



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Revalorización de ácidos grasos volátiles y/o hidrógeno y CO₂ en la
producción de bioplásticos usando bacterias fotosintéticas purpuras
(PPB)**

Autor: Patricia Belen Pacheco Umpire
Tutor: Dra. Sara Cantera Ruiz de Pellón
Tutor: Dra. María del Rosario Rodero Raya

Valladolid, septiembre, 2024



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

MASTER EN INGENIERIA AMBIENTAL

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL
ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Revalorización de ácidos grasos volátiles y/o hidrógeno y CO₂ en la
producción de bioplásticos usando bacterias fotosintéticas purpuras
(PPB)**

Autor: Patricia Belen Pacheco Umpire
Tutor: Dra. Sara Cantera Ruiz de Pellón
Tutor: Dra. María del Rosario Rodero Raya

Valladolid, septiembre, 2024

Resumen

La producción de plásticos biodegradables en forma de polihidroxialcanoatos (PHA), especialmente a partir de efluentes líquidos o gaseosos procedentes de desechos orgánicos como sustratos renovables está ganando interés. El presente trabajo tiene como objetivo principal investigar la posibilidad de la acumulación de PHA en cultivos de Bacterias Fotótroficas Púrpuras (PPBs) concretamente PHB (Poli-3-hidroxitirato) y PHV (Poli-3-hidroxitirato) a partir de ácidos grasos volátiles (crecimiento heterótrofo) e hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂, crecimiento autótrofo), así como la influencia de su producción cuando hay una limitación de nutrientes de nitrógeno y magnesio. Los resultados indicaron una buena degradación de sustrato para las condiciones de heterótrofas y tasa de eliminación H₂ para condición autótrofos con rendimientos de eliminación de 80% ($\text{g DQO}_{\text{Consumido}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{Inicial}}$) y 75% ($\text{g DQO}_{\text{H}_2\text{consumido}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{H}_2 \text{ Inicial}}$) respectivamente. La producción de PHA en condiciones heterótroficas fue de 14.15% g PHB g⁻¹ biomasa superior a un 50% a las condiciones autótrofas. En este escenario, dentro de la composición fraccionada de PHA se mostró que el PHB (98%) se formaba en mayor concentración en comparación con PHV (2%). Las condiciones limitantes de nitrógeno exhibieron la mayor acumulación de PHA, logrando una concentración máxima de 25% g PHB g⁻¹ biomasa bajo condiciones heterótrofas y en condición autótrofas de 18% g PHB g⁻¹ biomasa, logrando una eficiente conversión del carbono en PHA frente al control. En cuanto la limitación de Mg²⁺ se registró un efecto positivo para la condición autótrofica frente a la condición heterótrofica llegando alcanzar una producción máxima de 21% g PHB g⁻¹ biomasa de PHB un aumento de 3 veces a la condición de control y un efecto negativo en las condiciones heterótroficas decayendo la producción de PHA en 6% g PHB g⁻¹ biomasa. Estos hallazgos proporcionan información sobre nuevas estrategias para una efectiva conversión a partir de diferentes fuentes de carbono en bioplásticos y muestra resultados prometedores para una implementación a mayor escala de una fotobiorrefinería basada en PPB, que podría valorizar los desechos orgánicos urbanos para producir diferentes productos de alto valor agregado en el contexto de la bioeconomía circular.

Palabras claves: Bacterias Fotótroficas Púrpuras (PPB), PHA, Heterótrofico y Autótrofos

Abstract

The production of biodegradable plastics in the form of polyhydroxyalkanoates (PHA), especially from liquid or gaseous effluents originating from organic waste as renewable substrates is gaining interest. The main objective of this work is to investigate the possibility of PHA accumulation in Purple Phototrophic Bacteria (PPB) cultures, specifically PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) and PHV (Poly-3-hydroxyvalerate) from volatile fatty acids (heterotrophic growth) and hydrogen (H₂) and carbon dioxide (CO₂, autotrophic growth), as well as the influence of their production when there is a limitation of nitrogen and magnesium nutrients. The results indicated a good substrate degradation for heterotrophic conditions and H₂ removal rate for autotrophic condition with removal efficiencies of 80% ($\text{g COD}_{\text{Consumed}} \text{g}^{-1} \text{Initial COD}$) and 75% ($\text{g COD}_{\text{Consumed}} \text{g}^{-1} \text{COD}_{\text{Inicial}}$) respectively. PHA production under heterotrophic conditions was 14.15% g PHB g⁻¹ biomass, which was 50% higher than under autotrophic conditions. In this scenario, within the fractionated composition of PHA, it was shown that PHB (98%) was formed in a higher concentration compared to PHV (2%). Nitrogen-limiting conditions exhibited the highest accumulation of PHA, reaching a maximum concentration of 25% g PHB g⁻¹ biomass under heterotrophic conditions and 18% g PHB g⁻¹ biomass under autotrophic conditions, achieving an efficient conversion of carbon into PHA compared to the control. Regarding Mg²⁺ limitation, a positive effect was recorded for the autotrophic condition compared to the heterotrophic condition, reaching a maximum production of 21% g PHB g⁻¹ PHB biomass, a 3-fold increase over the control condition, and a negative effect in heterotrophic conditions, decreasing PHA production by 6% g PHB g⁻¹ biomass. These findings provide information on new strategies for an effective conversion from different carbon sources into bioplastics and show promising results for a larger-scale implementation of a PPB-based photobiorefinery, which could valorize urban organic waste to produce different high value-added products in the context of the circular bioeconomy.

Keywords: Purple Phototrophic Bacteria (PPB), PHA, Heterotrophic and Autotrophic

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo reconocimiento y agradecimiento a mis tutoras Dra. Sara Cantera Ruiz de Pellón y la Dra. María del Rosario Rodero Raya por su invaluable esfuerzo, orientación brindada en el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo de la paciencia y comprensión hacia mi persona. Sus conocimientos y experiencias han contribuido de forma invaluable para mi formación como profesional y personal, la pasión que me han transmitido por la investigación han sido fuente inspiración para mi crecimiento académico que deseo continuar.

De igual forma, expresar mi agradecimiento especial al Dr. Raúl Muñoz Torre por los conocimientos brindados y de la pasión que tiene por la investigación al cual aspiro seguir sus pasos como investigador y la Dra. Mónica Coca Sanz por toda la orientación y seguimiento constante de inicio a fin el desarrollo de la maestría sin su apoyo incondicional no hubiera sido posible este sueño. A todos los profesionales y amigos que logré conocer en ISP, han hecho que mi estadía sea muy grata y llena de mucho aprendizaje experimental.

Agradecer también a toda mi familia, por estar siempre a mi lado y brindarme su cariño y aliento en los momentos más difíciles. Sin su comprensión y apoyo incondicional esto no sería posible, gracias por todo el amor que me han brindado, esencialmente papá y mamá que son mi motivación constante.

Quiero también hacer llegar mi más profundo agradecimiento al Dr. Javier Paul Montalvo Andia quien me ha brindado la oportunidad de poder trabajar en lo que más me apasiona y de poder cursar esta maestría, su apoyo constante es invaluable y de igual forma a todas las personas que conforman el grupo investigación del CTA en UCSP-Perú, pero especialmente a mis amigos Lalo, Rosa y Katty quienes estuvieron presentes en cada paso, me ofrecieron sus ánimos constantes y me llenaron de grandes momentos de alegría, pero sobre todo agradecer especialmente a mi compañero y amigo incondicional Cristofer Chambi el cual me acompañó en esta aventura y me ha apoyado en todo momento.

INDICE

Resumen	3
Abstract	4
Agradecimientos	5
Índice de Gráficas.....	8
INTRODUCCIÓN.....	1
1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)	2
1.1. Clasificación de PHA	3
1.2. Síntesis de PHA.....	4
2. PRODUCCIÓN DE PHA.....	4
2.1. Vías de biosíntesis de PHA	4
2.1.1. Ruta I	5
2.1.2. Ruta II.....	5
2.1.3. Ruta III.....	6
2.1.4. Ruta a partir de CO ₂	7
3. BACTERIAS FOTOSINTETICAS PURPURAS (PPB)	8
3.1. Fotoheterotrofia.....	10
3.2. Fotoautotrofia.....	10
4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PHA	11
4.1. Cultivo bacteriano de PPB	11
4.2. Sustrato.....	12
4.3. Limitación de nutrientes.....	12
OBJETIVO	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos	14
MATERIALES & MÉTODOS	15
5.1. Inoculo de bacterias fotosintéticas purpuras PPB	15
5.1.1. Enriquecimiento Heterotrófico	15
5.1.2. Enriquecimiento Autotrófico	15
5.2. Medio de cultivo	16
5.2.1. Alimentación Heterotrófica	16
5.2.2. Alimentación Autotrófica	16
5.2.3. Experimentos bajo deficiencia de nutrientes	16
5.3. Configuración experimental	17

5.4. Procedimiento de muestreo	18
5.5. Procedimientos analíticos.....	19
5.5.1. Crecimiento y productividad de biomasa PPB	19
5.5.2. Demanda Química de Oxígeno Total y Soluble.....	20
5.5.3. Cuantificación del consumo de gas	21
5.5.4. Determinación de PHA y análisis de GC-MS	21
5.6. Métodos estadísticos.....	22
RESULTADOS & DISCUSIÓN	23
Evaluación del crecimiento bacteriano bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes	23
Evaluación de la eliminación de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes	26
Evaluación de la producción de PHB y PHV bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes	28
Evaluación del efecto de la limitación de N en el crecimiento bacteriano bajo condiciones heterotróficas y autotróficas	30
Evaluación del efecto de la limitación de N en la eliminación de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas	32
Evaluación del efecto de la limitación de N en la producción de PHB y PHB bajo condiciones heterotróficas y autotróficas	33
Evaluación del efecto de la limitación de Mg ⁺² en el crecimiento bacteriano y pH bajo condiciones heterotróficas y autotróficas	34
Evaluación del efecto de la limitación de Mg ⁺² en la remoción de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas	36
Evaluación del efecto de la limitación de Mg ⁺² en la producción de PHB y PHB condiciones heterotróficas y autotróficas	37
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	49

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura general de monómero PHA	2
Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de PHA	6
Figura 3. rutas metabólicas para la biosíntesis de PHA a partir de CO ₂	7
Figura 4. Representaciones simplificadas de los modos metabólicos de PPB de acuerdo con fuentes de energía y carbono y aceptores de electrones	9
Figura 5. Representadas de los modos dominantes bajo la presencia/ausencia de materia orgánica, oxígeno o luz.....	10
Figura 6. Esquemización de la configuración experimental.....	18

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Crecimiento bacterianos y perfil de pH de las PPB en condiciones heterotróficas y autotróficas.....	24
Gráfica 2. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H ₂ en condiciones heterótroficas y autótrofas.....	26
Gráfica 3. Producción de PHB y PHV en condiciones heterotróficas y autótrofas de PPB.....	28
Gráfica 4. Crecimiento bacterianos y perfil de PH de las PPB con limitación de N en condiciones heterotróficas y autotróficas	31
Gráfica 5. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H ₂ con limitación de N en condiciones heterótroficas y autótrofas.....	32
Gráfica 6. Producción de PHB y PHV con limitación de N en condiciones heterotróficas y autótrofas de PPB	33
Gráfica 7. Crecimiento bacterianos y perfil de PH de las PPB con limitación de Mg ⁺² en condiciones heterotróficas y autotróficas	35
Gráfica 8. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H ₂ con limitación de Mg ²⁺ en condiciones heterótroficas y autótrofas.....	37
Gráfica 9. Producción de PHB y PHV con limitación de Mg ²⁺ en condiciones heterotróficas y autótrofas de PPB	38

INTRODUCCIÓN

La industria de plásticos petroquímicos es muy importante e indispensable en la era moderna ya que ha registrado el uso diario de más 500 g de plástico por día al presentar características notables de resistencia, flexibilidad y durabilidad. Sin embargo, el uso indiscriminado de plásticos ha provocado una creciente crisis ambiental global debido a la contaminación plástica convirtiéndose una amenaza persistente para la salud humana, los ecosistemas y la vida silvestre, tomando mayor preocupación la fragmentación gradual de los plásticos lo que ha generado lo hoy conocido como “microplásticos” (Wang et al. 2021). Alrededor del 99% de todos los plásticos son derivados de fuentes fósiles, y dichas industrias petroquímicas proyectan triplicar esta producción para el 2060 (OCDE 2022). Por lo tanto, es crucial la búsqueda de alternativas más verdes para reducir significativamente el impacto ambiental. En este contexto, los bioplásticos han surgido como algunas de las opciones más sostenibles debido a que pueden producirse a partir de recursos renovables, son biodegradables y presentan propiedades mecánicas y térmicas similares a los plásticos derivados del petróleo.

Son estos polímeros de base biológica utilizados como bioplásticos los cuales pueden ser subdivididos en tres tipos, biopolímeros termoplásticos de almidón (TPS) a base de plantas, bio-monómeros polimerizados a partir del ácido poliláctico (PLA), y los biopolímeros extraíbles a partir de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) (Meereboer, Misra, and Mohanty 2020). Estos dos últimos plásticos el PLA y PHA generan interés al presentar propiedades biodegradables a diferencia de los TPS, aunque los biopolímeros de PLA son compostables, no se pueden descomponer en ambientes marinos de la misma manera que los PHA (de Castro et al. 2022). Esta propiedad es crucial y esencial si es que se desea avanzar en prácticas de economía circular, ya que los polímeros biodegradables pueden permitir una opción más sostenible especialmente si la producción de biodegradación se convierte en la entrada de producción para el mismo polímero en un marco de tiempo razonable dentro del ciclo biológico (Braungart, McDonough, and Bollinger 2007).

Recientemente, ha crecido el interés en la investigación sobre la producción de PHA debido a sus propiedades fisicoquímicas similares a los plásticos derivados del petróleo juntos con las ventajas adicionales en términos de su naturaleza biodegradable,

biocompatible, versátil y no tóxica para aplicaciones en biocompuestos, suplementos nutricionales, materiales de embalaje, implantes biomédicos, ingeniería de tejidos, entre otros (Yadav et al. 2020, 2021). En el entorno industrial, comúnmente el PHA se produce por fermentación heterotrófica mediante el empleo de microorganismos aerobios puros que se alimentan a partir de sustratos como la glucosa, la fructosa o ácido propiónico (Kourmentza et al. 2017; Mannina et al. 2020). Sin embargo, el precio de la producción comercial de PHA es muy alto alrededor de 2.2–5.0 € por kg mientras que el precio del plástico fósil como el tereftalato de polietileno (PET) o polietileno de baja densidad (LDPE) este entre 0.8 a 1.0 € por kg (Liu et al. 2021).

1. POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son una clase de biopolímeros que se producen de manera natural por ciertos microorganismos, particularmente los PHA son compuestos poliésteres alifáticos que pueden ser producidos por una variedad de bacterias bajo condiciones limitantes de nutrientes, este tipo de moléculas se almacenan dentro del citoplasma de las bacterias el cual se obtiene mediante un proceso de extracción.

Desde un punto de vista químico, los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres lineales que se componen de monómeros de hidroxiácidos (R-CH(OH)-COOH), donde "R" representa un grupo alquilo de cadena variable (Figura 1). Estos polímeros se forman mediante la polimerización de estos monómeros a través de enlaces éster entre los grupos hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH). La fórmula que representa un compuesto de PHA es la descrita en la Ecuación 1.

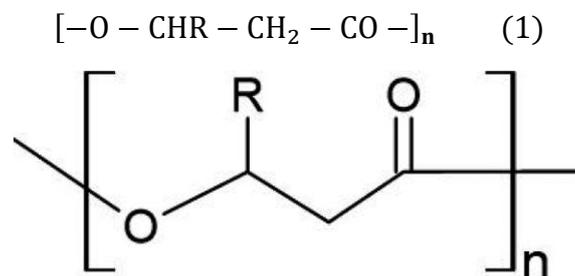


Figura 1. Estructura general de monómero PHA

El número de unidades repetitivas, representado por "n", determina el peso molecular del polímero y donde "R" es un grupo alquilo que puede variar en longitud y estructura, lo que da lugar a diferentes tipos de PHA con propiedades físicas y químicas distintas.

1.1. Clasificación de PHA

En la actualidad se han identificado más de 100 tipos de monómeros de PHA, lo que da lugar a miles de combinaciones potenciales de copolímeros (Steinbüchel 1995). Por lo que usualmente se puede clasificar a los PHA mediante la del número de carbonos, es decir de longitud de cadena corta (4-5 átomos de carbono “scl: short chain length”), longitud de cadena mediana (6-14 átomos de carbono “mcl: médium chain length”) y de longitud de cadena larga (15 a más átomos de carbono “lcl: long chain lenght”). Los PHAs también se pueden presentar como combinaciones, copolímeros, de mcl y scl, dicha conjunción le da propiedades superiores en comparación con los homopolímeros.

Dentro de los tipos de PHA, los de cadena corta son los más frecuentes en toda la producción industrial mediante microorganismos y están más ampliamente disponibles. Los más comunes son el poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) y poli(3-hidroxi valerato) (PHV), y en caso de copolímeros el poli(hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV). A continuación, se describen los PHA más comunes con la respectiva clasificación en la Tabla 1.

Tabla 1.

Tipos de PHA más comunes y el monómero constituyente

Clasificación	Polímero	Grupo Funcional	Abreviatura	N° de Carbono
Cadena corta	Poli(3-hidroxi propionato)	3HP	PHP	3
	Poli(3-hidroxi butirato)	3HB	PHB	4
	Poli(3-hidroxi valerato)	3HV	PHV	5
	Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)	3HB/3HV	PHBV	4 y 5
Cadena media	Poli(3-hidroxi hexanoato)	3Hx	PHHx	6
	Poli(3-hidroxi octanoato)	3HO	PHO	8
	Poli(3-hidroxi nonanoato)	3HN	PHN	9
	Poli(3-hidroxi decanoato)	3HD	PHD	10
	Poli(3-hidroxi dodecanoato)	3HDDD	PHDD	12

1.2. Síntesis de PHA

La síntesis de polihidroxialcanoatos (PHA) es un proceso que se lleva a cabo principalmente de tres maneras: a) síntesis dentro de plantas genéticamente modificadas b) síntesis mediante ácidos grasos por microorganismos y c) síntesis a través de catálisis enzimática. De las tres opciones, el proceso más rentable y confiable para síntesis de PHA es mediante la fermentación, esto se justifica mediante los rendimientos de PHA al ser relativamente altos, donde los sustratos comúnmente utilizados en la síntesis de PHA son azúcares y aceite simple, los cuales son la glucosa y glicerol.

