEALIZACIÓN DE CADA UNA DE LAS CEPAS

Gráfica 2. Linealización de cepa 1



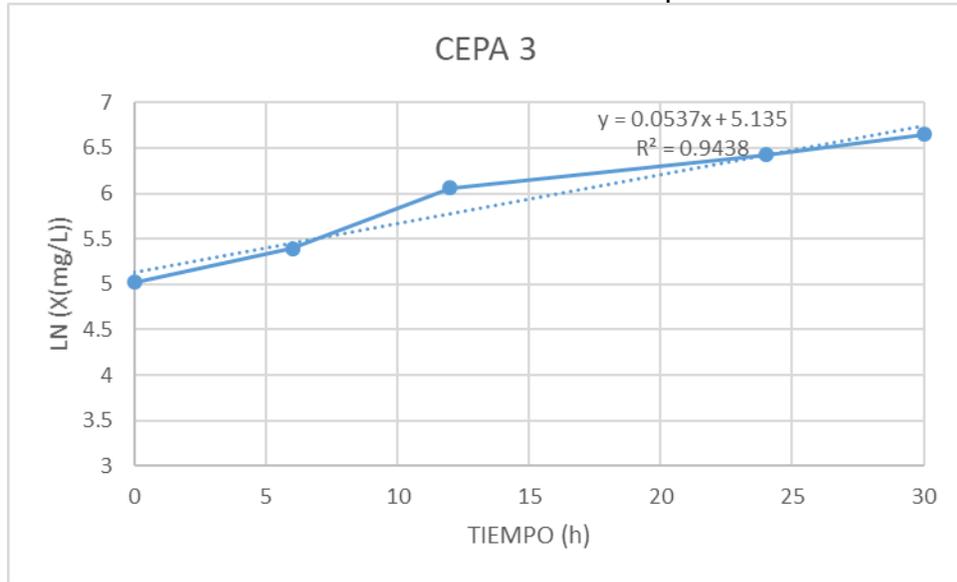
Fuente: elaboración propia

Gráfica 3. Linealización de cepa 2



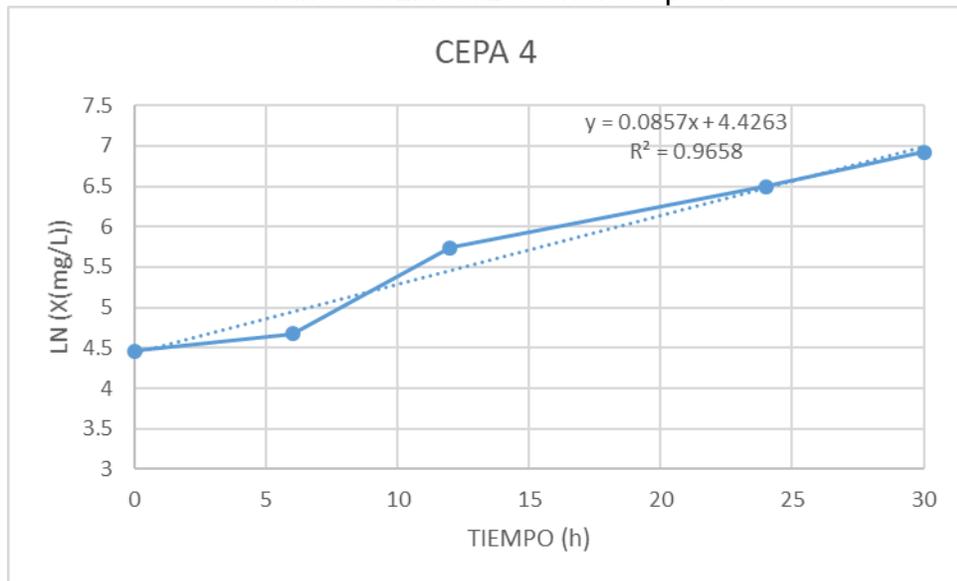
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 4. Linealización de cepa 3



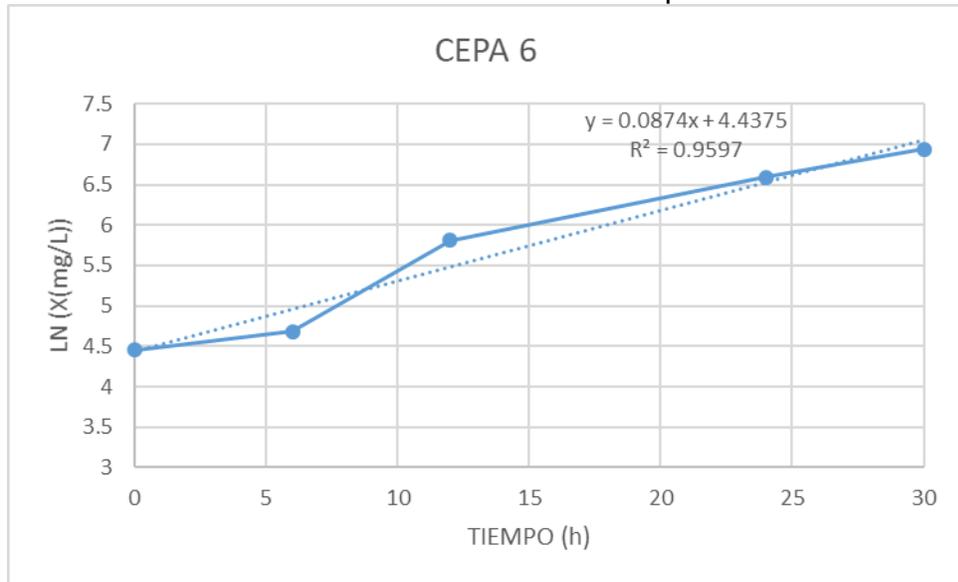
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 5. Linealización de cepa 4



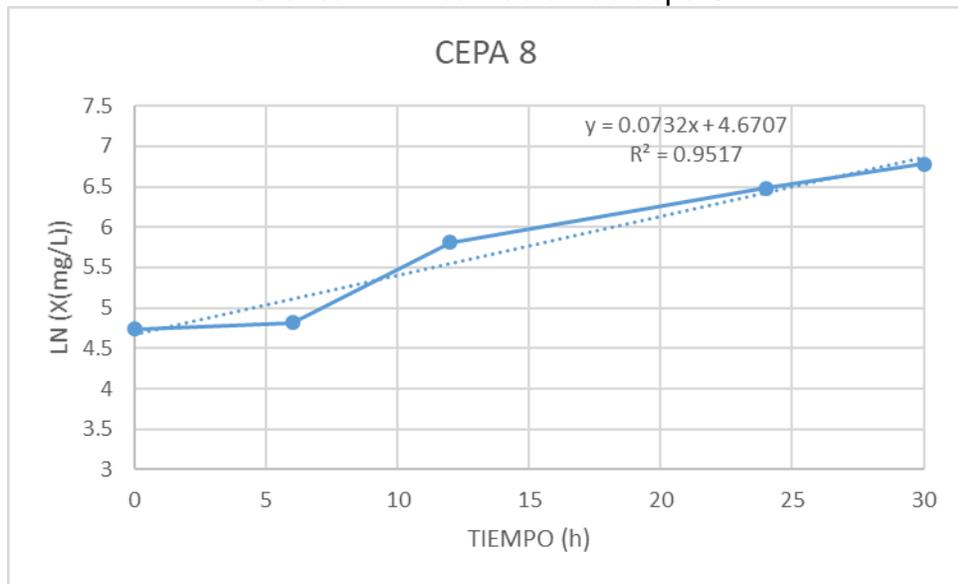
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 6. Linealización de cepa 6