Alrededor de 300 especies bacterianas son capaces de producir PHA, tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos y lugares extremos (Zytner et al. 2023). La producción de PHA son formados por especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas donde las variedades más comunes en condiciones aerobias: *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutrofa*, *Cupriavidus necator*, y *Pseudomonas putida*, junto con otros de los géneros de condición anaerobia *Azotobacteria*, *Sintrofomonas*, *Aeromonas*, y *Clostridium* (Chanprateep et al. 2010; Sun et al. 2007). Estas especies bacterianas se pueden clasificar en dos categorías de acuerdo a su forma de cultivo, aquellas que requieren un ambiente deficiente en nutrientes durante la fase estacionaria de fermentación o aquellas que producen PHA durante la fase de crecimiento con un excedente de nutrientes disponibles (Muhammadi et al. 2015).

2. PRODUCCIÓN DE PHA

2.1. Vías de biosíntesis de PHA

La acumulación de los PHA se da en pequeños gránulos entre 0.2 – 0.5 micras dentro del citoplasma de las bacterias. Muchas bacterias se han adaptado a condiciones adversas y han desarrollado sistemas enzimáticos que emplean diversas fuentes de carbono para la biosíntesis de PHA, en la actualidad se ha determinado que existen ocho vías de biosíntesis de PHA (Lee 2010). Sin embargo existen tres vías principales, si bien es cierto la ruta a seguir va depender principales factores como la materia prima y la cepa bacteriana empleada en el proceso de producción (Choi 2020). A continuación, se describen las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de PHA (Tabla 2) y las tres posibles rutas metabólicas para la producción de PHA.

Tabla 2.

Descripción de las principales enzimas implicadas en la biosíntesis de PHAs.

Ruta	Enzima	Abreviatura	Referencia
Ruta I	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Enzima 1	(Raberg et al. 2011)
	Complejo piruvato deshidrogenasa	Enzima 2	(Raberg et al. 2011)
	3-Ketotiolasa	PhaA	(Peoples and Sinskey 1989)
	Acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH	PhaB	(Peoples and Sinskey 1989)
	3-Ketoacil reductasa dependiente de NADPH	FabG	(Kadouri et al. 2005)
	PHA sintasa	PhaC	(Ren et al. 2000)
Ruta II	(R)-Enoil-CoA hidratasa	PhaJ	(Sato, Kanazawa, and Tsuge 2011)
Ruta III	Acetil-CoA carboxilasa	ACC	(Somleva, Peoples, and Snell 2013)
	Malonil-CoA:ACP transacilasa	FabD	(Lee et al. 2011)
	3-hidroxiacil-ACP:CoA transacilasa	PhaG	(Zheng et al. 2005)

2.1.1. Ruta I

La primera vía produce PHA de cadena corta “scl”, es el caso de moléculas como azúcar, ácidos grasos o aminoácidos simples, donde dos moléculas de acetil-CoA, forman dos moléculas de hidroxibutiril-CoA a través del uso de tiolasa (*PhaA*) y acetoacetyl-CoA reductasa (*PhaB*), posteriormente se polimerizan en PHB mediante la polimerasa P(3HB) (*PhaC*scl) con una reacción de condensación (Haywood 1989; Lee and Chang 1995). A través de esta vía se producen PHA-scl comúnmente son PHB, PH4B, PHP y PHBP. (Meng et al. 2014a). Así también se puede producir un copolímero mediante la adición de propiónico lo que facilita la producción de PHBV, las reacciones que ocurre que el propionil-CoA de esa vía es el precursor del 3-hidroxi valerato (Byrom 1987; Liu et al. 2011; Slater, Gallaher, and Dennis 1992).

2.1.2. Ruta II

La segunda ruta metabólica se basa en la degradación de las moléculas mediante la oxidación de los ácidos grasos para sintetizar PHA-mcl (Liu et al. 2011). El proceso inicia

mediante la conversión de los ácidos grasos en enoil-CoA. Posteriormente, con la intervención de la enzima R-3-hidroxiacil-CoA hidratasa, se forma R-3-hidroxiacil-CoA, y finalmente, a través de la mcl-PHA sintasa (PhaCmcl), se produce un PHA-mcl. Generalmente, se generan los polímeros PHHx, PHO y PHN (Meng et al. 2014b).

2.1.3. Ruta III

La Ruta III, representada por las líneas azules (Figura 2), describe la biosíntesis de ácidos grasos donde el azúcar se utiliza como fuente de carbono. Es decir, el Acetil-CoA producido durante la glucólisis (Ruta I) se convierte en malonil-CoA mediante la enzima ACC, y sigue la ruta correspondiente hasta formar (R)-3-hidroxiacil-ACP. En esta tercera vía, se produce PHA-mcl utilizando R-3-hidroxiacil-ACP, proveniente de la síntesis in situ de ácidos grasos, o R-3-hidroxiacil-CoA, derivado de la oxidación. Por ejemplo, R-3-hidroxiacil-ACP se convierte en R-3-hidroxiacil-CoA mediante la enzima PhaG, y luego es utilizado por la PhaC para la polimerización de varios polímeros de cadena corta. Existe una diferencia entre la ruta I y II descritas anteriormente y la ruta III; el monómero generado a partir de la Ruta III puede tener una estructura diferente a la de su fuente de carbono; esto permite la utilización de sustratos de bajo costo como el ácido acético o glucosa en la producción de PHA con múltiples monómeros. (M. Kumar et al. 2020; Sharma, Sehgal, and Gupta 2021).

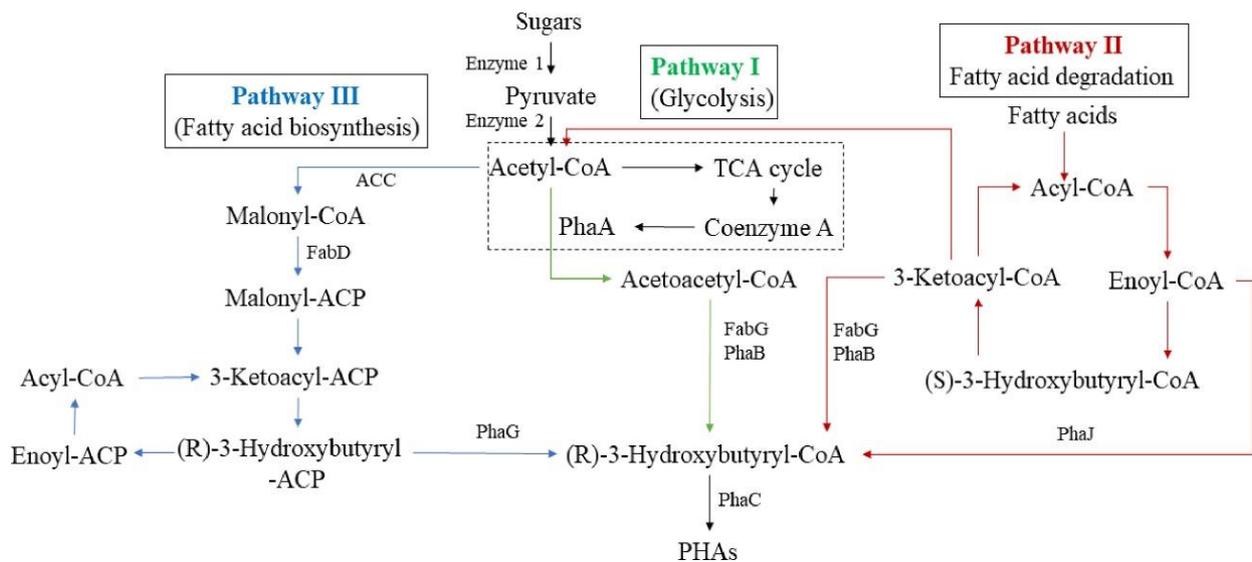


Figura 2. Rutas metabólicas para la síntesis de PHA

2.1.4. Ruta a partir de CO₂

Existe un grupo de microorganismos que presentan la capacidad de utilizar y fijar el CO₂ para la síntesis de PHA, específicamente microorganismos fotosintéticos autótrofos y en algunos casos como cepas especiales como *Cupriavidus necradora*. Esta vía metabólica de producción de PHA es similar a la de bacterias heterotróficas Vía I, II y III, con la diferencia que existe una ruta preliminar antes de ingresar en la ruta convencional biosíntesis descritas anteriormente. El mecanismo comienza cuando el dióxido de carbono es capturado por bacterias fotosintéticas autótrofas e ingresa en el ciclo de Calvin-Benson, donde utiliza ATP como fuente de energía y consume NADPH para producir gliceraldehído 3-fosfato. Posteriormente, dicho compuesto se convierte en piruvato en un solo paso mediante una reacción de oxidación, seguido por una reacción exérgica en dos etapas. Finalmente, el piruvato ingresa en la ruta convencional de biosíntesis de Acetil-CoA.(Flüchter et al. 2019) como se describe en la Figura 3.

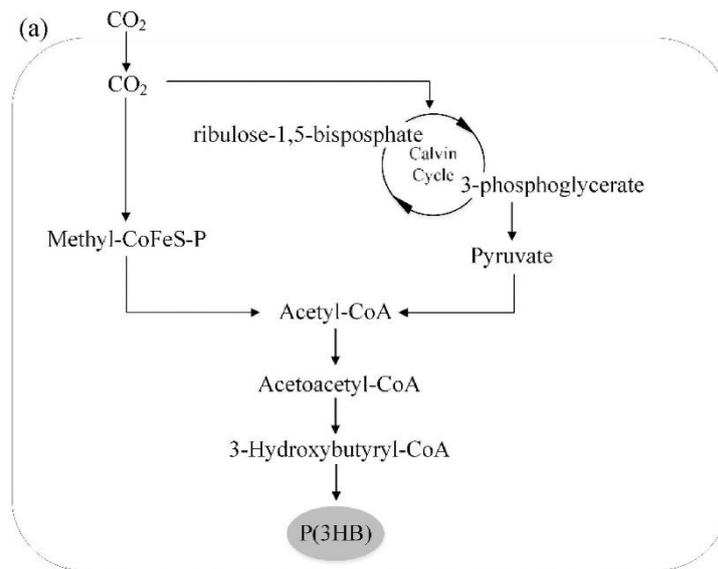


Figura 3. rutas metabólicas para la biosíntesis de PHA a partir de CO₂

Para ello, algunas de las estrategias más estudiadas en la reducción de los costes es el empleo de comunidades microbianas mixtas para la generación de PHA en condiciones no estériles y la oportunidad de la alimentación con una variedad de sustratos de bajo valor, que pueden ser residuos o subproductos industriales y municipales (Tsang et al. 2019). Esto puede permitir reducir entre un 40-50% de los costes de producción (Talan et al. 2021). Así mismo, el uso de organismos que no dependen del oxígeno para crecer

puede reducir el elevado coste de demanda energética que se requiere por parte de los organismos aerobios. Dicha estrategia que está ganando un gran impulso en los últimos años es el uso de bacterias fotosintéticas púrpuras (PPB por sus siglas en inglés: Purple Phototrophic Bacteria) (Fradinho et al. 2021; Sali and Mackey 2021).

El uso de PPB en la producción de PHA presenta varios factores decisivos claves para la industrialización como: i) la aplicación de PPB puede proporcionar hasta un 90% de rendimiento de conversión de sustrato a PHA, en comparación a los rendimientos aeróbicos es casi tres veces más (Fradinho et al. 2021) ii) este tipo de microorganismos no requieren de aireación, iii) obtienen su energía a través de la luz por lo que su rendimiento es cercano a la unidad (Hülsem, Batstone, and Keller 2014) y iv) a diferencia los PPB puede acumular los PHA mientras crecen, en comparación con otros organismos que sólo los producen en estado estacionario (Fradinho, Reis, and Oehmen 2016). A pesar de ello, existen algunas incertidumbres con respecto a la viabilidad técnica y la idoneidad ambiental de la aplicación de PPBs (Fradinho et al. 2021). En este sentido, existe una clara necesidad de la búsqueda de nuevas rutas y estudios de otros factores para su producción por ejemplo, aprovechar las características particulares de los PPB, al ser un grupo de microorganismos diversos con varios modos de crecimiento metabólico, es decir, se pueden desarrollar mediante fotoheterótrofia, fotoautótrofia y químiotrofia para la producción de biomasa PPB (Capson-Tojo et al. 2020). Dicha biomasa se caracteriza por un alto contenido de proteínas (>60% de proteína) y cantidades variables de bacterioclorofilas, carotenoides, polihidroxicanoatos (PHA), y coenzima Q₁₀, lo que dan una posibilidad del aprovechamiento de diversos residuos o subproductos tanto líquidos y gaseosos de diversos procesos industriales. Por otro lado, una opción interesante para aumentar la eficiencia de producción de PHA es el efecto de las condiciones de limitación de nutrientes, ya que bajo estas condiciones de desequilibrio es como se acumulan los PHA en gránulos dentro de las células como fuentes de reserva de carbono (Shahid et al. 2021).

3. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS PÚRPURAS (PPB)

Las bacterias fotosintéticas púrpuras (PPB) constituyen un grupo diverso de microorganismos anoxigénicos, fototróficos y anaerobios facultativos. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos a lo largo del árbol filogenético de las bacterias, con muchas subdivisiones, aunque específicamente dentro de las Proteobacterias (Imhoff and Bias-Imhoff 1995). Las PPB son conocidas por su

característico color púrpura, debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos como las bacterioclorofilas a y b y los carotenoides, que utilizan para captar energía a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, las bacterioclorofilas a y b tienen picos de absorción en el rango de la luz infrarroja cercana (NIR), que se encuentran entre los 800 y 1020 nm, a diferencia de otros microorganismos que presentan clorofila con absorción en el espectro visible (VIS) (Hülßen, Batstone, and Keller 2014).

Generalmente las PPB se pueden clasificar en dos grandes grupos, por un lado, las bacterias púrpura del azufre (PSB) y el segundo grupo, las bacterias púrpuras no del azufre (PNSB) que en su mayoría de casos pueden coexistir en el mismo entorno (Hunter et al. 2009). Algo característico de los PSB es que son microorganismos que crecen predominantemente en un medio fotoautotrófico al usar compuestos reducidos del azufre como donadores de electrones para la reducción del carbono inorgánico, y presentan capacidades metabólicas fotoheterotróficas y sin luz limitadas, ya que en su mayoría se requieren de azufre para su crecimiento (Hunter et al. 2009). A diferencia las PNSB, son bacterias que presentan una diversa capacidad metabólica logrando crecer fotoheterotroficamente, fotoautotróficamente, e incluso de capacidad quimiotrofia oscura (aeróbica/anaeróbica) (Hunter et al. 2009), por lo que genera un gran interés la utilización de este tipo de microorganismos. Los microorganismos más representativos y estudiados dentro de las PNSB, son, por ejemplo: *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*, y *Rhodospirillum rubrum* (Engelmann 1883). La versatilidad metabólica de las PPB les permite una amplia gama de aplicaciones, tanto inorgánicas (fotoautótrofia) como orgánicas (fotoheterotrofia), como se describe en la Figura 4.

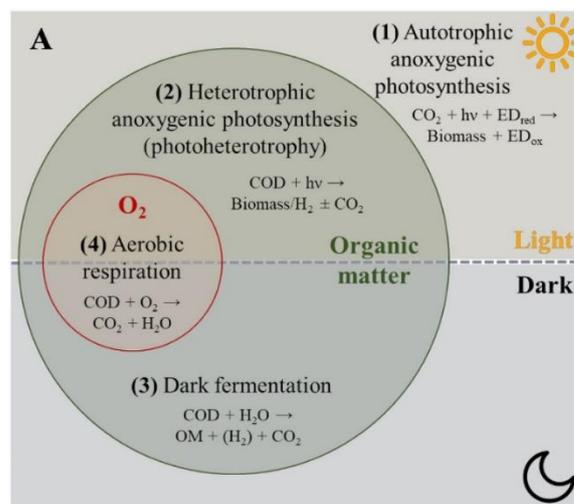


Figura 4. Representaciones simplificadas de los modos metabólicos de PPB de acuerdo con fuentes de energía y carbono y aceptores de electrones

3.1. Fotoheterotrofia

En las condiciones de fotoheterotrofia (Figura 4A (2)), se utiliza la luz como fuente de energía y el carbono orgánico como fuente de carbono. Además, se emplean diferentes compuestos como donantes de electrones, por ejemplo, ácidos orgánicos como acetato, propionato, butirato, malato, succinato, lactato, entre otros (Kim et al. 2004; Lu et al. 2019).

3.2. Fotoautotrofia

En las condiciones de fotoautotrofia (Figura 4A(1)), este tipo de crecimiento se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas, donde el proceso anabólico utiliza luz y CO₂ como fuentes de carbono, junto con una gama de donantes de electrones inorgánicos, tales como: H₂, S₀, S₂O₃²⁻, H₂S, Fe²⁺, CO, NO²⁻ (Griffin, Schott, and Schink 2007; Koku and Eroglu 2002; Najafpour and Younesi 2007).

De acuerdo con las condiciones ambientales, también puede determinarse el modo de crecimiento metabólico predominante. Por ejemplo, en presencia de luz y ausencia de oxígeno, se produce el crecimiento fototrófico. En estas condiciones, la mayor parte de la energía catabólica proviene de la luz absorbida por las bacterioclorofilas (*BChls*) y los pigmentos carotenoides, que son necesarios para la captación de luz y el crecimiento fotosintético. Dichas condiciones van a depender de la disponibilidad de luz y la presencia o ausencia de oxígeno lo que producirá el cambio del metabolismo de forma natural, como se describe en la Figura 5.

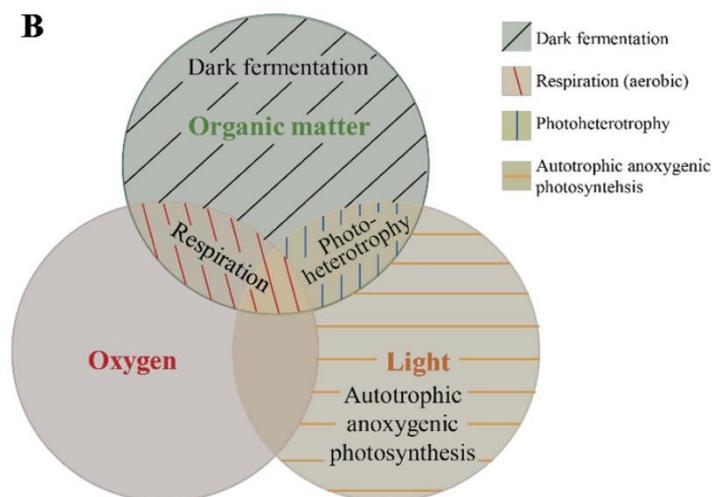


Figura 5. Representadas de los modos dominante bajo la presencia/ausencia de materia orgánica, oxígeno o luz.