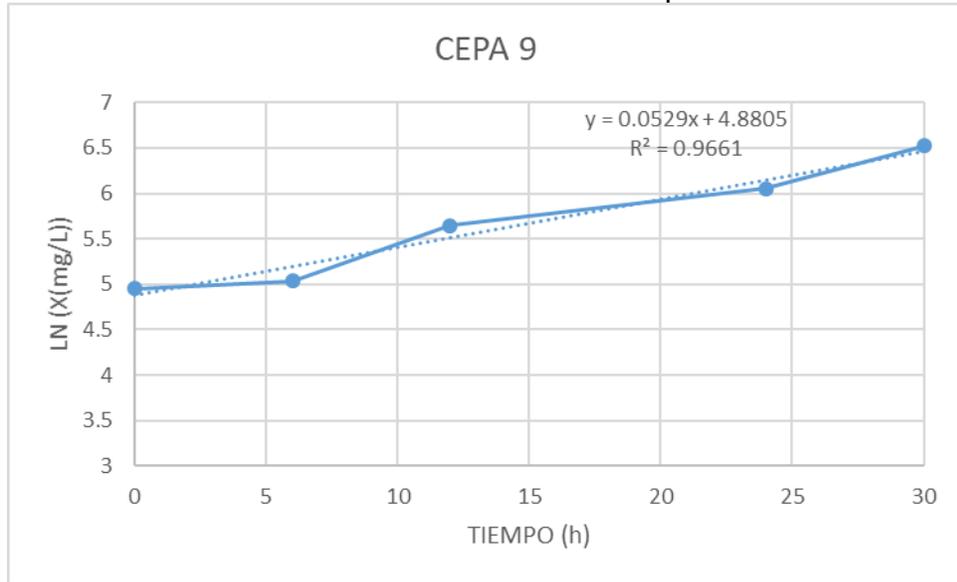
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 7. Linealización de cepa 8



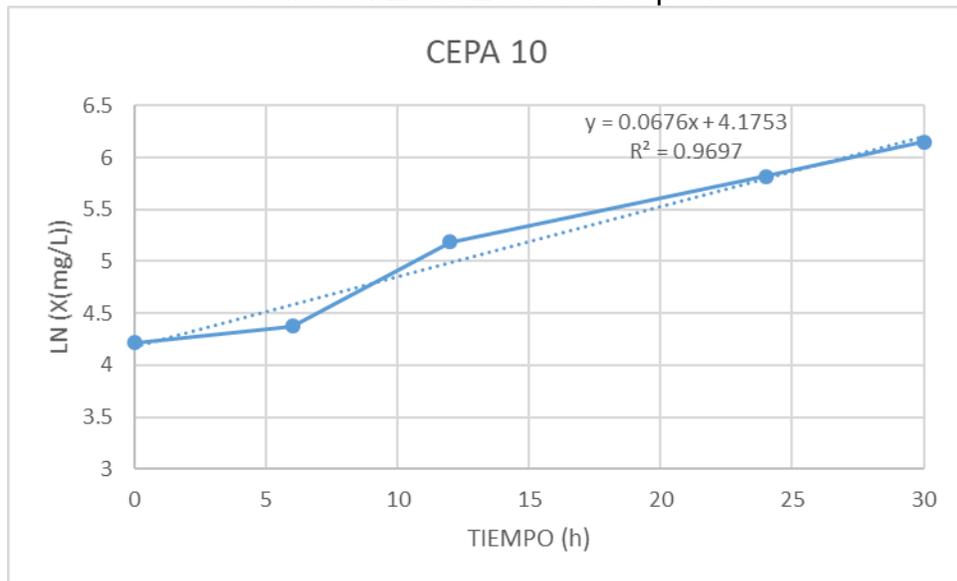
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 8. Linealización de cepa 9



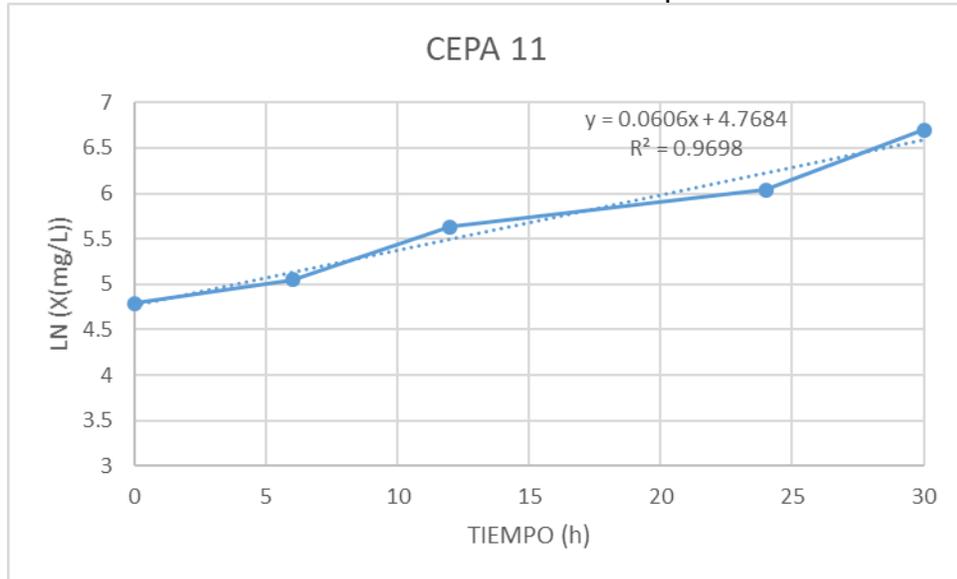
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 9. Linealización de cepa 10



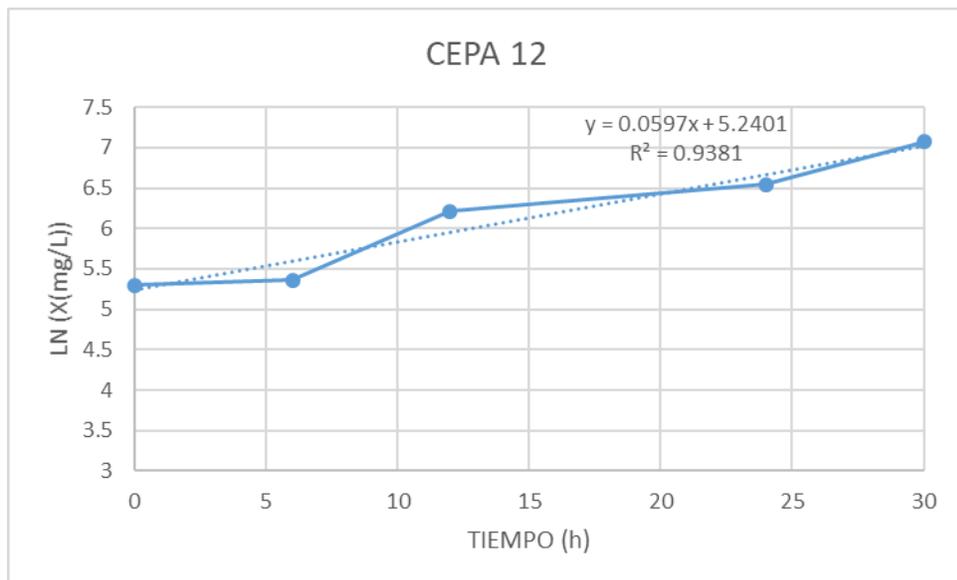
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 10. Linealización de cepa 11