Por otro lado, emplear a las PPBs como tecnologías de tratamiento de efluentes no son competitivas a las tecnologías existentes debido al ser de elevado costo de capital al requerir sistemas iluminados artificialmente, aunque el uso de luz solar ofrece el potencial de reducir sustancialmente los costos operativos (Capson-Tojo et al. 2020). Sin embargo, resulta interesante el uso de PPBs como aplicaciones biotecnológicas con el objetivo de producir altas tasas de productos de valor agregado como una alternativa de afrontar el principal desafío económico y del aprovechamiento de los flujos de desechos para equilibrar los costos operativos.

Las PPB producen productos como proteínas (como biomasa o extraído) (Hülßen et al. 2018), hidrógeno molecular (Ghosh et al. 2017; Hallenbeck and Liu 2016) carotenoides y coenzima Q10 (Saejung and Ampornpat 2019) la propia biomasa como fertilizante o alimentos para animales (Pikaar et al. 2018) y de gran interés en estos últimos años polihidroxicanoatos (PHA) (Fradinho et al. 2021).

4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE PHA

La producción de los polímeros por las PPB pueden estar afectado por las condiciones de cultivo, las diferentes fuentes de carbono, la relación de C/N, la concentración de fósforo y nitrógeno, la limitación de nutrientes, el pH, el régimen de alimentación, las condiciones de iluminación y las condiciones de iluminación (Fradinho, Reis, and Oehmen 2016; Monroy and Buitrón 2020; Montiel Corona et al. 2017). Incluso estos factores pueden influir en la producción de productos de interés como pigmentos, CoQ₁₀ e hidrógeno.

4.1. Cultivo bacteriano de PPB

Los cultivos de PPB pueden producir grandes cantidades de PHA, por ejemplo asimila como fuente de sustrato el acetato, las cepas bacterianas como *R. sphaeroides* llegan a producir el 90% (Sangkharah and Prasertsan 2007) o en el caso de *R. palustris* llegar a acumular alrededor del 30% y la *R. rubrum* 45% (Carlozzi et al. 2019), por lo tanto el porcentaje de PHA es variable para el mismo microorganismo, sin embargo la producción de PHA empleando cultivos puros hace que la rentabilidad del proceso se vea afectada al tener que cumplir con requisitos de esterilidad, para ello la alternativa más empleada es el empleo de cultivos mixtos o conocidos también como cultivos enriquecidos.

Este tipo de cultivos presentan cualidades como una alta adaptabilidad y una alta degradación de sustratos como desechos, los cultivos mixtos también pueden producir cantidades similares de PHA que los cultivos puros claramente esto dependería de las condiciones de operación (Cardeña, Valdez-Vazquez, and Buitrón 2017; Dinesh et al. 2020).

4.2. Sustrato

Los PPB tiene la capacidad de emplear diversas fuentes de carbono para producir PHA, incluyendo acetato, malato, propionato, butirato, valerato, caproato, heptanoato, glicerol, glucosa y otros carbohidratos, así como CO₂, CO, gas de síntesis, aguas residuales y efluentes de fermentación oscura provenientes de lignocelulósicos hidrolizados y otros residuos orgánicos (Dinesh et al. 2020; Lorrungruang et al. 2006; Ranaivoarisoa et al. 2019).

El acetato y el butirato son dos de los ácidos grasos volátiles más comunes generados durante la biodegradación fermentativa de residuos orgánicos. En la mayoría de los estudios que emplean efluentes de fermentación oscura como sustratos para la producción de PHA, se observa principalmente la producción de PHB (Ghimire et al. 2016; Luongo et al. 2017).

Para disminuir los costos de producción, es factible utilizar sustratos residuales complejos, como los efluentes acidogénicos provenientes de la fermentación oscura de residuos orgánicos (G. Kumar et al. 2019). Estos efluentes están cargados de ácidos grasos de cadena corta y pueden incluir ácidos grasos de cadena media, los cuales son eficientemente utilizados por las PPB para producir scl-PHA, mcl-PHA y otros productos de valor añadido.

4.3. Limitación de nutrientes

Como se indicó anteriormente, la mayoría de las bacterias productoras de PHA requieren un ambiente deficiente en nutrientes. Varios nutrientes tienen roles vitales en el crecimiento celular, el metabolismo y la producción de PHA. Los PHA son sintetizados por las bacterias como una molécula de almacenamiento de energía, que solo se hará durante un estado de exceso de energía (fuente de carbono) mientras que es deficiente en los medios para el crecimiento celular (nitrógeno, fósforo). Para hacer esto, las condiciones deficientes en nutrientes a menudo se crean en un proceso de fermentación de dos pasos; la fase de crecimiento y la fase de producción o acumulación de PHA. La

fase de crecimiento permite la producción máxima de biomasa, seguida de una reducción en el nitrógeno y/o fósforo dependiendo de la cepa de bacterias utilizadas. Una vez que se ha acumulado suficiente biomasa, las tasas de alimentación de nitrógeno y fósforo se reducen al mínimo. Moléculas y estructuras clave como el ATP y otros. El ADN y las membranas celulares requieren un suministro constante de nutrientes P y N, sin ellos la biomasa no puede seguir creciendo (Wang et al. 2019). Este estado de deficiencia de nutrientes asegura que todo el exceso de carbono se utilice para la síntesis de PHA en lugar del crecimiento de biomasa y se ha observado en varias especies para mejorar significativamente la productividad de PHA, y muchos estudios informan un aumento de casi 2–3 veces en la producción de PHA una vez en un estado deficiente de nutrientes (Grousseau et al. 2014; Portugal-Nunes et al. 2017; Tu, Zhang, and Wang 2019).

De acuerdo a lo expuesto, es como se desarrolló el presente trabajo de investigación que tuvo como propósito la valorización biológica de ácidos grasos volátiles (crecimiento heterótrofo), hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂) (crecimiento autótrofo). Estos compuestos se pueden obtener a partir de los efluentes líquidos o gaseosos procedentes de la fermentación oscura de desechos orgánicos. Además, se evaluó el efecto que presentan las condiciones limitantes de nutrientes de nitrógeno y magnesio tanto en crecimiento heterótrofo y autótrofo para la producción de PHA. Este trabajo demuestra la importancia del estudio de diversas fuentes de carbono y la comprensión de las estrategias de acumulación de PHA de los PPB en condiciones estresantes, así como los resultados que pueden dar lugar a la implementación a mayor escala de una fotobiorrefinería basada en PPB, que podría valorizar los desechos producto de la fermentación oscura para producir diferentes productos de alto valor agregado en el contexto de la bioeconomía circular.

OBJETIVO

Objetivo General

- Revalorizar los ácidos grasos volátiles y/o hidrógeno y CO₂ en la producción de bioplásticos (PHA) usando bacterias fotosintéticas púrpuras (PPB).

Objetivos Específicos

- Determinar la posibilidad de acumular PHAs, específicamente PHB (Poli-3-hidroxi butirato) y PHV (Poli-3-hidroxi valerato) utilizando un consorcio mixto de PPBs en condiciones heterótrofas y autótrofas.
- Evaluar el efecto de la limitación de nitrógeno en la acumulación de PHAs tanto en condiciones heterótrofas como autótrofas.
- Evaluar el efecto de la limitación de magnesio en la acumulación de PHAs tanto en condiciones heterótrofas como autótrofas.

MATERIALES & MÉTODOS

5.1. Inóculo de bacterias fotosintéticas púrpuras PPB

El inóculo utilizado para las pruebas experimentales provenía de un consorcio mixto de PPBs enriquecido de un estudio previo (Rodero et al. 2024) el cuál fue almacenado durante un tiempo en una cámara fría. En primer lugar, se procedió con la reactivación del cultivo almacenado. Para ello se realizaron una serie de enriquecimientos hasta que se consiguió un cultivo en condiciones estables.

5.1.1. Enriquecimiento Heterotrófico

Los enriquecimientos heterótrofos se realizaron utilizando medio mineral de acuerdo al Ormerod et al. (1961) descrito en el apartado 5.2.1. Se procedió a la inoculación de cultivo mixto de PPB (10% del volumen total de trabajo) en un frasco de vidrio de 500 mL y un volumen de trabajo de 400 ml con el medio preparado. Tras esto se cerró con tapa de plástico acoplado con el septo de butilo y se pasó un flujo de N₂ en el espacio en cabezas para asegurar una atmósfera libre de O₂ durante 3 minutos. El frasco de vidrio fue colocado en una placa de agitación magnética (Thermo Scientific, USA) a 300 rpm y 25°C durante 2 días, bajo condiciones de iluminación artificial con lámparas de luz infrarroja NIR (INSTAR IN-905) el cual emite longitudes de onda de 850 nm y a una intensidad de 60 Wm⁻².

5.1.2. Enriquecimiento Autotrófico

Para los enriquecimientos autótrofos se utilizó un medio Ormerod modificado para promover las condiciones autótrofas como en (Rodero et al. 2024). Para ello en un frasco de vidrio de 500 mL se añadió 180 mL de dicho medio mineral y 20 mL de inóculo. Esto se hizo para asegurarnos un espacio en cabezas suficiente para asegurar que no estamos limitados por transferencia de gas. El espacio en cabezas se desplazó con N₂ y luego con H₂ hasta una presión de 1.3 bar para para su aclimatación antes del inicio de los experimentos ara obtener un consorcio de PPB capaz de proporcionar un crecimiento fotoautotrofico estable, lo que tomo un tiempo de una semana.

5.2. Medio de cultivo

5.2.1. Alimentación Heterotrófica

Se cultivaron PPB para los ensayos de alimentación heterotrófica con medio (Ormerod, Ormerod, and Gest 1961) con algunas modificaciones: K₂HPO₄ (900 mg L⁻¹), KH₂PO₄ (600 mg L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (200 mg L⁻¹), CaCl₂·2H₂O (75 mg L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (11.8 mg L⁻¹), EDTA (20 mg L⁻¹), NH₄Cl (404.8 mg L⁻¹), y ácido acético CH₃COOH (1000 mg L⁻¹), se complementó con una solución micronutrientes de una dosis de 1ml L⁻¹ que contiene: H₃BO₃ (280 mg L⁻¹), MnSO₄·4H₂O (210 mg L⁻¹), Na₂MoO₄·2H₂O (75 mg L⁻¹), ZnSO₄·7H₂O (24 mg L⁻¹), Cu(NO₃)₂·3H₂O (4 mg L⁻¹), donde se ajustó el pH a 7 mediante la adición de NaOH de 1 N.

5.2.2. Alimentación Autotrófica

Los ensayos de alimentación autotrófica se realizaron con el mismo medio de Ormerod (Ormerod, Ormerod, and Gest 1961) fue: K₂HPO₄ (900 mg L⁻¹), KH₂PO₄ (400 mg L⁻¹), MgSO₄·7H₂O (200 mg L⁻¹), CaCl₂·2H₂O (75 mg L⁻¹), FeSO₄·7H₂O (11.8 mg L⁻¹), EDTA (20 mg L⁻¹), NH₄Cl (404.8 mg L⁻¹), se complementó con 1 mL de la solución de oligoelementos: H₃BO₃ (280 mg L⁻¹), MnSO₄·4H₂O (210 mg L⁻¹), Na₂MoO₄·2H₂O (75 mg L⁻¹), ZnSO₄·7H₂O (24 mg L⁻¹), Cu(NO₃)₂·3H₂O (4 mg L⁻¹), con la modificación de la fuente de carbono para asegurar el crecimiento fotoautotrófico, se adicionó el NaHCO₃ (4200 mg L⁻¹), como la fuente de carbono inorgánico que sustituye al CO₂ debido a la baja transferencia de masa de gas-líquido que puede existir y el suministro de H₂ puro.

5.2.3. Experimentos bajo deficiencia de nutrientes

Las condiciones de la experimentación fueron las mismas descritas en la sección 5.2.1 y 5.2.2 para las condiciones de alimentación de heterotrofia y autotrofia, con la modificación de los medios en ambas situaciones de la eliminación de fuente de nitrógeno y magnesio que aporta el NH₄Cl y del MgSO₄ respectivamente. En esta condición no se reguló el pH.

Todos los reactivos empleados en la experimentación son de grado P.A con una pureza superior al 99% y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (España) y los gases empleados para las condiciones anaerobiosis fue a través de Linde España S.A que suministro nitrógeno puro (≥ 99.999 %), argón (≥ 99.999 %) e hidrógeno.

5.3. Configuración experimental

Las pruebas experimentales para la acumulación de PHAs con cultivo de PPB en lotes consistieron en primer lugar del proceso de enriquecimiento heterótrofo (descrito en el apartado 5.1.1) seguidamente se centrifugó para la separación de la biomasa del medio mediante el uso de una centrífuga (Sorvall ST4, Thermo ScientificTM), luego se resuspendió la biomasa con el medio (descrito en el apartado) y se le añadió ácido acético como medio heterótrofo para lo cual se reguló el pH del medio a neutro con NaOH 1N. Se realizó la inoculación de 20 mL del cultivo de PPB con una concentración inicial de la biomasa de 0.4 g L⁻¹, seguidamente las botellas se cerraron con septos de butilo y tapas de plástico para el sellado hermético de los gases. Para asegurar las condiciones anaeróbicas libres de oxígeno se realizó la inyección de gas argón durante 2-3 minutos con liberación de la presión con una salida del gas, y posterior de la inyección de 5 minutos más de argón condiciones herméticas hasta alcanzar una presión adecuada. Los frascos de vidrio se mezclaron constantemente con una placa de agitación magnética (Thermo Scientific, USA) bajo 300 rpm.

El suministro de la luz fue proporcionado por lámparas de LED de infrarrojo (INSTAR IN-905) cercana NIR igual que en los enriquecimientos con una intensidad alrededor de 60 Wm⁻², la ubicación de las lámparas y frascos de vidrio fueron medidos para poder proporcionar una distribución uniforme de la luz mediante la medición de la luz con PASPort PS-2148 (PASCO, EE.UU.). Además, se empleó una lámina absorbente de UV/VIS (Lee filter ND 1.2299), el cual cubrieron los frascos de vidrio para evitar el crecimiento de otros microorganismos competidores y reduciendo la entrada de luz visible Capson-Tojo et al., 2021).

Bajo las condiciones de pruebas experimentales autotróficas, se procedió de igual manera con las condiciones heterotróficas bajo consideración de algunas modificaciones, en este caso se trabajó con un volumen de trabajo del medio 200 mL para asegurar un mayor volumen en el espacio de cabeza para la transferencia del gas de H₂, así también para asegurar las condiciones anaeróbicas se realizó mediante el lavado del espacio de cabeza con gas de Argón durante 5 minutos y posterior la inyección de H₂ (100%) bajo una presión manométrica de + 0.3 bar (presión absoluta de 1.3bar). Durante los experimentos, se inyectó H₂ cuando la presión del medidor manual descendía por debajo de + 0.1 bar (presión absoluta de 1.1 bar). Todas las pruebas experimentales se realizaron por triplicado.

Lo anteriormente mencionado se presenta mediante la Figura 6 que representa la esquematización de las pruebas experimentales.

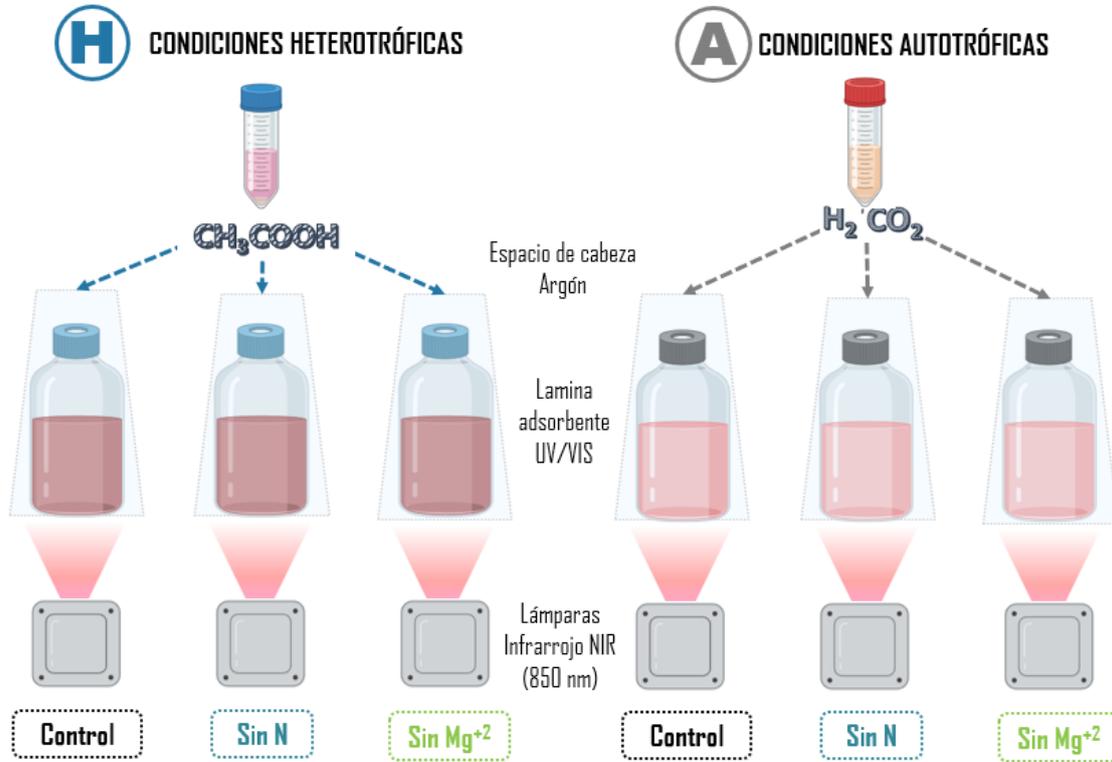


Figura 6. Esquematización de la configuración experimental

5.4. Procedimiento de muestreo

El muestreo se realizó con ayuda de una aguja y jeringa a través del septum hermético al gas, se tomaron 5 ml el cual se realizaron las mediciones de forma instantánea de pH y temperatura con un dispositivo portátil (Hanna Instruments, EE. UU), la densidad óptica a 808 nm con un espectrofotómetro de UV-VIS (Shimadzu, Japón). Se extrajo el menor volumen posible para evitar la variación de volumen y este no sea significativo durante el tiempo de la experimentación, por lo cual el muestreo se controló cada 12 horas. Adicionalmente en condiciones autotróficas se realizó el análisis de gas y la presión del espacio de cabeza cada 12 h mediante el uso de cromatógrafo de gases con ayuda de jeringas gastight de 100 μl (Hamilton, EE. UU) para cuantificar la concentración de gas H_2 y un manómetro manual para la medición de presión.