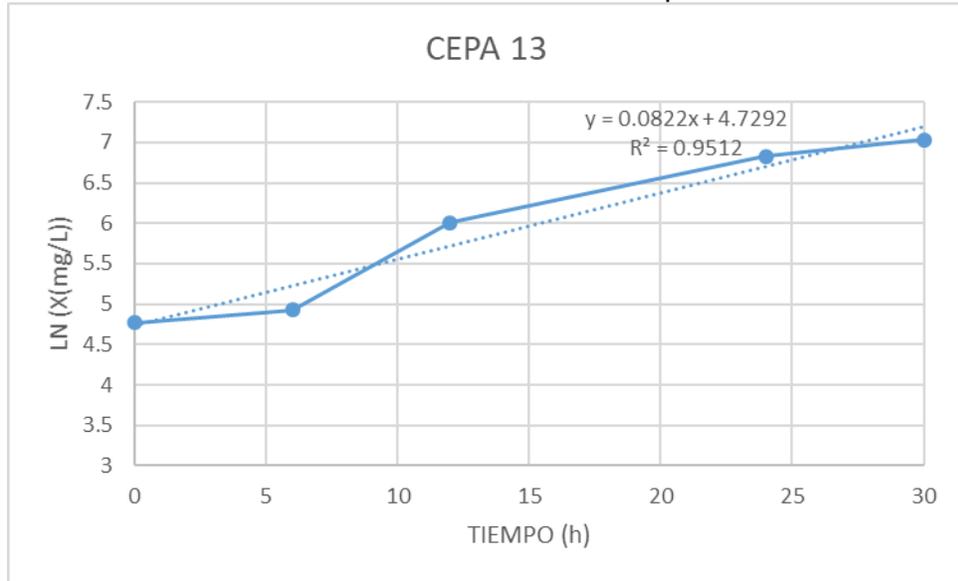
Fuente: Elaboración propia

Gráfica 11. Linealización de cepa 12



Fuente: Elaboración propia

Grafica 12. Linealización de cepa 13



Fuente: Elaboración propia

**ANEXO K.
CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y CONSUMO DE SUSTRATO.**

Tabla 6. Consumo de sustrato medio 1-10% H. Ac

CONSUMO SUSTRATO M1

TIE MP O	ABSORBANCIA			ABSORB ANCIA PROMEDI O	DQO DILU CIÓN 2:2	DQ O	INCREMENT O CONSUMO SUSTRATO
0	0	0	0	0,2	0,2685	847,3	169
	,2	,2	,2	67			
	6	6	6				
	6	8	7				
	0	0	0	0,2			
12	,2	,2	,2	70	0,2653	836,7	167
	7	7	7	72			
	0	0	0				
	2	2	1				
	0	0	0	0,2			
24	,2	,2	,2	59	0,2623	826,7	165
	5	5	5	61			
	9	9	9				
	0	0	0				
	2	2	2	0,2			
36	,2	,2	,2	64	0,2580	812,3	162
	6	6	6	58			
	0	0	2				
	0	0	0				
	,2	,2	,2	0,2			
48	,2	,2	,2	58	0,2573	810,1	162
	6	5	5	58			
	0	7	7				
	0	0	0				
	,2	,2	,2	0,2			
	,2	,2	,2	57		111	0,22
	5	5	5				
	7	8	8				
	0	0	0				
	,2	,2	,2				

	5 4	5 9	5 8					
60	0 , 2 5 7	0 , 2 5 6	0 , 2 5 6	0,2 56	0,2570	809,0 000	161 8,00 00	2,22
	0 , 2 5 7	0 , 2 5 7	0 , 2 5 9	0,2 58				
72	0 , 2 5 6	0 , 2 5 7	0 , 2 5 5	0,2 56	0,2559	805,3 278	161 0,65 56	7,34
	0 , 2 5 7	0 , 2 5 4	0 , 2 5 7	0,2 56				

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7. Crecimiento microbiano medio 1-10% H.Ac

CRECIMIENTO MICROBIANO MEDIO 1				
TIE MP O	ABSORBANCIA	X (biomasa a (mg/L))	Ln(X(mg/L))	INCREMENTO DE BIOMASA
0	0,126	630	6,44571982	-
12	0,177	885	6,78558765	255
24	0,217	1085	6,98933527	200
36	0,335	1675	7,42356844	590
48	0,389	1945	7,57301726	270
60	0,421	2105	7,65207075	160
72	0,379	1895	7,54697412	-210
	BIOMASA PRODUCIDA	1265	ΣINCREMENTOS BIOMASA	1265

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Consumo de sustrato m2-15% H. Ac

CONSUMO SUSTRATO M2								
TIE MP O	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	DQO DILUCIÓN 2:2	D Q O	INCREMENTO CONSUMO SUSTRATO
0	0 , 2	0 , 2	0 , 2	0 , 2	0,2670	842,3 333	1 6 8	

	6	5	6	6				4
	0	9	0	0				,
	0	0	0	0				7
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	7	7	7	7				
	4	3	6	4				
12	0	0	0	0	0,2618	825,1	1	34,44
						111	6	
	,	,	,	,			5	
	2	2	2	2			0	
	6	6	6	6				
	5	3	4	4				
	0	0	0	0			,	
	,	,	,	,			2	
	2	2	2	2				
	5	5	6	6				
	9	9	1	0				
24	0	0	0	0	0,2537	797,8	1	54,44
						889	5	
	,	,	,	,			9	
	2	2	2	2			5	
	4	4	5	4				
	9	9	0	9			,	
	0	0	0	0			8	
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	5	5	5	5				
	8	8	8	8				
36	0	0	0	0	0,2498	785,1	1	25,56
						111	5	
	,	,	,	,			7	
	2	2	2	2			0	
	3	3	4	4				
	8	9	6	1			,	
	0	0	0	0			2	
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	5	5	5	5				
	9	9	8	9				
48	0	0	0	0	0,2482	779,5	1	11,11
						556	5	
	,	,	,	,			5	
	2	2	2	2			9	
	4	4	4	4				
	9	9	7	8			,	
	0	0	0	0			1	
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	5	4	4	4				
	0	6	8	8				
60	0	0	0	0	0,2451	769,4	1	20,12
						944	5	
	,	,	,	,			3	
	2	2	2	2			9	
	4	4	4	4				
	5	4	6	5			,	
	0	0	0	0			0	
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	4	4	4	4				
	6	6	5	6				
72	0	0	0	0	0,2447	767,8	1	3,21
						889	5	