Después de realizar las mediciones, se reservó las muestras para los análisis de DQO (soluble y total) y el resto de volumen se congeló la muestra para la determinación de PHAs. Estos análisis se realizaron tanto para condiciones heterotróficas como autotróficas.

5.5. Procedimientos analíticos

5.5.1. Crecimiento y productividad de biomasa PPB

El procedimiento de la medición de los sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) se realizaron bajo los protocolos internos del Instituto Procesos Sostenibles (ISP siglas en inglés) de la Universidad de Valladolid, España; estos procedimientos siguen la metodología normalizada APHA-AWWA-WPCF. Se tomó 15 mL de muestra de cada frasco de vidrio al inicio y final de cada experimentación, se instaló el sistema de filtración al vacío que contiene un filtro de fibra de vidrio de 0.7 µm que previamente se ha pesado para su posterior cálculo, terminado el procedimiento de filtrado, se colocaron los filtros que contenían los sólidos a 105°C en una estufa durante 24 horas para la obtención de SST. Finalizado el procedimiento descrito, se realizó la medición de SSV a través de la colocación del filtro a una mufla a 550°C por un tiempo de 24 horas. Mediante la aplicación de las ecuaciones 2 y 3 se realizó el cálculo de SST y SSV respectivamente.

$$SST = \frac{(P_{\text{Filtro 1}} - P_{\text{Filtro 0}})}{V} \times 1000 \quad (2)$$

$$SSV = \frac{(P_{\text{Filtro 2}} - P_{\text{Filtro 1}})}{V} \times 1000 \quad (3)$$

Donde:

- $P_{\text{Filtro 0}}$: Masa de filtro vacío (g)
- $P_{\text{Filtro 1}}$: Masa de filtro después de la estufa (g)
- $P_{\text{Filtro 2}}$: Masa de filtro después de la mufla (g)
- V : Volumen de la muestra en (L)

Debido a las condiciones de limitantes del volumen de muestreo, se realizó una correlación de la OD y SST mediante producción de una curva. Por lo tanto la monitorización del crecimiento de PPB se realizó con la medición de la absorbancia del cultivo a 808 nm (OD_{808}), esta longitud particularmente para las PPB presentan

picos característicos por encima de 800 nm los cuales corresponde a las bacterioclorofila *a* (Sepúlveda-Muñoz et al. 2020). Entonces el espectro de absorbancia del cultivo de PPB se analizaron en un espectrofotómetro UV-2550 (Shimadzu, Japón).

5.5.2. Demanda Química de Oxígeno Total y Soluble

El procedimiento de la medición de Demanda Química de Oxígeno Total (DQOt) y Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQOs) se realizaron bajo los protocolos internos ISP de la Universidad de Valladolid, España; estos procedimientos siguen la metodología normalizada APHA-AWWA-WPCF. Inicialmente para la DQOs se filtraron las muestras a través de un filtro de 0.45 µm con ayuda una pipeta automática se tomó 2.5 mL de la solución filtrada y se transfirieron a tubos de vidrio con tapa rosca, previamente rotulada según correspondiera. Seguidamente se añadieron 1.5 mL de solución digestora y 3.5 mL de solución catalítica, donde los tubos se cerraron con las tapas rosca y se agitaron suavemente. Los tubos ensayos se colocaron en un digestor a 150°C por un tiempo de 2 horas en la campana extractora. Transcurrido el tiempo se retiraron los tubos de vidrio y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 3 gotas de ferroína como indicador y se introdujo un agitador magnético en cada tubo para titular el exceso de dicromato con la solución de FAS hasta el viraje a color rojo, anotando el volumen de FAS consumido según la lectura de la bureta digital. Se utilizó una muestra en blanco con 1.5 mL de agua mili-Q. Finalmente, se determinó la DQO soluble utilizando la fórmula 4. Se procedió de la misma forma para la determinación de la DQO total, solo que a diferencia se utilizó la muestra completa tomada.

$$DQO = \frac{(B - F) * 400}{T} * \text{factor de dilución} \quad (4)$$

Donde:

B: ml de FAS utilizados en la valoración de blanco

F: ml de FAS utilizados en la valoración de muestra

T: Título ml consumidos en valoración de patrón de dicromato potásico

Para la determinación de rendimiento de biomasa heterótrofa ($Y_{X/S}$) es decir la cantidad de la biomasa generada por unidad de sustrato consumido, para ello la

concentración de la biomasa se calculó en g de SSV L⁻¹ y se convertido en DQO mediante la relación de ecuación de biomasa CH_{1.8}O_{0.38}H_{0.18} (1g biomasa expresada SSV=1.78 g DQO) (McKinlay and Harwood 2011). Por lo tanto, el rendimiento de biomasa se expresó mg DQO biomasa mg DQO⁻¹ consumido.

Rendimientos de biomasa en condicione autotrófica se calcularon de acuerdo la siguiente fórmula:

$$Y(\text{g VSS} \cdot \text{g}^{-1} \text{H}_2) = \frac{(\text{SSV}_F - \text{SSV}_I) \cdot V_{\text{liq}}(\text{g VSS})}{\text{H}_2 \text{ consumido} (\text{mol}) \cdot 2 (\text{g H}_2 \cdot \text{mol}^{-1})} \quad (5)$$

5.5.3. Cuantificación del consumo de gas

La tasa de consumo de H₂ en el espacio de cabeza se controló mediante el análisis de su concentración en el gas por cromatografía de gases y la medida de presión. La composición se cuantificó usando el 7820A cromatografía de gases (GC-TCD) sistema (Agilent Technologies CA, EE.UU.) empleado como gas portador el argón a un caudal de 5 mL min⁻¹. La temperatura del horno y los detectores son 45 y 220 °C, respectivamente. El consumo de gas de hidrógeno en el sistema de cultivo cerrado se calculó mediante la aplicación de ley de gas ideal, con la ecuación 6:

$$n_{\text{H}_2} = \frac{P(\text{bar}) \cdot V_h(\text{L}) \cdot \% \text{H}_2}{R(\text{L} \cdot \text{bar} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot T(\text{K}) \cdot 100} \quad (6)$$

Donde:

P: Presión absoluta (bar)

V_h: volumen de espacio de cabeza

% H₂: porcentaje de H₂ en el gas

R: constante de gas ideal, de acuerdo a las unidades es 0.08314 L · bar · K⁻¹ · mol⁻¹

T: Temperatura (K)

5.5.4. Determinación de PHA y análisis de GC-MS

El método para la cuantificación del contenido de PHA celular total se utilizó el enfoque de GC-MS estándar del poliéster metanolizado (Manoli et al. 2023; Manoli,

Nogales, and Prieto 2022). Previamente se realizó pretratamiento de la muestra, para lo cual se realizó la centrifugación de 4 mL de muestra bajo 10000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante del cultivo precipitado, después se hizo la separación del pellet y se conservó a -20°C. El pellet se resuspendió en 2 ml de metanol que contuvo ácido sulfúrico y se traspasó en tubos de vidrio y se adiciono 2 ml de cloroformo que contenía 0.5 mg/ml de ácido 3-metilbenzoico (3MB) como estándar interno, paralelamente se procedió de la misma para la preparación de cinco soluciones patrones con diferentes concentraciones con uso de cloroformo para la dilución, seguidamente los tubos de vidrio se tapó con una tapa rosca sellado herméticamente y se colocó el tubo bajo incubación a 100 °C durante 5h. Se esperó el enfriamiento y se realizó el proceso de extracción de dos fases, mediante la adición de una pequeña cantidad de H₂SO₄ para eliminar completamente la fase acuosa y la fase orgánica restante que contiene los ésteres metílicos se utilizó para la medición por GC-MS. Se empleó un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbronn, Alemania) serie 7890A junto con un detector 5975C MS y acoplado un Split – splitless de inyectó se empleó para el análisis. Para la determinación del contenido específico de producción de PHA, se empleó la siguiente fórmula 7:

$$\% \text{ PHA, g} \cdot \text{g}^{-1} = \frac{C_{\text{PHA}} \cdot V}{M_{\text{BIOMASA}}} \times 100 \quad (7)$$

Donde:

C_{PHA} : Concentración de PHA (mg L⁻¹)

V: Volumen de la muestra extraída (L)

M: Peso de la biomasa de la muestra (mg)

5.6. Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statgraphics Centurion versión 18. Se realizó un análisis ANOVA de varianza para determinar la significación de los valores obtenidos mediante la realización de una prueba Tukey con un valor de $p < 0.05$ considerado significativo.

RESULTADOS

Evaluación del crecimiento bacteriano bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes

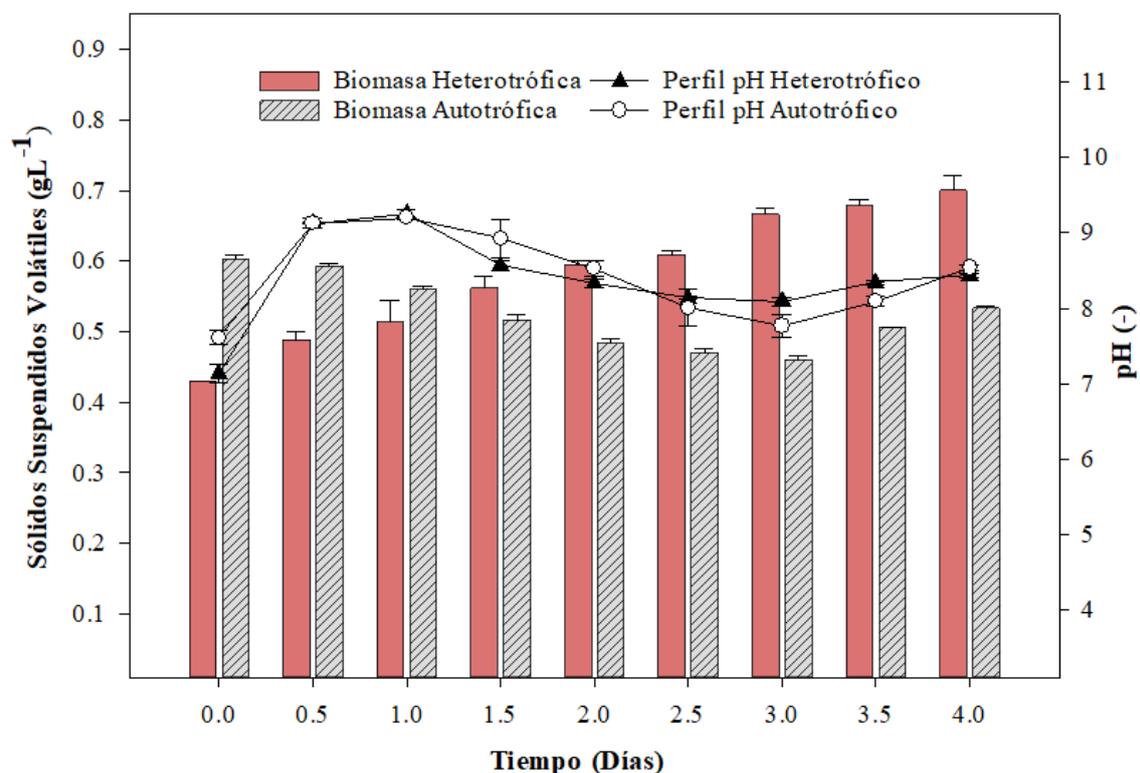
Los experimentos realizados presentaron diferentes picos de adsorción a diferentes longitudes de onda como 650, 808 y 865 nm lo que demuestra la presencia de la bacterioclorofila que es característica de las PPBs. Para la determinación del crecimiento bacteriano se realizó la medición de SSV. Además, la medición de SSV describe las capacidades metabólicas del modo de crecimiento de las PPB de las dos diferentes fuentes de carbono, donde las condiciones heterotróficas se basan en la alimentación con ácidos grasos volátiles “acetato” como fuente de carbono (heterótrofa) y segundo caso la alimentación con “CO₂ y H₂” como fuente de carbono (autótrofa).

Como se observa en la Grafica 1, el cultivo mixto PPB heterotrófico comenzó a crecer desde el principio, partiendo inicialmente con una concentración de biomasa alrededor de 0.42 gL⁻¹ de SSVL⁻¹ y alcanzo la mayor producción de biomasa bacteriana (en términos de SSV) en el cuarto día (96 h) de 0.70 g L⁻¹ de SSVL⁻¹ por lo que la tendencia del crecimiento fue ascendente a una tasa de 0.1164 g L⁻¹ día⁻¹.

Para condiciones autotróficas se evidenciaron una aparente fase de retraso desde el inicio del crecimiento, con una concentración de biomasa inicial de 0.6 gL⁻¹ de SSVL⁻¹ y disminuyendo hasta el día 2 (48h) a hasta a 0.48 gL⁻¹ de SSVL⁻¹, esto podría atribuirse a que los cultivos alimentados con fuentes gaseosas como H₂ pueden estar fuertemente influenciados por la baja transferencia de masa en la fase gas-líquido. Una vez alcanzado el equilibrio de transferencia, en los días posteriores el sustrato promovió un aumento en la biomasa bacteriana, al finalizar el cultivo presentó una concentración de alrededor de 0.53 g L⁻¹ de SSVL⁻¹ con tasa máxima de 0.09 g L⁻¹ día⁻¹. Aunque los resultados muestran una ligera reducción en la tasa de crecimiento celular, el cultivo de PPB autotrófico fue capaz de continuar creciendo en los días posteriores.

En el Gráfico 1, se puede observar que bajo las condiciones heterótrofas los cultivos PPBs presentan una mejor asimilación del sustrato (acetato) en el crecimiento bacteriano superior del 27% frente a las condiciones autotróficas (H₂). Estos resultados señalan que la vía heterótrofa es preferible sobre la vía autótrofa para el consumo de sustrato, no

obstante esto se podría mejorar se supera la limitaciones de la baja transferencia y equilibrar la disponibilidad de H₂ (Spanoghe, Vermeir, and Vlaeminck 2021). El uso de reactores de alta transferencia de masa evitaría esto y haría que el crecimiento autótrofo fuera más competitivo frente a las condiciones heterotróficas.



Gráfica 1. Crecimiento bacteriano y perfil de pH de las PPB en condiciones heterotróficas y autótroficas

En cuanto al cultivo heterotrófico, se observó una tendencia similar a la reportada en estudios previos (Allegue et al., 2020b), donde su ensayo control, alimentado con acetato como fuente de carbono, alcanzó una concentración de SSV de 700 mg SSV L⁻¹ en el cuarto día, como en este estudio. Además, describieron que la mayor producción de biomasa se alcanzó entre los días 7.5 y 8, con una producción máxima de 900 mg L⁻¹. De manera similar, el trabajo realizado por Mata-De-la-Vega et al. (2022) mostró un perfil de crecimiento heterotrófico parcialmente creciente durante los primeros 8 días, con una concentración inicial de biomasa de 0.42 ± 0.2 g VSS L⁻¹, alcanzando una concentración máxima de 0.5 g VSS L⁻¹ en el octavo día. Aunque el aumento de biomasa no fue tan significativo, esto puede atribuirse a las condiciones de alimentación heterotrófica mediante aguas residuales de matadero, lo que sugiere una baja biodegradabilidad de la fuente de carbono. Además, las condiciones de cultivo se realizaron bajo baja intensidad

de radiación IR (12 W m⁻²). En general, de acuerdo con los resultados obtenidos en condiciones heterotróficas, se puede concluir que las PPB tienen la capacidad de absorber carbono y otros nutrientes, como nitrógeno y fósforo, de manera simultánea gracias a sus diversas vías de asimilación. Esto también se valida con los resultados del consumo de DQO mostrados en la Gráfica 2.

Para las condiciones autotróficas se ha informado que el comportamiento es similar al observado en el estudio realizado por Flüchter et al. (2019), en el que el microorganismo *C. coskatii* alcanzó bajas densidades ópticas (OD₆₀₀ de 0.4) en los primeros días, en comparación con el cultivo heterotrófico que logró una OD₆₀₀ de 3.6. De manera similar, los estudios de Salinas et al. (2022) mostraron un perfil de densidad óptica (OD) decreciente durante las primeras 30 horas, y solo se evidenció un aumento significativo en la biomasa después del segundo día.

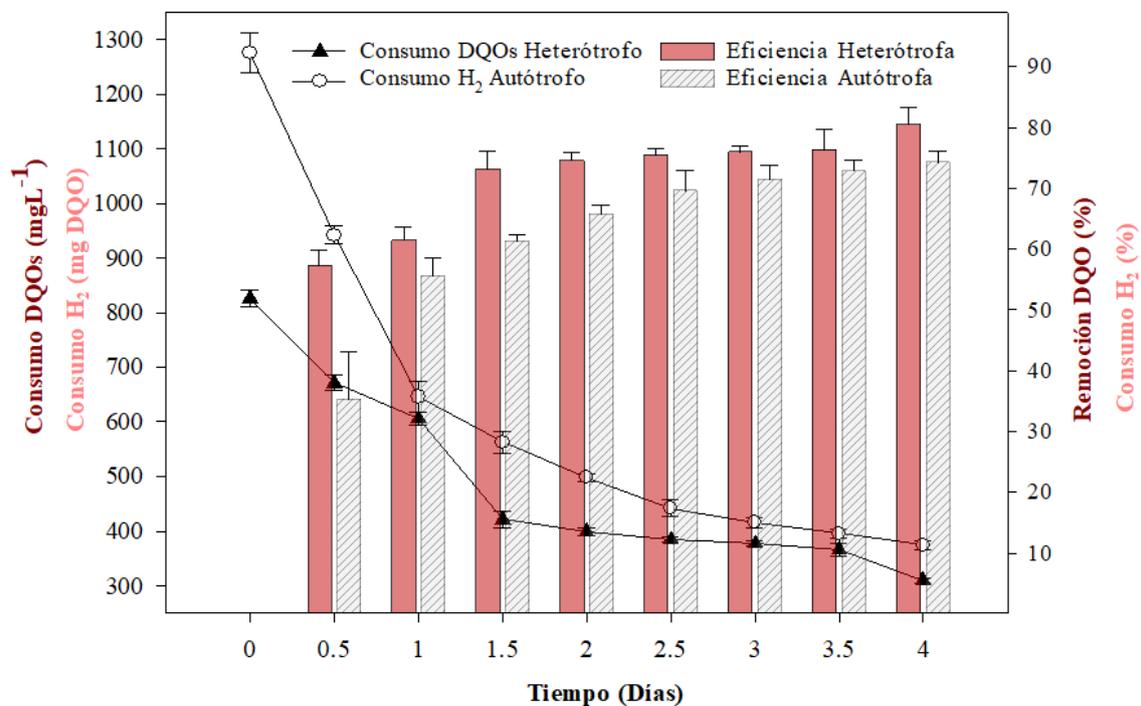
En contraste hay un estudio realizado por (Spanoghe, Vermeir, and Vlaeminck 2021) que estudia la capacidad de consumo de H₂ por las bacterias *Rh. Capsulatus*, *Rh. Sphaeroides* y *Rps. palustris* presentaron un crecimiento exponencial en 2.5 días llegando a concentraciones de 0.6 g SSV L⁻¹, y posterior a ello un decaimiento, los autores destacan de la importancia de emplear un cultivo en fase estacionaria para asegurar un mejor consumo de H₂.