2	2	2	2	3
4	4	4	4	5
5	4	5	5	
0	0	0	0	8
2	2	2	2	
4	4	4	4	
5	4	5	5	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9. Crecimiento microbiano medio 2-15% H.Ac

CRECIMIENTO MICROBIANO MEDIO 2				
TIE MP O	ABSORBANCIA	X (biomasa a (mg/L))	Ln(X(mg/L))	INCREMENTO DE BIOMASA
0	0,152	760	6,63331843	
12	0,29	1450	7,27931884	690
24	0,47	2350	7,76217061	900
36	0,598	2990	8,00302867	640
48	0,645	3225	8,07868823	235
60	0,737	3685	8,2120258	460
72	0,69	3450	8,14612951	-235
	BIOMASA PRODUCIDA	2690	ΣINCREMENTOS BIOMASA	2690

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10 Consumo de sustrato medio 3-20% H.Ac

CONSUMO SUSTRATO M3								
T I E M P O	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	DQO DILUCIÓN N 2:2	D Q O	INCREMENTO CONSUMO SUSTRATO
0	0	0	0	0	0,2598	818,444	16	-
						4	36	
	2	2	2	2			,9	
	5	5	5	5				
	8	8	7	8				
	0	0	0	0				
	2	2	2	2				

	6	6	6	6				
	3	3	0	2				
1	0	0	0	0	0,2571	809,277	16	18,33
2	,	,	,	,		8	18	
	2	2	2	2			,6	
	5	5	5	5				
	7	7	7	7				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	5	5	5	5				
	7	7	7	7				
2	0	0	0	0	0,2477	777,944	15	62,67
4	,	,	,	,		4	55	
	2	2	2	2			,9	
	4	4	5	4				
	8	9	0	9				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	4	4	4	4				
	6	8	5	6				
3	0	0	0	0	0,2427	761,222	15	33,44
6	,	,	,	,		2	22	
	2	2	2	2			,4	
	4	4	4	4				
	4	4	3	4				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	4	4	4	4				
	1	0	4	2				
4	0	0	0	0	0,2420	758,944	15	4,56
8	,	,	,	,		4	17	
	2	2	2	2			,9	
	4	4	4	4				
	1	2	3	2				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	4	4	4	4				
	2	1	3	2				
6	0	0	0	0	0,2393	749,833	14	18,22
0	,	,	,	,		3	99	
	2	2	2	2			,7	
	3	4	3	4				
	8	3	8	0				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				
	2	2	2	2				
	3	4	3	3				
	9	0	8	9				
7	0	0	0	0	0,2391	749,333	14	1,00
2	,	,	,	,		3	98	
	2	2	2	2			,7	
	3	3	4	3				
	9	7	1	9				
	0	0	0	0				
	,	,	,	,				

2	2	2	2
4	4	3	3
0	1	7	9

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11. Crecimiento microbiano medio 3- 20% H.Ac

CRECIMIENTO MICROBIANO MEDIO 3				
TIE MP O	ABSORBA NCIA	X (biomasa (mg/L))	Ln(X(m g/L))	INCREMENTO DE BIOMASA
0	0,122	610	6,4134 5896	
12	0,197	985	6,8926 4164	375
24	0,405	2025	7,6133 2498	1040
36	0,564	2820	7,9444 9216	795
48	0,576	2880	7,9655 4557	60
60	0,652	3260	8,0894 8247	380
72	0,642	3210	8,0740 2622	-50

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO L.
ECUACIÓN LOGÍSTICA**

Ecuación 1: Ecuación logística

$$X = \frac{X_o X_m e^{\mu t}}{(X_m - X_o + X_o e^{\mu t})}$$

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12. Datos ecuación Logística

X _o	6,324229226
X _m	8,249494865
μ	0,058594183

TIEMPO	X	X CAL	dif
0	6,371611847	6,324229226	0,002245113
12	7,025538315	7,169100823	0,020610194
24	7,779048645	7,676789122	0,01045701
36	8,003028666	7,955686587	0,002241273
48	8,078688229	8,101386312	0,000515203
60	8,212025805	8,175505408	0,001333739
72	8,14612951	8,212700978	0,00443176
RMS			0,094278297