Los resultados obtenidos se pueden validar con los reportados por Madigan y Gest (1979), quienes determinaron la velocidad de crecimiento de *R. capsulatus* bajo diferentes condiciones de alimentación: quimioheterotrofia, quimioautotrofia, fermentación oscura, fotoheterotrofia y fotoautotrofia en condiciones anaeróbicas. En su estudio, describieron que el tiempo de generación del microorganismo bajo condiciones heterotróficas fue de entre 1.8 y 2.0 horas, ligeramente inferior al tiempo observado bajo condiciones autotróficas, que fue de aproximadamente 3.5 horas. Por lo tanto, la concentración de biomasa producida en condiciones autotróficas es menor que en las condiciones heterotróficas.

Evaluación de la eliminación de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes

La capacidad metabólica de las PPB está relacionada con el consumo de materia orgánica biodegradable (DQO soluble) que los microorganismos pueden asimilar como fuente de sustrato, que para las condiciones heterotróficas es el DQO_{consumido} por parte de ácido acético y para las condiciones autotróficas es la el consumo de H₂ los cuales fueron convertidos en mg de DQO_{consumo H₂}.

A través de las condiciones heterotróficas se alcanzó una eficiencia de eliminación de alrededor del 80% ($\text{g DQO}_{\text{Consumido}} \text{ g}^{-1} \text{ DQO}_{\text{Inicial}}$) al finalizar el tratamiento con una concentración de DQOs de 309 mg L^{-1} . Entre los días 2 y 4, la eficiencia de eliminación se mantuvo casi constante descrita en la Gráfica 2, lo que sugiere una menor biodegradabilidad del sustrato o, tal vez, una relación inadecuada de DQO: N en las pruebas experimentales por lotes (Allegue et al., 2020a). Sin embargo, la eficiencia de eliminación refleja un alto consumo de DQO, lo que sugiere la presencia de procesos acumulativos activos, como la producción de biopolímeros de PHA, tal como se describe en la Gráfica 3.



Gráfica 2. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H₂ en condiciones heterotróficas y autotróficas

El análisis de metabolismo autotrófico por PPB mediante el empleo de H₂ como fuente de sustrato fue ligeramente menos efectiva en las condiciones de asimilación del sustrato al inicio y en el transcurso de los días este consumo fue aumentando llegando alcanzar una eficiencia de consumo del 75% ($\text{g DQO}_{\text{H}_2\text{consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{H}_2\text{ Inicial}}$) en el 4 día alcanzo la cantidad mínima de 380 mg DQO descrita en la Gráfica 2, la tasa de consumo fue aumentando gradualmente y lo cual es que es congruente con el crecimiento de biomasa, debido la baja de transferencia de masa al inicio.

Como se describe en Gráfica 2, tanto en la condición heterótrofa y autótrofa el grado de remoción de DQO y consumo de H₂ fueron ligeramente similares y presentó una diferencia de 5% mejor en la condición heterotrófica quizás la diferencia probablemente se debe a la alta síntesis de ATP en la vía heterotrófica, ya que las PPB aprovechan la energía de los fotones para los ciclos de fotofosforilación (Adessi and De Philippis 2014), generando ATP a través de ATP sintasa con transmembrana H⁺.

De acuerdo a los resultados bajo las condiciones heterotróficas, los resultados obtenidos son coherentes con estudios previos de Allegue et al. (2020b), en los que su prueba control logró una eliminación del 85%, siendo similares a este estudio bajo la misma fuente de sustrato (acetato).

El cultivo de PPB demuestra la capacidad metabólica autotrófica por su tasa de consumo demostrada en los estudios realizados por los autores (Rodero et al. 2024) con tasa de adsorción de hidrógeno de 61 mg DQO_{H₂ consumido} d⁻¹. Así también de los estudios desarrollados por los autores (Spanoghe, Vermeir, and Vlaeminck 2021) por el cual demostró de las capacidades de crecimiento fotohidrogenotrófico de tres especies (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodopseudomonas palustris*). En este estudio el cultivo de PPB empleado presenta como géneros dominantes a *Rhodobacter sp* y *Rhodopseudomonas* (>83%) (Rodero et al. 2024), por lo tanto los resultados indican los cultivos tanto en vía foto heterotrófica sobre la vía autotrófica es cercana para la asimilación de sustrato, lo que demuestra la versatilidad de los cultivos PPB en el tratamiento y aprovechamiento de diferentes residuos tanto líquidos y gaseosos.

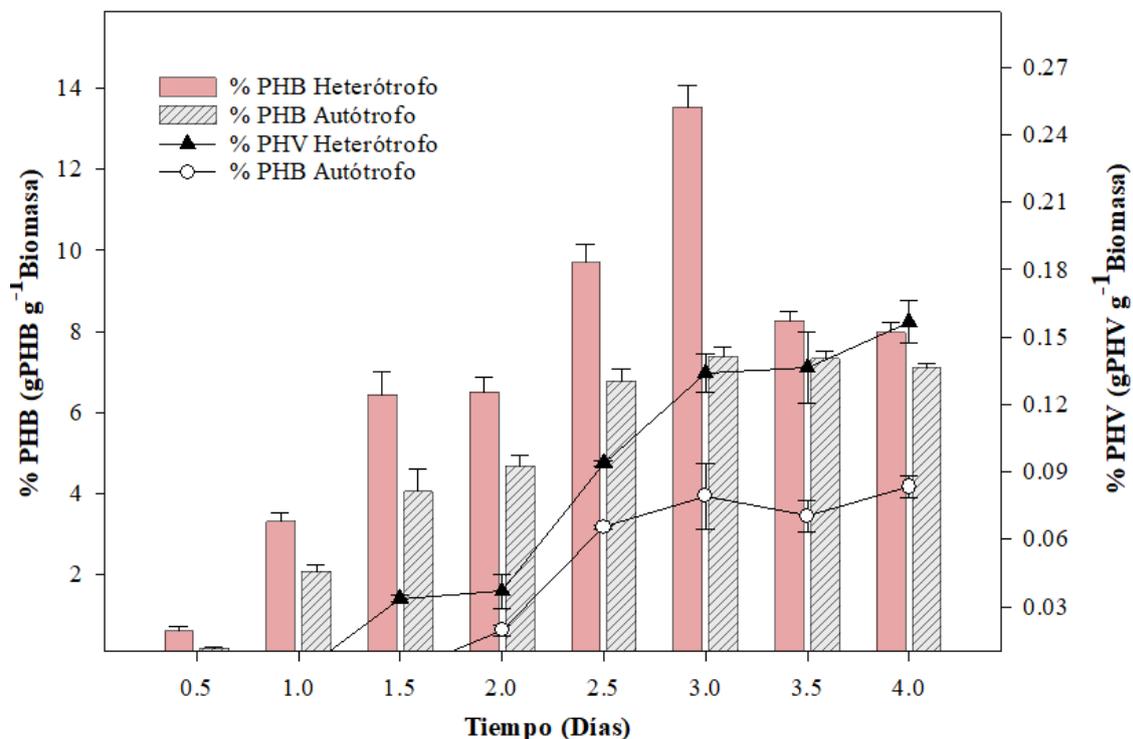
Los datos experimentales obtenidos en las pruebas experimentales permitieron el análisis de los rendimientos de biomasa ($Y_{x/s}$), es decir la eficiencia de bacterias PPB para transformar las fuentes de carbono en biomasa, encontrando un rendimiento de 0.82 g

DQO g⁻¹ DQO_{consumido} para condiciones heterotróficas y 0.66 g DQO g⁻¹ DQO_{H₂ consumido} en condiciones autotróficas.

Evaluación de la producción de PHB y PHV bajo condiciones heterotróficas y autotróficas sin limitación de nutrientes

Las condiciones de fuente de alimentación en condiciones heterótrofas o autótrofas es un tema crucial en la optimización de la producción de PHA, debido que las PPB ajustan sus rutas metabólicas bajo diferentes fuentes de sustrato, esto resulta beneficioso por un lado los ácidos grasos volátiles como el acetato es un sustrato eficiente que permite a las PPB acumular PHA y por otro lado el uso de H₂ en condiciones autotróficas permite reducir los costos operativos, sino que también es un proceso más limpio.

En términos de alimentación heterotrófica para los PPBs se alcanzó una producción máxima de PHA de 14.15 % g PHA g⁻¹ Biomasa, lo que está dentro de los rangos habituales de producción, que según la bibliografía varían entre el 3% y el 30% para cultivos mixotróficos de PPB (Allegue et al., 2020a; Fradinho et al., 2021). Se alcanzó una concentración de 938 mg L⁻¹ y 9.39 mg L⁻¹ de PHB y PHV respectivamente (Gráfica 3), los días siguientes presentó un descenso en la producción de PHA lo que resulta congruente con la disminución de la fuente de carbono demostrada en la Gráfica 2.



Gráfica 3. Producción de PHB y PHV en condiciones heterotróficas y autótrofas de PPB

En la Gráfica 2 se puede observar la relación que existe de la DQOs con la producción de PHB bajo condiciones heterotróficas, ya que existe una disminución de la producción de los polímeros cuando la fuente de carbono es baja, concretamente en el día 3.5 y 4 días (Monroy and Buitrón 2020). No obstante, en condiciones de un efluente real proveniente de la fermentación oscura puede resultar un menor rendimiento.

Bajo condiciones autotróficas los cultivos PPBs llegaron a la máxima producción de PHA de 7.25% g PHA g⁻¹ biomasa con una concentración máxima de 620 mg L⁻¹ PHB y 6.12 mg L⁻¹ PHV, en los últimos días el cultivo de PPBs mantuvo una producción constante de PHA, el cual demuestra una efectiva absorción de H₂. Además, en la Gráfica 3 se observa un proceso de acumulación parcial de PHB, lo que sugiere que las PPB podrían producir PHB en una vía autotrófica, aunque de manera más prolongada que en la vía heterotrófica.

Se comprueba la posibilidad de acumulación de PHB y PHV bajo las dos diferentes condiciones de alimentación en el tercer día lo que demuestra que el pico de producción se alcanza al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de las PPB y coincide con la máxima eliminación de DQO, aunque los rendimientos de producción fueron diferentes, superando en un 50% la condición heterotrófica frente a la autótrofa. Una posible explicación de la diferencia significativa en el rendimiento de PHB en condiciones heterotróficas es que el acetato se convierte fácilmente en acetil-CoA, que, como se mencionó anteriormente, es un precursor clave en la formación de PHB (Karthikeyan et al., 2015). En el caso de las condiciones autotróficas, la conversión de acetato a acetil-CoA se realiza a través de la enzima acetil-CoA sintasa el cual es un proceso más complejo y resulta en un consumo energético mayor.

El bajo rendimiento para ambas condiciones también puede explicarse, en parte, porque algunas rutas de síntesis se desvían hacia la producción de proteínas microbianas o compiten con la producción de H₂ (Hülse et al., 2016). De manera similar, se ha determinado que en cultivos mixtos de PPB (*R. capsulatus*, *R. sphaeroides* y *R. palustris*) bajo condiciones autotróficas se logró un rendimiento proteico del 42% en el tercer día.

Además, el pH puede influir en la evolución del almacenamiento de PHA, los resultados indican que la mayor producción de PHA se produjo cuando el pH estuvo entre 7 y 8, es decir, en un medio neutro o ligeramente básico. Estos resultados son consistentes con los

hallazgos de Oehmen et al. (2014). Se ha determinado que ligeros aumentos en el pH pueden mejorar la producción de PHA. Por ejemplo, Khatipov et al. (1998) informó que, con un incremento del pH de 6.8 a 7.5, la producción de PHB acumulado se triplicó.

La Gráfica 1 muestra que, en el segundo día, el pH bajó de 9.5 a 8.9, y concomitantemente se observó una producción de alrededor del 7% de PHB. Sin embargo, ese mismo día, el pH disminuyó a 7.8, lo que coincidió con la mayor producción de polímero, alcanzando un 14% de PHB en el tercer día, duplicando así su producción. Aunque el pH puede inducir la producción de polímeros, una vez sintetizados, estos pueden ser degradados o transformados para permitir la supervivencia del microorganismo en condiciones de pH subóptimo (Obruca et al., 2021).

La asimilación de la fuente de carbono en las PPB está asociada con la producción de polímeros, por lo que una correcta biodegradación del sustrato para las condiciones heterótrofas y un alto consumo H₂ para las condiciones autotróficas coincide con la acumulación de PHA (Gráfica 3). Esto resulta ventajoso, ya que puede reducir el tiempo necesario para producir el biopolímero. A diferencia de otros estudios (Carlozzi et al. 2019), donde se ha observado que algunos cultivos producen primero la biomasa y luego los PHA, lo que conlleva tiempos de cultivo más prolongados, en este estudio se observó que a partir del 4 día se logra la producción de PHB se ha informado que las células cambian su metabolismo para usar el ciclo de ácido tricarbóxico para metabolizar el acetato y producir el PHA.

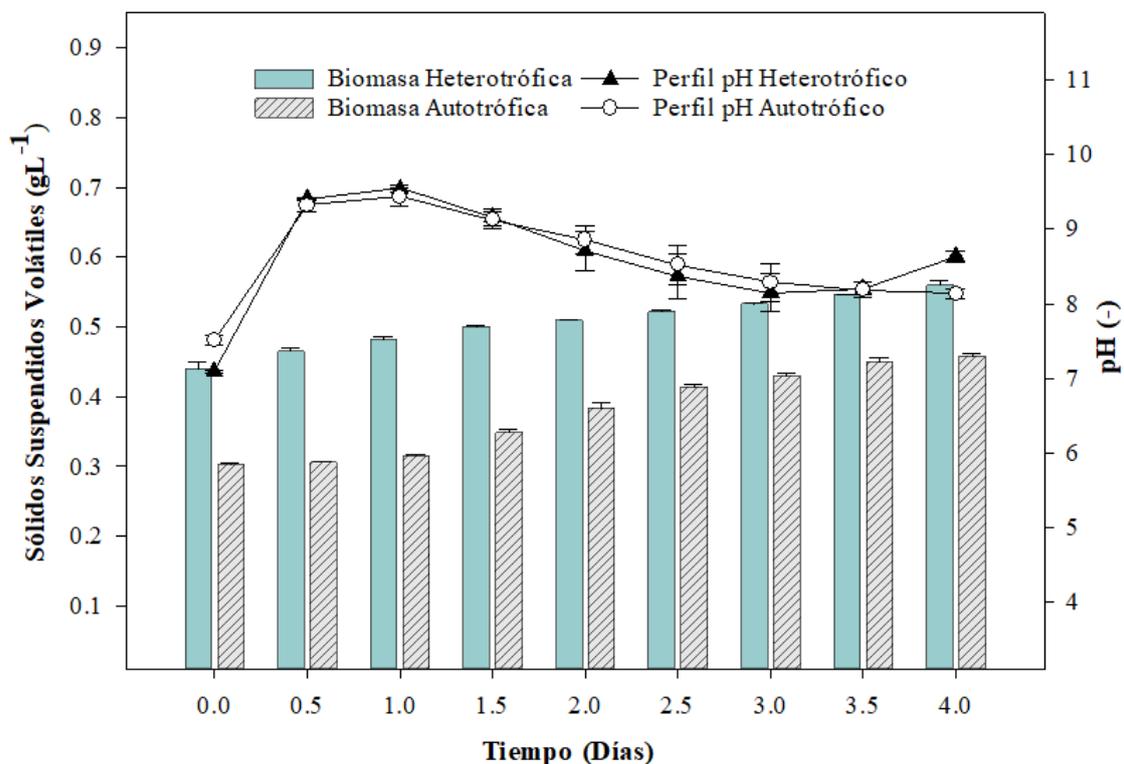
Evaluación del efecto de la limitación de N en el crecimiento bacteriano bajo condiciones heterotróficas y autotróficas

Dentro del grupo de las bacterias fotosintéticas púrpuras PPB, se pueden clasificar generalmente en dos grupos de microorganismos productores de PHA. Esta clasificación está basada sobre la limitación de nutrientes, en el primer grupo son microorganismos que no requieren de limitación de nutrientes y acumulan el polímero durante la fase de crecimiento y estacionario, en el otro caso el segundo grupo requiere de limitaciones de nutrientes o fuentes de carbono para la acumulación de PHA (Raza, Abid, and Banat 2018). Para evaluar el efecto de la limitación de nutrientes de nitrógeno y magnesio en los cultivos de PPBs se tomó como referencia de control los resultados obtenidos

mediante el cultivo de PPB sin limitación de nutrientes en las condiciones heterótrofas y autótrofas mencionadas anteriormente.

En la Gráfica 4 se describe el efecto de la limitación de nitrógeno en la producción de la biomasa en la condición heterotrófica se logró alcanzar una concentración de biomasa máxima de 0.55 g L⁻¹ de SSV L⁻¹ frente a la condición de cultivo sin limitación de nitrógeno (control) existe una disminución del crecimiento bacteriano en 21%. Dicho efecto se manifiesta de igual forma para las condiciones autótrofas con una concentración máxima de 0.45 g L⁻¹ de SSV L⁻¹ una disminución del 27% frente a la condición de control

Los resultados muestran que la limitación o deficiencia del nitrógeno disminuye en gran medida el crecimiento microbiano (Bengtsson 2009; Serafim et al. 2004), esto se puede explicar ya que el nitrógeno es componente crucial de las proteínas y enzimas el cual influye directamente en el crecimiento celular (Venkateswar Reddy and Venkata Mohan 2012). Sin embargo, en la gráfica 4, se puede evidenciar una mayor tasa de crecimiento para el cultivo autótrofo de 0.069 g SSV L⁻¹ d⁻¹ frente a las condiciones heterotróficas que alcanzaron una tasa de crecimiento máxima de 0.05 g SSV L⁻¹ d⁻¹.

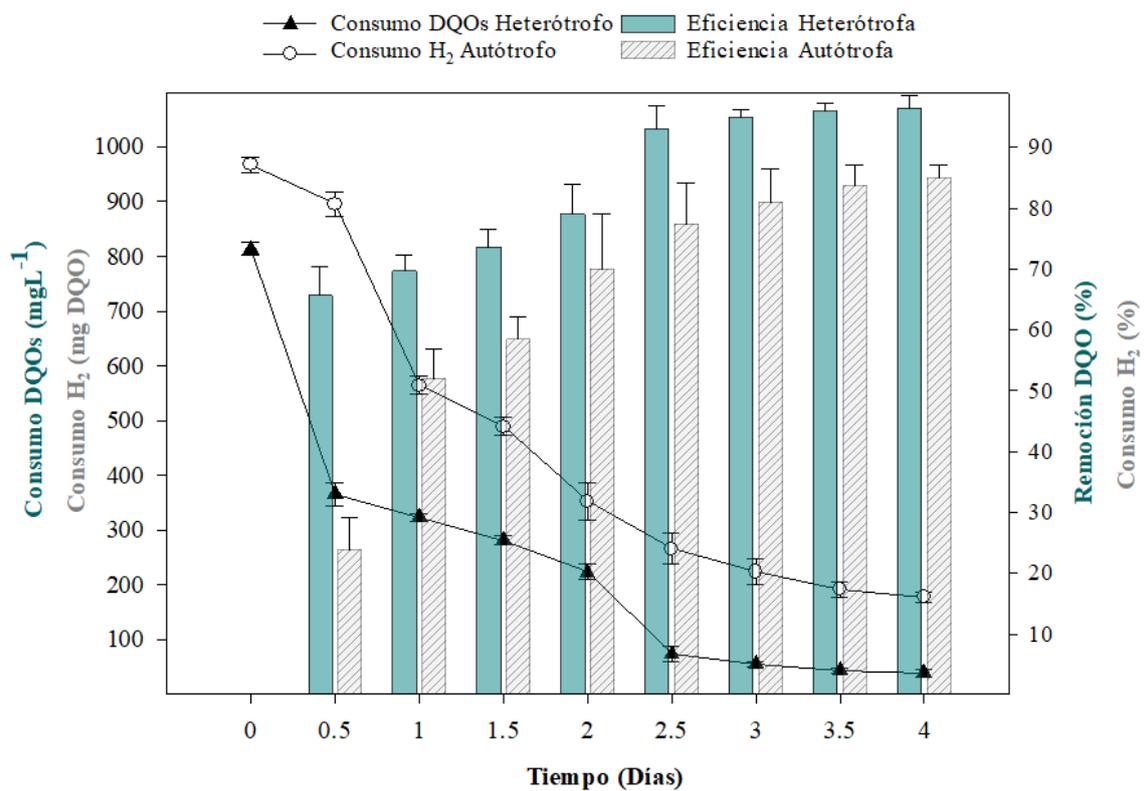


Gráfica 4. Crecimiento bacteriano y perfil de PH de las PPB con limitación de N en condiciones heterotróficas y autótroficas

Evaluación del efecto de la limitación de N en la eliminación de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas

La limitación de nitrógeno para las condiciones heterotróficas sobre remoción de DQOs frente a la condición control fue superior en 17%, alcanzado una remoción del 97% ($\text{g DQO}_{\text{Consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{Inicial}}$) Gráfica 5, una concentración de DQOs final de 40 mg L⁻¹, lo que se podría pensar que la condición de estrés induce a un aumento el tasa de remoción de DQO, esta interpretación también está respaldada por lo hallazgos de (Mata-De-la-Vega et al. 2022) que bajo condiciones heterotróficas se logran una remoción del 90%.

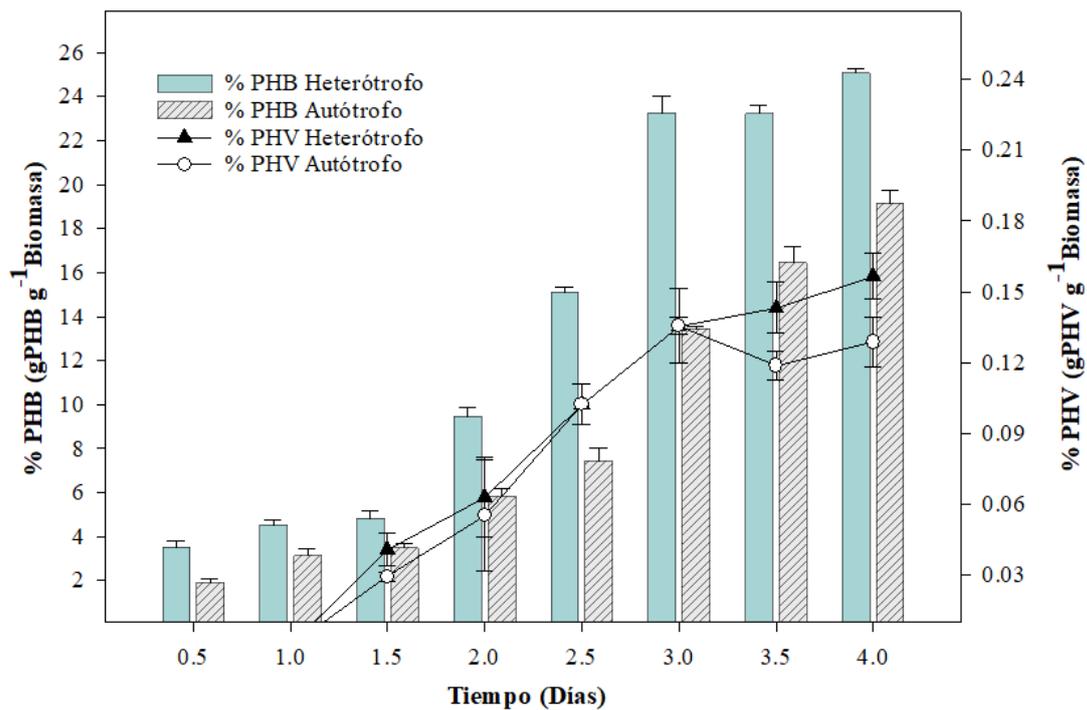
Bajo las condiciones autotróficas la limitación de N ha permitido mejorar ligeramente la tasa de consumo del H₂ en 5% frente al control, alcanzando una adsorción de H₂ del 80% ($\text{g DQO}_{\text{H}_2\text{consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{H}_2 \text{ Inicial}}$) con una concentración final de 170 mg DQO, esto demuestra que no existe un efecto significativo para las condiciones autotróficas.



Gráfica 5. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H₂ con limitación de N en condiciones heterotróficas y autotróficas

Evaluación del efecto de la limitación de N en la producción de PHB y PHV bajo condiciones heterotróficas y autotróficas

Para las condiciones heterótrofas, en la Gráfica 6 se observa que las DQO se han asimilado en su totalidad en el tercer día y que no hay fuente de carbono disponible. En este punto, el rendimiento de la producción de PHB y PHV es notable, alcanzando concentraciones de alrededor de 25 % (g PHA g⁻¹ de biomasa). Estos resultados indican que, cuando las fuentes de carbono son limitadas, se induce una mayor acumulación de PHA. Los resultados son similares a los reportados por Wu et al. (2022), quienes evidenciaron únicamente la presencia de PHB en el cuarto día, alcanzando una producción de 0.48 g g⁻¹. Curiosamente, esto ocurrió cuando las fuentes de carbono externas fueron limitadas, y los autores describen que inicialmente se observó una acumulación de glucógeno en las células mientras se agotaba la fuente de carbono.



Gráfica 6. Producción de PHB y PHV con limitación de N en condiciones heterotróficas y autótropas de PPB

En cuanto las condiciones de alimentación autotrófica con limitación de fuente de N, siguió la misma tendencia en la producción de 18 % PHB y PHV, aclarando que la baja producción específica está relacionada directamente con la tasa de adsorción de H₂ descrita en la gráfica 5 bajo condiciones autótropas. Sin embargo, la producción es notable en el cuarto día llegando a concentraciones de 2057 mg L⁻¹ en la PHB a comparación de

los primeros días 75 mg L⁻¹, claramente existe una relación sobre el sumidero de electrones aportado por el consumo H₂. El estudio realizado por los autores (Santin et al. 2024) respalda dicha suposición al ellos evaluar el efecto de la concentración de H₂, indicando que logra una mayor acumulación de PHB de 53.8% bajo la limitación de N a concentraciones de 40% de H₂ en contraste a concentraciones bajas de H₂ produciendo un efectos de 2.7 veces mayor que la condición control, además en dicho estudio se comprueba que a partir del 4 día existe una concentración relevante de la acumulación de PHB.

Esto también es congruente con los resultados obtenidos en la producción de biomasa bajo condiciones autotróficas (Gráfica 4), donde el H₂ puede representar una limitación en la asimilación de la fuente de carbono lo que afecta la biomasa. Para lograr una mayor producción de PHB en condiciones limitantes de nitrógeno, es crucial garantizar una atmósfera rica en H₂. La justificación de esta suposición es que, bajo condiciones autotróficas, el H₂ como fuente de potencial reductor contribuye a la fijación de CO₂ en los polímeros (PHB). Este mecanismo es similar al observado en algas fotosintéticas bajo condiciones limitantes de nitrógeno (Alboresi et al., 2016). Por lo tanto, es recomendable que la fuente reductora siempre esté en exceso para impulsar una mejor fijación de CO₂.

Es importante detallar que efecto de la deficiencia de nutrientes en el PHA acumulado depende del tipo de cepa, del tipo de nutrientes limitados y de la fuente de carbono. Por ejemplo, Higuchi-Takeuchi y Numata (2019) demostraron que, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, no hubo un efecto positivo en la producción de PHB. Por el contrario, Carlozzi y Touloupakis (2021) encontraron una mayor producción de PHB bajo deficiencia de nitrógeno usando el mismo microorganismo (*Rhodovulum sulfidophilum*). Esto sugiere que la limitación de nitrógeno está influenciada por la fuente de carbono, el tipo de microorganismo y el pH, como se ha demostrado en el presente trabajo.

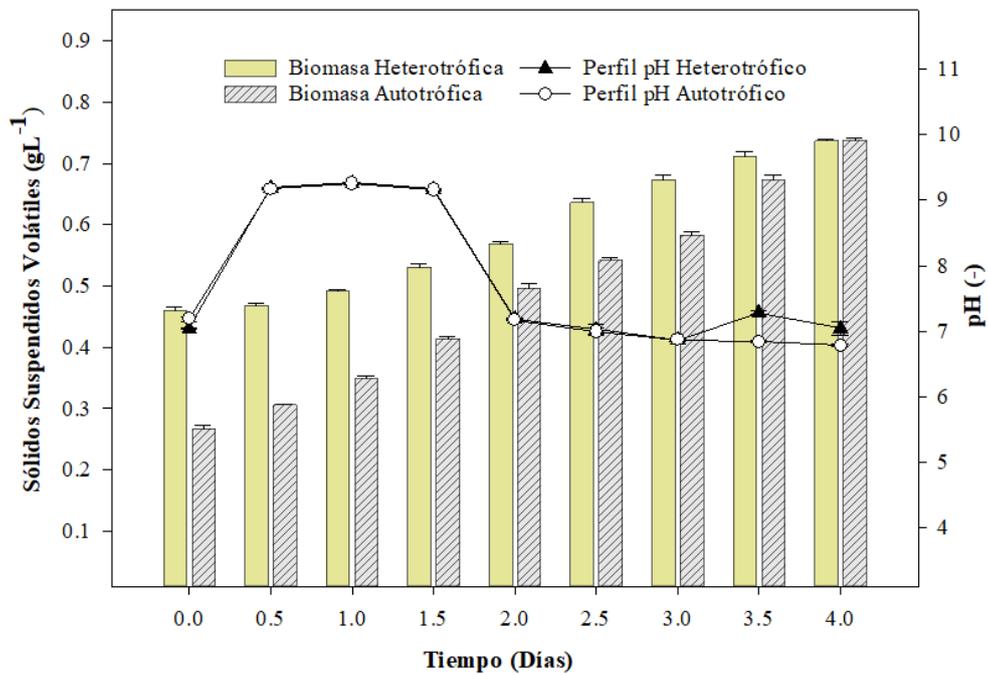
Evaluación del efecto de la limitación de Mg⁺² en el crecimiento bacteriano y pH bajo condiciones heterotróficas y autotróficas

Para los cultivos de las PPB la generación de estrés nutricional es uno de los principales factores que pueden impulsar la producción de PHB, ya que las células bacterianas actúan una serie de cambios metabólicos que conducen a la redistribución de los fuentes de C y la activación de diferentes mecanismos de almacenamiento dando como resultado en una

mayor síntesis y producción del polímero (Jahn et al. 2021; Melnicki, Eroglu, and Melis 2009). Específicamente el magnesio es de vital importancia para la función celular como por ejemplo el Mg²⁺ se utiliza para enzimas metabólicas, replicación de ADN, estabilización de ácidos nucleicos (Walker 1994).

Mediante la alimentación heterótrofa se presenta una tasa de crecimiento baja de 0.1 g SSV L⁻¹ d⁻¹ y alcanzó una concentración máxima de 0.7 g SSV L⁻¹ frente a las condiciones de control, es decir el cultivo heterótrofo sin limitación de nutrientes no se ha evidenciado ni incremento o decrecimiento significativo de la biomasa microbiana, lo que induce que la limitación de Mg²⁺ no presenta un efecto en el crecimiento celular. Aunque en varios estudios (Chen et al. 2019; Lusk, Williams, and Kennedy 1968) se ha demostrado que la limitación de Mg reduce el crecimiento bacteriano, no obstante, los autores (Martin, Huang, and Thompson 2023) han indicado que dicha afirmación es correcta siempre y cuando se presenta una limitación conjunta de Mg²⁺ y Ca²⁺.

Para la condición autotrófica en la gráfica 7 se puede evidenciar claramente el efecto de la limitación de Mg²⁺ en el crecimiento bacteriano presentando una tasa de crecimiento de 0.17 g SSV L⁻¹ d⁻¹ siendo superior en un 50 % a las condiciones de control sin limitación de nutrientes, bajo estas condiciones la fuente autotrófica alcanzó la misma concentración que el cultivo heterotrófico.



Gráfica 7. Crecimiento bacterianos y perfil de PH de las PPB con limitación de Mg²⁺ en condiciones heterotróficas y autotróficas

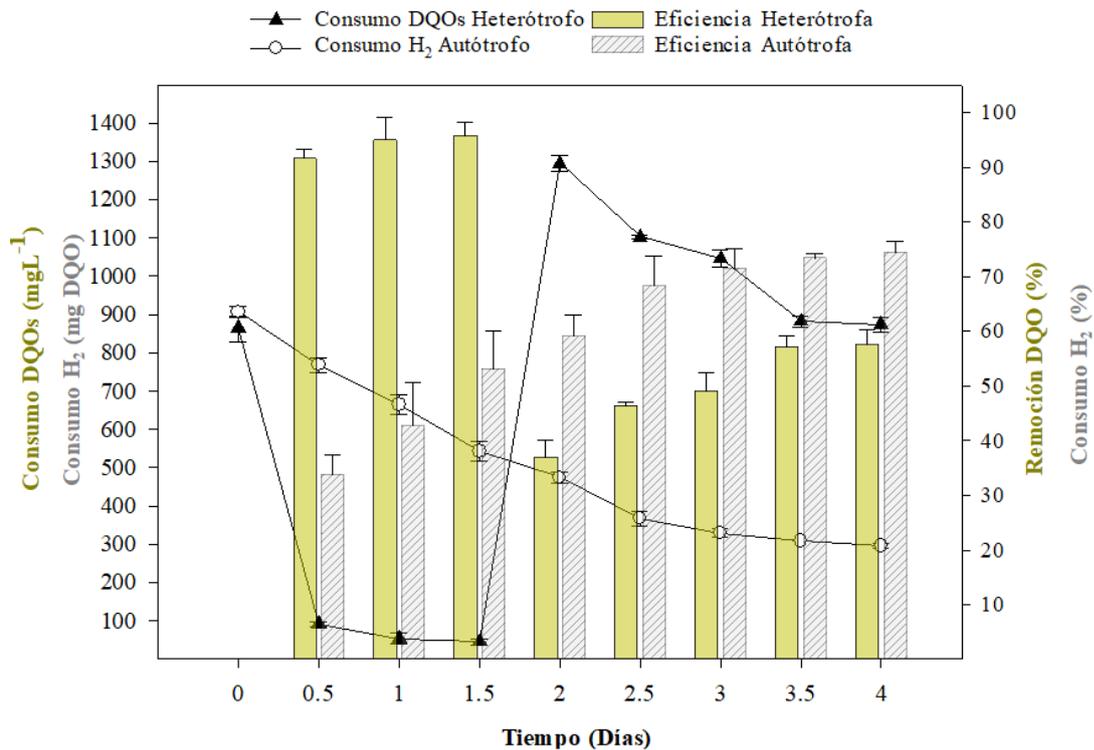
Mediante una búsqueda exhaustiva no hay reportes de limitación de Mg²⁺ bajo condiciones autótrofas en cultivos PPBs lo que resalta la importancia del presente estudio al demostrar que la limitación de Mg²⁺ permite mejor el crecimiento bacteriano bajo condiciones autótrofas e incluso llegar a alcanzar las concentraciones de cultivo heterótrofo estos resultados se pueden tomar como referencia para otros estudios sobre las PPBs.

Evaluación del efecto de la limitación de Mg²⁺ en la remoción de DQO bajo condiciones heterotróficas y autotróficas

En cuanto la condición heterotrófica de limitación de magnesio, se puede visualizar un descenso notable de la DQOs en los primeros días una eficiencia remoción del 96% ($\text{g DQO}_{\text{Consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{Inicial}}$) descrito en la Gráfica 8 lo que conlleva a una adición de la fuente de carbono en el 1.5 días mediante la duplicación de la DQOs lo que también puede inducir una mayor producción de PHA, algunos autores han señalado que bajo condiciones limitantes de magnesio se puede inducir la producción de PHA e incluso con altas concentraciones de amoníaco (Melnicki, Eroglu, and Melis 2009; Mukhopadhyay, Patra, and Paul 2005).