Fuente: Elaboración propia

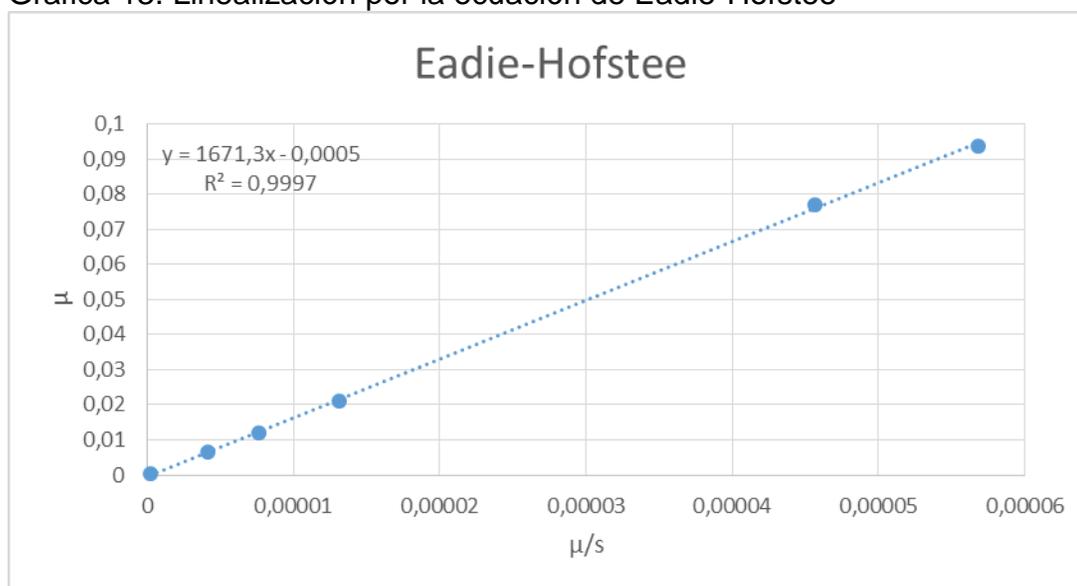
ANEXO M. ECUACIÓN EADIE-HOFSTEE

Tabla 13. Datos Ecuación Eadie-Hofstee

Tiempo	$\mu = (\ln(X(t)) - \ln(X_0)) / t - \mu$	μ/s	μ
0	0,0769	4,5661E-05	0,0769
12	0,0937	5,6782E-05	0,0937
24	0,0209	1,3110E-05	0,0209
36	0,0065	4,1711E-06	0,0065
48	0,0119	7,6238E-06	0,0119
60	0,0003	2,2041E-07	0,0003

Fuente: Elaboración propia

Grafica 13. Linealización por la ecuación de Eadie-Hofstee



Fuente: Elaboración propia

**ANEXO N.
REPETICIÓN DE DATOS CURVA DE CALIBRACIÓN CULTIVO MIXO**

Tabla 13: Repetición de datos curva de calibración cultivo mixo

	W inicial	W final	ΔW	PROMEDIO $\Delta W(g)$	PROMEDIO $\Delta W(g)/ml$	PROMEDIO $\Delta W(mg)/L$	D.O
t0	25,6861	89,6364	0,0008	0,0021	0,0004	415,6	0,1320
	89,4529	89,4559	0,0031				
	32,4411	32,4434	0,0023				
t2	92,7262	92,7304	0,0042	0,0042	3,0000	846,7	0,2243
	90,9674	90,9721	0,0047				
	88,6581	88,6619	0,0038				
t3	90,4230	90,4291	0,0061	0,0063	4,0000	1253,3	0,3003
	91,6433	91,6502	0,0069				
	82,3845	82,3903	0,0058				
t4	25,6861	25,6952	0,0091	0,0091	5,0000	1813,3	0,4047
	20,0048	20,0135	0,0087				
	23,0044	23,0138	0,0094				
t5	94,1350	94,1451	0,0100	0,0134	6,0000	2672,7	0,5697
	85,8121	85,8257	0,0136				
	94,8548	94,8712	0,0164				
t6	29,8075	29,8231	0,0156	0,0156	7,0000	3120,0	0,6250
	32,8179	32,8324	0,0145				
	30,7374	30,7541	0,0167				

Fuente: Elaboración propia