Se propone como una alternativa para limitar la producción de hidrógeno mediante la inhibición de la nitrogenasa e impulsar la acumulación de PHA. Por ejemplo, Corneli et al. (2016) demostró que la deficiencia de Mg²⁺ cambia a *R. palustris* de H₂ a la producción de PHB bajos fuentes de carbono iniciales de VFA y ratifica que la carencia de gama de nutrientes para el desarrollo celular e impulsar el almacenamiento de fuentes de carbono

En situación de alimentación autotrófica, el escenario de la tasa de absorción de H₂ fue de alrededor del 75 % ($\text{g DQO}_{\text{H2consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{H2 Inicial}}$) esto señala que no existe una diferencia frente las condiciones de control, reportándose la misma eficiencia de adsorción en condiciones sin limitación de nutrientes.

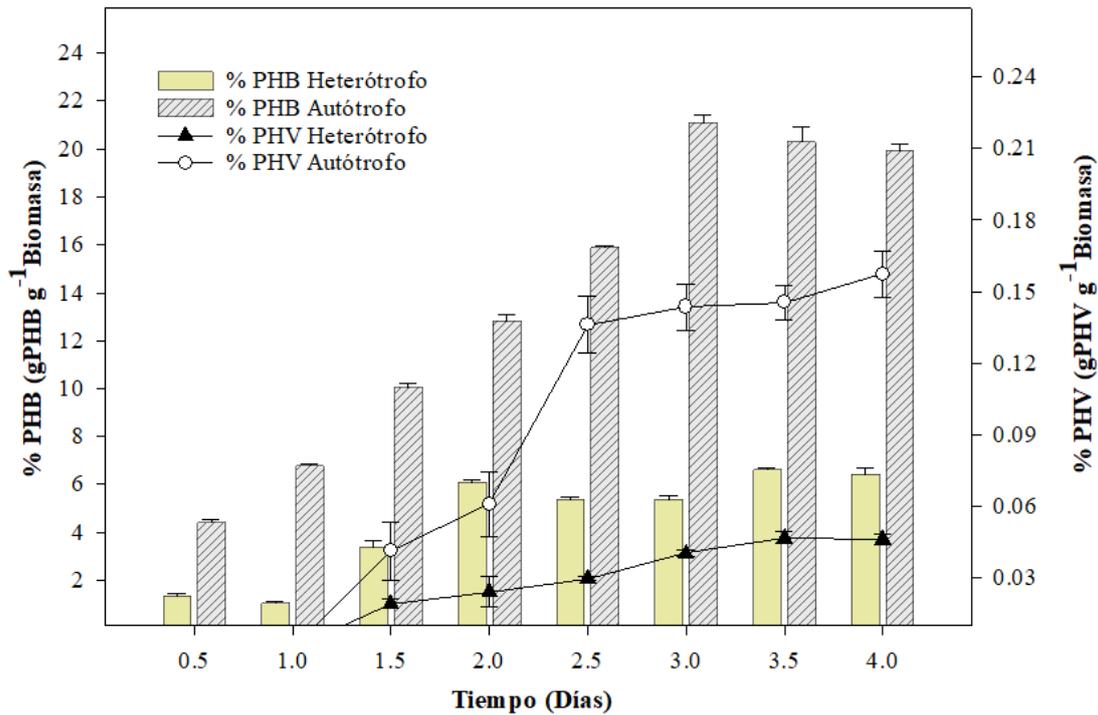


Gráfica 8. Consumo DQO y eficiencia de remoción y consumo H₂ con limitación de Mg²⁺ en condiciones heterótrofas y autótrofas

Evaluación del efecto de la limitación de Mg²⁺ en la producción de PHB y PHV condiciones heterotróficas y autotróficas

El efecto de la limitación de Mg²⁺ en condiciones heterotróficas resultaron negativas porque se redujo la producción de PHB frente a la condición control, reduciéndose un 42%, se determinó una producción máxima de 6% (g PHA g⁻¹ de biomasa). De la misma forma se siguió dicha tendencia para la producción de PHV.

Para las condiciones autotróficas la limitación de Mg²⁺ resultó ser beneficiosa alcanzando concentraciones de producción de 23% (g PHA g⁻¹ de biomasa) esto resultó un incremento de más 3 veces frente a las condiciones de control con una concentración máxima de 1500 mg L⁻¹. Una posible explicación del efecto de Mg²⁺ en la producción de PHB autotrófica puede estar en que el Mg²⁺ impulsa una mejor fijación del CO₂, algo similar se ha presentado en el estudio por los autores (Santin et al. 2024) que determinaron mejores tasas de fijación del CO₂ bajo la limitación de Mg²⁺ y un ligero aumento en la conversión de PHB bajo las condiciones control.



Gráfica 9. Producción de PHB y PHV con limitación de Mg²⁺ en condiciones heterotróficas y autótrofas de PPB

En la gráfica 9, se puede observar claramente un efecto contrastante de las condiciones heterotróficas y autótrofas en la producción de PHB y PHV, donde se alcanzaron la mejor producción de PHB en condiciones de autótrofica a una producción de alrededor del 21% de PHB en contraste en la alimentación heterotrófica existe un efecto negativo la limitación de Mg⁺² decayendo a una concentración máxima de 6% de PHB.

Se desconoce con precisión la razón de la limitación de magnesio en las PPB, únicamente se justifica que es producto del estrés inducido al microorganismo que induce al microorganismo a una reacción metabólica más acelerada y el almacenamiento de fuentes de carbono en el cuerpo celular, esto se podría averiguar con mayor precisión con las rutas metabólicas y la expresión de genes.

Es importante describir que en estos experimentos el pH no se controló llegando alcanzar pH cercanos a 9, lo que probablemente el cultivo de PPB no podrían superar dos condiciones de estrés, es decir pH y deficiencia de nutrientes. Por lo que, próximos estudios son importante corroborar la hipótesis de ensayos experimentales bajo condiciones limitantes de N con control de pH. Como también es necesario proporcionar condiciones apropiadas de limitación de nutrientes a las células bacterianas para apoyar una mayor acumulación del polímero. Este es un proceso elaborado, que requiere ser experimentado en detalle.

CONCLUSIONES

El presente estudio ha demostrado la posibilidad de acumulación de PHA bajos dos diferentes fuentes de carbono mediante alimentación heterotrófica (ácido acético) y autotrófica (CO₂ y H₂) y como también ha demostrado el papel de la limitación de nutrientes como N y Mg²⁺ en la acumulación de PHA para un cultivo mixto de PPB, encontrándose los siguientes resultados.

En los ensayos experimentales sin limitación de nutrientes (control) se ha determinado que, bajo condiciones heterotróficas, se alcanzó una mayor concentración de SSV, logrando una concentración máxima de 0.7 g L⁻¹ de biomasa en el cuarto día. En contraste, bajo condiciones autotróficas, se observó una tendencia decreciente de la biomasa en los primeros días, alcanzando únicamente una concentración máxima de 0.53 g L⁻¹ en el día 4, lo que se atribuye a una baja transferencia de masa entre gas y líquido. El crecimiento celular en condiciones heterotróficas fue superior del 27% frente a la condición autotrófica. Sin embargo, las PPB demostraron su versatilidad metabólica en ambas condiciones de alimentación, lo que se reflejó en la degradación de materia orgánica y de una tasa de consumo de H₂. En condiciones heterotróficas se logró una eficiencia de eliminación de DQO del 80% ($\text{g DQO}_{\text{Consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{Inicial}}$), frente a una eficiencia de consumo de H₂ del 75% ($\text{g DQO}_{\text{H2consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{H2 Inicial}}$) en condiciones autotrófica, esto indica que los cultivos de PPB presentan una asimilación dependiente de la fuente de carbono. Además, los rendimientos de biomasa fueron de 0.82 (g DQO g⁻¹ DQO consumido) en condiciones heterotróficas y 0.66 (g DQO g⁻¹ DQO consumido) en condiciones autotróficas. En estos escenarios, hubo producción de PHB, en condiciones heterotróficas fue un total de 14.15% g PHB g⁻¹ biomasa, representando un 50% superior a la de las condiciones autotróficas, (7% g PHB g⁻¹ biomasa en condiciones autotróficas).

La limitación de nitrógeno bajo condiciones heterótrofas y autótrofas presentó un efecto significativo en la concentración de biomasa, presentando una disminución en 21% y 27% respectivamente frente a las condiciones de control. En cuando la asimilación de la fuente de carbono en condiciones heterotróficas fue del 97% (g DQO consumido g⁻¹ DQO inicial) aumentando un 17% frente al control, encontraste bajo condiciones autotróficas el efecto no resultó significativo la absorción del H₂ fue de 80% ($\text{g DQO}_{\text{H2consumido}} \text{g}^{-1} \text{DQO}_{\text{H2 Inicial}}$) mejorando un 5% frente al control. Se alcanzó una concentración máxima

de PHB del 25% g PHB g⁻¹ biomasa bajo condiciones heterótrofas y en condición autotróficas de 18 g PHB g⁻¹ biomasa, logrando una eficiente conversión del carbono en PHA frente al control.

Por otro lado, la limitación de Mg⁺² en términos de condición heterotrófica no presentó un efecto significativo en el crecimiento bacteriano manteniéndose una concentración de SSV similar a las condiciones de control de 0.7 g SSV L⁻¹, sin embargo, para las condiciones autotróficas presentó una tasa de crecimiento de 0.17 g SSV L⁻¹ d⁻¹ siendo superior en un 50 % a las condiciones de control. El resultado de la producción de PHA en limitación de Mg⁺² presentó un efecto positivo en las condiciones autotróficas, con una producción máxima de 21% PHB un incremento de más de 3 veces de las condiciones de control y un efecto negativo en las condiciones heterotróficas decayendo la producción de PHA en 6% g PHB g⁻¹ biomasa.

RECOMENDACIONES

Para las próximas investigaciones si se trabaja en la producción de PHA bajo condiciones limitantes de nutrientes se recomienda:

- La validación de resultados en condiciones reales trabajando con residuos líquidos y gaseosos productos de la fermentación oscura.
- Para asegurar que la limitación de los nutrientes es recomendable asegurar la medición de las concentraciones de N total y Mg⁺².
- Durante el transcurso de los ensayos realizado el mayor control de pH y temperatura.
- Medición de los otros productos de valor agregado como proteínas, H₂ y Poli P.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adessi, Alessandra, and Roberto De Philippis. 2014. "Photosynthesis and Hydrogen Production in Purple Non Sulfur Bacteria: *Fundamental and Applied Aspects*." In , 269–90. http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-8554-9_12.
- Allegue, Luis D., Daniel Puyol, and Juan Antonio Melero. 2020. "Food Waste Valorization by Purple Phototrophic Bacteria and Anaerobic Digestion after Thermal Hydrolysis." *Biomass and Bioenergy* 142: 105803. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096195342030338X>.
- Bengtsson, Simon. 2009. "The Utilization of Glycogen Accumulating Organisms for Mixed Culture Production of Polyhydroxyalkanoates." *Biotechnology and Bioengineering* 104(4): 698–708. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22444>.
- Braungart, Michael, William McDonough, and Andrew Bollinger. 2007. "Cradle-to-Cradle Design: Creating Healthy Emissions – a Strategy for Eco-Effective Product and System Design." *Journal of Cleaner Production* 15(13–14): 1337–48.
- Byrom, D. 1987. "Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics." *Trends in Biotechnology* 5(9): 246–50. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779987901004>.
- Capson-Tojo, Gabriel et al. 2020. "Purple Phototrophic Bacteria for Resource Recovery: Challenges and Opportunities." *Biotechnology Advances* 43: 107567.
- Cardeña, René, Idania Valdez-Vazquez, and Germán Buitrón. 2017. "Effect of Volatile Fatty Acids Mixtures on the Simultaneous Photofermentative Production of Hydrogen and Polyhydroxybutyrate." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40(2): 231–39. <http://link.springer.com/10.1007/s00449-016-1691-9>.
- Carlozzi, Pietro et al. 2019. "Poly-3-Hydroxybutyrate and H₂ Production by *Rhodospseudomonas Sp* . S16-VOGS3 Grown in a New Generation Photobioreactor under Single or Combined Nutrient Deficiency." *International Journal of Biological Macromolecules* 135: 821–28.
- de Castro, Tainara Rigotti et al. 2022. "The Potential of Cleaner Fermentation Processes for Bioplastic Production: A Narrative Review of Polyhydroxyalkanoates (PHA) and Polylactic Acid (PLA)." *Journal of Polymers and the Environment* 30(3): 810–32.
- Chanprateep, Suchada, Ketsunee Buasri, Auntiga Muangwong, and Phonpisit Utiswannakul. 2010. "Biosynthesis and Biocompatibility of Biodegradable Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-4-Hydroxybutyrate)." *Polymer Degradation and Stability* 95(10): 2003–12.
- Chen, Yi et al. 2019. "Effect of Calcium on the Interaction of *Acinetobacter Baumannii* with Human Respiratory Epithelial Cells." *BMC Microbiology* 19(1): 264. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1643-z>.
- Choi, Seonkyung. 2020. "The Determinants of the Transition in South Korea from

- Vocational and General High School to Higher Education, Including a Gender Comparison.” *International Journal of Higher Education* 9(4): 1.
- Dinesh, Gujuluva Hari et al. 2020. “Simultaneous Biohydrogen (H₂) and Bioplastic (Poly-β-Hydroxybutyrate-PHB) Productions under Dark, Photo, and Subsequent Dark and Photo Fermentation Utilizing Various Wastes.” *International Journal of Hydrogen Energy* 45(10): 5840–53. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036031991933349X>.
- Engelmann, Th. W. 1883. “Bacterium Photometricum.” *Pflüger, Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere* 30(1): 95–124.
- Flüchter, Sebastian et al. 2019. “Anaerobic Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Its Precursor 3-Hydroxybutyrate from Synthesis Gas by Autotrophic *Clostridia*.” *Biomacromolecules* 20(9): 3271–82. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biomac.9b00342>.
- Fradinho et al. 2021. “Up-Scale Challenges on Biopolymer Production from Waste Streams by Purple Phototrophic Bacteria Mixed Cultures: A Critical Review.” *Bioresource Technology* 327: 124820.
- Fradinho, J.C., M.A.M. Reis, and A. Oehmen. 2016. “Beyond Feast and Famine: Selecting a PHA Accumulating Photosynthetic Mixed Culture in a Permanent Feast Regime.” *Water Research* 105: 421–28.
- Ghimire, Anish et al. 2016. “Concomitant Biohydrogen and Poly-β-Hydroxybutyrate Production from Dark Fermentation Effluents by Adapted *Rhodobacter Sphaeroides* and Mixed Photofermentative Cultures.” *Bioresource Technology* 217: 157–64. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416303029>.
- Ghosh, Shiladitya, Umme Kulsoom Dairkee, Ranjana Chowdhury, and Pinaki Bhattacharya. 2017. “Hydrogen from Food Processing Wastes via Photofermentation Using Purple Non-Sulfur Bacteria (PNSB) – A Review.” *Energy Conversion and Management* 141: 299–314. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890416307798>.
- Griffin, Benjamin M., Joachim Schott, and Bernhard Schink. 2007. “Nitrite, an Electron Donor for Anoxygenic Photosynthesis.” *Science* 316(5833): 1870–1870. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1139478>.
- Grousseau, Estelle et al. 2014. “Phosphorus Limitation Strategy to Increase Propionic Acid Flux towards 3-Hydroxyvaleric Acid Monomers in *Cupriavidus Necator*.” *Bioresource Technology* 153: 206–15.
- Hallenbeck, Patrick C., and Yuan Liu. 2016. “Recent Advances in Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria.” *International Journal of Hydrogen Energy* 41(7): 4446–54. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319915026920>.
- Haywood, G. 1989. “The Importance of PHB-Synthase Substrate Specificity in Polyhydroxyalkanoate Synthesis by *Alcaligenes Eutrophus*.” *FEMS Microbiology Letters* 60(2): 245.
- Hülsen, Tim et al. 2018. “Simultaneous Treatment and Single Cell Protein Production from Agri-Industrial Wastewaters Using Purple Phototrophic Bacteria or Microalgae – A Comparison.” *Bioresource Technology* 254: 214–23.

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418300397>.
- Hülßen, Tim, Damien J. Batstone, and Jürg Keller. 2014. "Phototrophic Bacteria for Nutrient Recovery from Domestic Wastewater." *Water Research* 50: 18–26.
- Hunter, C. Neil, Fevzi Daldal, Marion C. Thurnauer, and J. Thomas Beatty, eds. 2009. 28 *The Purple Phototrophic Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Imhoff, Johannes F., and Ursula Bias-Imhoff. 1995. "Lipids, Quinones and Fatty Acids of Anoxygenic Phototrophic Bacteria." In *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 179–205. http://link.springer.com/10.1007/0-306-47954-0_10.
- Jahn, Michael et al. 2021. "Protein Allocation and Utilization in the Versatile Chemolithoautotroph *Cupriavidus Necator*." *eLife* 10. <https://elifesciences.org/articles/69019>.
- Kadouri, Daniel, Edouard Jurkevitch, Yaacov Okon, and Susana Castro-Sowinski. 2005. "Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates." *Critical Reviews in Microbiology* 31(2): 55–67. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410590899228>.
- Kim, Myung Kyum et al. 2004. "Odorous Swine Wastewater Treatment by Purple Non-Sulfur Bacteria, *Rhodospseudomonas Palustris*, Isolated from Eutrophicated Ponds." *Biotechnology Letters* 26(10): 819–22. <http://link.springer.com/10.1023/B:BILE.0000025884.50198.67>.
- Koku, H, and U Eroglu. 2002. "Aspects of the Metabolism of Hydrogen Production by *Rhodobacter Sphaeroides*." *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11–12): 1315–29. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319902001271>.
- Kourmentza, Constantina et al. 2017. "Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production." *Bioengineering* 4(2): 55.
- Kumar, Gopalakrishnan et al. 2019. "A Review on the Conversion of Volatile Fatty Acids to Polyhydroxyalkanoates Using Dark Fermentative Effluents from Hydrogen Production." *Bioresource Technology* 287: 121427. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419306571>.
- Kumar, Manish et al. 2020. "Bacterial Polyhydroxyalkanoates: Opportunities, Challenges, and Prospects." *Journal of Cleaner Production* 263: 121500. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095965262031547X>.
- Lee. 2010. "Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates." In , 17–37. http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-03287-5_2.
- Lee, and Ho Nam Chang. 1995. "Stimulatory Effects of Amino Acids and Oleic Acid on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesis by Recombinant *Escherichia Coli*." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(2): 177–80.
- Lee, Eunyoung Jeon, Hyun Shik Yun, and Jinwon Lee. 2011. "Improvement of Fatty Acid Biosynthesis by Engineered Recombinant *Escherichia Coli*." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(4): 706–13. <http://link.springer.com/10.1007/s12257-011-0034-6>.
- Liu et al. 2021. "Biopolymer Poly-Hydroxyalkanoates (PHA) Production from Apple

- Industrial Waste Residues: A Review.” *Chemosphere* 284: 131427.
- Liu, Qian, Ge Luo, Xin Rong Zhou, and Guo-Qiang Chen. 2011. “Biosynthesis of Poly(3-Hydroxydecanoate) and 3-Hydroxydodecanoate Dominating Polyhydroxyalkanoates by β -Oxidation Pathway Inhibited *Pseudomonas Putida*.” *Metabolic Engineering* 13(1): 11–17. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717610000893>.
- Lorrungruang, Chortip, Jeerapa Marthong, Ken Sasaki, and Napavarn Noparatnaraporn. 2006. “Selection of Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter Sphaeroides* 14F for Polyhydroxyalkanoate Production with Two-Stage Aerobic Dark Cultivation.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(2): 128–31. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172306706405>.
- Lu, Haifeng et al. 2019. “Bio-Conversion of Photosynthetic Bacteria from Non-Toxic Wastewater to Realize Wastewater Treatment and Bioresource Recovery: A Review.” *Bioresource Technology* 278: 383–99. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852419300902>.
- Luongo, Vincenzo et al. 2017. “Photofermentative Production of Hydrogen and Poly- β -Hydroxybutyrate from Dark Fermentation Products.” *Bioresource Technology* 228: 171–75. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416317576>.
- Lusk, J E, R J P Williams, and E P Kennedy. 1968. “Magnesium and the Growth of *Escherichia Coli*.” *Journal of Biological Chemistry* 243(10): 2618–24. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818934174>.
- Mannina, Giorgio et al. 2020. “Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Wastewater: A Review.” *Bioresource Technology* 297: 122478.
- Manoli, Maria-Tsampika et al. 2023. “Heterologous Constitutive Production of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas Putida* KT2440: The Involvement of IbpA Inclusion Body Protein.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11.
- Manoli, Maria-Tsampika, Juan Nogales, and Auxiliadora Prieto. 2022. “Synthetic Control of Metabolic States in *Pseudomonas Putida* by Tuning Polyhydroxyalkanoate Cycle” ed. Arash Komeili. *mBio* 13(1).
- Martin, Laura K., Wei E. Huang, and Ian P. Thompson. 2023. “The Effect of Nutrient Limitation on Bacterial Wax Ester Production.” *Bioresource Technology Reports* 22: 101423. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589014X23000944>.
- Mata-De-la-Vega, Jaime Fabián, Shinichi Akizuki, Hiroyuki D. Sakai, and Germán Cuevas-Rodríguez. 2022. “Slaughterhouse Wastewater Treatment Using Purple Phototrophic Bacteria: A Comparison between Photoheterotrophic and Chemoheterotrophic Conditions.” *Biochemical Engineering Journal* 179: 108273.
- McKinlay, James B., and Caroline S. Harwood. 2011. “Calvin Cycle Flux, Pathway Constraints, and Substrate Oxidation State Together Determine the H₂ Biofuel Yield in Photoheterotrophic Bacteria” ed. Dianne K. Newman. *mBio* 2(2). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.00323-10>.
- Meereboer, Kjeld W., Manjusri Misra, and Amar K. Mohanty. 2020. “Review of Recent Advances in the Biodegradability of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Bioplastics and

- Their Composites.” *Green Chemistry* 22(17): 5519–58.
- Melnicki, Matthew R., Ela Eroglu, and Anastasios Melis. 2009. “Changes in Hydrogen Production and Polymer Accumulation upon Sulfur-Deprivation in Purple Photosynthetic Bacteria.” *International Journal of Hydrogen Energy* 34(15): 6157–70. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319909008520>.
- Meng, De-Chuan et al. 2014a. “Engineering the Diversity of Polyesters.” *Current Opinion in Biotechnology* 29: 24–33.
- Monroy, Isaac, and Germán Buitrón. 2020. “Production of Polyhydroxybutyrate by Pure and Mixed Cultures of Purple Non-Sulfur Bacteria: A Review.” *Journal of Biotechnology* 317: 39–47. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165620301000>.
- Montiel Corona, Virginia, Sylvie Le Borgne, Sergio Revah, and Marcia Morales. 2017. “Effect of Light-Dark Cycles on Hydrogen and Poly-β-Hydroxybutyrate Production by a Photoheterotrophic Culture and *Rhodobacter Capsulatus* Using a Dark Fermentation Effluent as Substrate.” *Bioresource Technology* 226: 238–46. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416316807>.
- Muhammadi, Shabina, Muhammad Afzal, and Shafqat Hameed. 2015. “Bacterial Polyhydroxyalkanoates-Eco-Friendly next Generation Plastic: Production, Biocompatibility, Biodegradation, Physical Properties and Applications.” *Green Chemistry Letters and Reviews* 8(3–4): 56–77.
- Mukhopadhyay, Mahuya, A. Patra, and A. K. Paul. 2005. “Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) by *Rhodospseudomonas Palustris* SP5212.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(5): 765–69. <http://link.springer.com/10.1007/s11274-004-5565-y>.
- Najafpour, G. D., and H. Younesi. 2007. “Bioconversion of Synthesis Gas to Hydrogen Using a Light-Dependent Photosynthetic Bacterium, *Rhodospirillum Rubrum*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(2): 275–84. <http://link.springer.com/10.1007/s11274-006-9225-2>.
- OCDE. 2022. *Perspectiva Global de Los Plásticos: Escenarios de Políticas Para 2060*.
- Ormerod, John G., Kari S. Ormerod, and Howard Gest. 1961. “Light-Dependent Utilization of Organic Compounds and Photoproduction of Molecular Bhydrogen by Photosynthetic Bacteria; Relationships with Nitrogen Metabolism.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 94: 449–63.
- Peoples, O P, and A J Sinskey. 1989. “Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) Biosynthesis in *Alcaligenes Eutrophus* H16.” *Journal of Biological Chemistry* 264(26): 15298–303. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819848251>.
- Pikaar, Ilje et al. 2018. “Carbon Emission Avoidance and Capture by Producing In-Reactor Microbial Biomass Based Food, Feed and Slow Release Fertilizer: Potentials and Limitations.” *Science of The Total Environment* 644: 1525–30. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718325749>.
- Portugal-Nunes, Diogo J., Sudhanshu S. Pawar, Gunnar Lidén, and Marie F. Gorwa-Grauslund. 2017. “Effect of Nitrogen Availability on the Poly-3-d-Hydroxybutyrate Accumulation by Engineered *Saccharomyces Cerevisiae*.” *AMB Express* 7(1): 35.

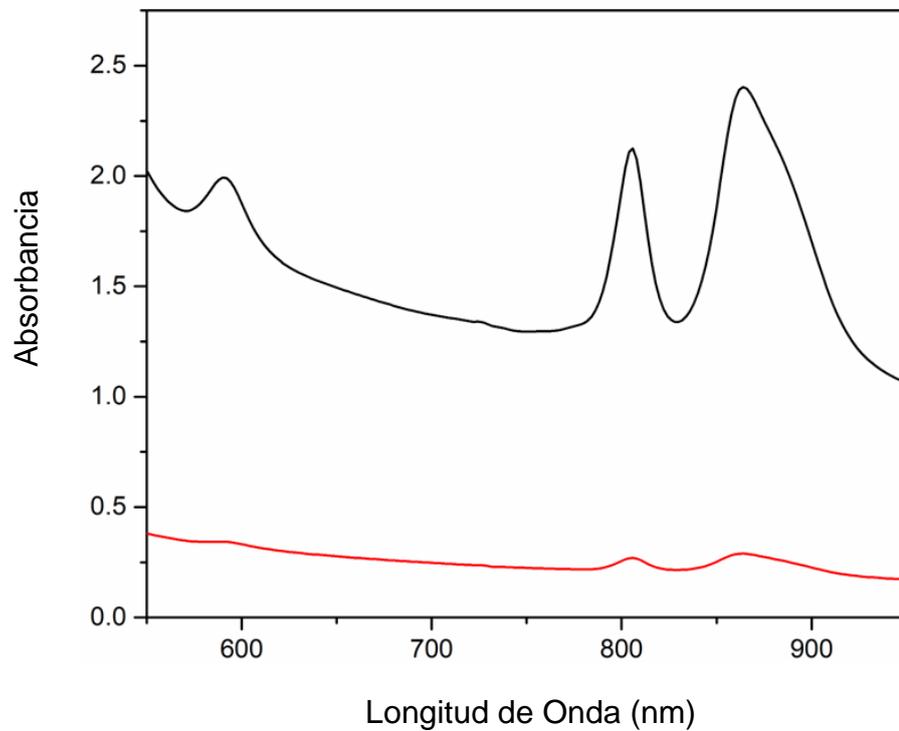
- Raberg, Matthias et al. 2011. “Versatile Metabolic Adaptations of *Ralstonia Eutropha* H16 to a Loss of PdhL, the E3 Component of the Pyruvate Dehydrogenase Complex.” *Applied and Environmental Microbiology* 77(7): 2254–63. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02360-10>.
- Ranaivoarisoa, Tahina Onina et al. 2019. “Towards Sustainable Bioplastic Production Using the Photoautotrophic Bacterium *Rhodopseudomonas Palustris* TIE-1.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46(9–10): 1401–17. <https://academic.oup.com/jimb/article/46/9-10/1401/6017439>.
- Raza, Zulfiqar Ali, Sharjeel Abid, and Ibrahim M. Banat. 2018. “Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, Production, Recent Developments and Applications.” *International Biodeterioration & Biodegradation* 126: 45–56.
- Ren, Qun, Nicolas Sierro, Bernard Witholt, and Birgit Kessler. 2000. “FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas Aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia Coli*.” *Journal of Bacteriology* 182(10): 2978–81. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.182.10.2978-2981.2000>.
- Rodero, María del Rosario et al. 2024. “Potential of Enriched Phototrophic Purple Bacteria for H₂ Bioconversion into Single Cell Protein.” *Science of The Total Environment* 908: 168471.
- Saejung, Chewapat, and Warangkanang Ampornpat. 2019. “Production and Nutritional Performance of Carotenoid-Producing Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas Faecalis* PA2 Grown in Domestic Wastewater Intended for Animal Feed Production.” *Waste and Biomass Valorization* 10(2): 299–310. <http://link.springer.com/10.1007/s12649-017-0070-3>.
- Sali, Safae, and Hamish R. Mackey. 2021. “The Application of Purple Non-Sulfur Bacteria for Microbial Mixed Culture Polyhydroxyalkanoates Production.” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20(4): 959–83.
- Sangkharah, K, and P Prasertsan. 2007. “Optimization of Polyhydroxybutyrate Production from a Wild Type and Two Mutant Strains of *Rhodobacter Sphaeroides* Using Statistical Method.” *Journal of Biotechnology* 132(3): 331–40. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165607012059>.
- Santin, Anna et al. 2024. “Autotrophic Poly-3-Hydroxybutyrate Accumulation in *Cupriavidus Necator* for Sustainable Bioplastic Production Triggered by Nutrient Starvation.” *Bioresource Technology* 406: 131068. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852424007727>.
- Sato, Shun, Hiromi Kanazawa, and Takeharu Tsuge. 2011. “Expression and Characterization of (R)-Specific Enoyl Coenzyme A Hydratases Making a Channeling Route to Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis in *Pseudomonas Putida*.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(3): 951–59. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3150-5>.
- Sepúlveda-Muñoz, Cristian A., Ignacio de Godos, Daniel Puyol, and Raúl Muñoz. 2020. “A Systematic Optimization of Piggery Wastewater Treatment with Purple Phototrophic Bacteria.” *Chemosphere* 253: 126621.
- Serafim, Luísa S., Paulo C. Lemos, Rui Oliveira, and Maria A.M. Reis. 2004.

- “Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Mixed Cultures Submitted to Aerobic Dynamic Feeding Conditions.” *Biotechnology and Bioengineering* 87(2): 145–60. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.20085>.
- Shahid, Salma, Sadia Razzaq, Robina Farooq, and Zill-i-Huma Nazli. 2021. “Polyhydroxyalkanoates: Next Generation Natural Biomolecules and a Solution for the World’s Future Economy.” *International Journal of Biological Macromolecules* 166: 297–321.
- Sharma, Vibhuti, Rutika Sehgal, and Reena Gupta. 2021. “Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications.” *Polymer* 212: 123161. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386120309861>.
- Slater, S, T Gallaher, and D Dennis. 1992. “Production of Poly-(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in a Recombinant *Escherichia Coli* Strain.” *Applied and Environmental Microbiology* 58(4): 1089–94. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.58.4.1089-1094.1992>.
- Somleva, Maria N., Oliver P. Peoples, and Kristi D. Snell. 2013. “PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops.” *Plant Biotechnology Journal* 11(2): 233–52. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pbi.12039>.
- Spanoghe, Janne, Pieter Vermeir, and Siegfried E. Vlaeminck. 2021. “Microbial Food from Light, Carbon Dioxide and Hydrogen Gas: Kinetic, Stoichiometric and Nutritional Potential of Three Purple Bacteria.” *Bioresource Technology* 337: 125364.
- Steinbüchel, A. 1995. “Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids.” *FEMS Microbiology Letters* 128(3): 219–28.
- Sun, Zhiyong, Juliana A. Ramsay, Martin Guay, and Bruce A. Ramsay. 2007. “Fermentation Process Development for the Production of Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoates.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(3): 475–85.
- Talan, Anita et al. 2021. “Food Waste Valorization: Energy Production Using Novel Integrated Systems.” *Bioresource Technology* 322: 124538.
- Tsang, Yiu Fai et al. 2019. “Production of Bioplastic through Food Waste Valorization.” *Environment International* 127: 625–44.
- Tu, Weiming, Dandan Zhang, and Hui Wang. 2019. “Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Fermented Thermal-Hydrolyzed Sludge by Mixed Microbial Cultures: The Link between Phosphorus and PHA Yields.” *Waste Management* 96: 149–57.
- Venkateswar Reddy, M., and S. Venkata Mohan. 2012. “Influence of Aerobic and Anoxic Microenvironments on Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production from Food Waste and Acidogenic Effluents Using Aerobic Consortia.” *Bioresource Technology* 103(1): 313–21. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852411013265>.
- Walker, Graeme M. 1994. “The Roles of Magnesium in Biotechnology.” *Critical Reviews in Biotechnology* 14(4): 311–54. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388559409063643>.
- Wang et al. 2021. “Seawater-Degradable Polymers—Fighting the Marine Plastic

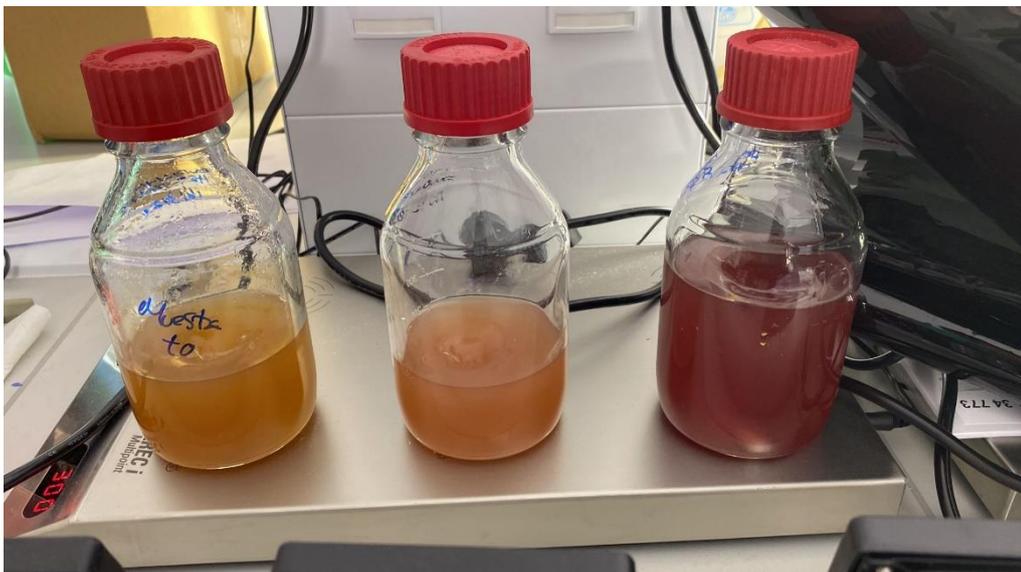
- Pollution.” *Advanced Science* 8(1).
- Wang, Jing et al. 2019. “Effects of Beneficial Microorganisms on Nutrient Removal and Excess Sludge Production in an Anaerobic-Anoxic/Oxic (A2O) Process for Municipal Wastewater Treatment.” *Bioresource Technology* 281: 90–98.
- Yadav, Bhoomika et al. 2021. “Polyhydroxyalkanoate Production From Feedstocks: Technological Advancements and Techno-Economic Analysis in Reference to Circular Bioeconomy.” In *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Elsevier, 477–513.
- Yadav, Bhoomika, Aishwarya Pandey, Lalit R. Kumar, and R.D. Tyagi. 2020. “Bioconversion of Waste (Water)/Residues to Bioplastics- A Circular Bioeconomy Approach.” *Bioresource Technology* 298: 122584.
- Zheng, Leo Zhong et al. 2005. “Molecular Cloning and Functional Analysis of (R)-3-Hydroxyacyl-Acyl Carrier Protein:Coenzyme A Transacylase from *Pseudomonas Mendocina* LZ.” *FEMS Microbiology Letters* 252(2): 299–307. <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1016/j.femsle.2005.09.006>.
- Zytner, Peter et al. 2023. “A Review on Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production through the Use of Lignocellulosic Biomass.” *RSC Sustainability* 1(9): 2120–34. <https://xlink.rsc.org/?DOI=D3SU00126A>.

ANEXOS

Espectros de absorción de las bacterias fototróficas purpuras PPB



Crecimiento y enriquecimiento de las PPB con alimentación heterotrófica y autotrófica



Tratamiento de las muestras para la cuantificación de DQO y PHA

