

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de la fermentación con glicerina residual de la producción de Biodiesel en la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por Keyla Vanessa Noriega Salguero para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala
2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de la fermentación con glicerina residual de la producción de Biodiesel en la Universidad del Valle de Guatemala

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por Keyla Vanessa Noriega Salguero para optar al grado académico de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Industrial

Guatemala
2023

Vo. Bo:

(f)  _____

MSc. Ing. Luis Núñez

Terna Examinadora

(f)  _____

MSc. Ing. Luis Núñez

(f) _____

MSc. Gamaliel Zambrano

(f)  _____

Ing. Carmen Ortiz

Fecha de aprobación: Guatemala, 2 de noviembre de 2023

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	17
II. OBJETIVOS	19
A. General.....	19
B. Específicos	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. MARCO TEÓRICO.....	22
A. Producción de Plásticos	22
a. Plásticos de Un Solo Uso.....	23
b. Impacto de los Plásticos en el Ambiente	23
c. Bioplásticos (PHA).....	24
B. Producción de PHA en Microorganismos.....	26
a. Estequiometría de la Reacción de Producción de PHA	26
b. Cinética del Crecimiento y Adaptación de Microorganismos	28
c. Ruta Metabólica de <i>Bacillus Megaterium</i>	30
d. Tinción con Negro de Sudán.....	33
e. Biorreactor	34
C. Producción de Biodiesel.....	36
a. Glicerina Residual del Proceso de Biodiesel	37
V. ANTECEDENTES	38
VI. METODOLOGÍA	41
A. Purificación de Glicerina	41
B. Preparación del Medio de Sales	42
C. Propagación de Cepas Bacterianas en Agar Nutritivo	43
D. Propagación de las Cepas en Caldo Nutritivo.....	45
E. Adaptación de las Cepas a 20 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo.....	46
F. Adaptación de las Cepas A 200 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo.....	48
G. Adaptación de las Cepas a 400 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo.....	50
H. Adaptación de las Cepas A 15 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio Formulado.....	52
I. Calibración del Potenciómetro del Reactor Sartorius	53
J. Preparación del Medio Formulado con Glicerina A 15 G de Glicerina/L de Medio Formulado para la Fermentación de 1 L en el Reactor Sartorius	54
K. Cuantificación de Glicerina	56

L.	Preparación Solución Hcl 1 Molar.....	57
M.	Preparación Solución Naoh 1 Molar.....	57
N.	Determinación del Peso Seco.....	58
O.	Preparación del Indicador Negro de Sudán.....	59
P.	Identificación del PHA Mediante Tinción con Negro de Sudán.....	60
Q.	Tinción GRAM	61
R.	Cuantificación de PHA	62
VII.	RESULTADOS.....	65
A.	Identificación de Bacilos con Tinción GRAM.....	65
B.	Adaptación de las Cepas Bacterianas al Consumo de Glicerina en Caldo Nutritivo	65
C.	Análisis Estadístico de las Adaptaciones en Caldo Nutritivo.	70
D.	Identificación de Bacilos con Tinción GRAM de las Cepas en el Medio Formulado de Sales	75
E.	Adaptación de las Cepas Bacterianas al Consumo de Glicerina en Medio de Sales.....	76
F.	Análisis Estadístico de las Adaptaciones en Medio de Sales.....	80
G.	Tinción con Negro de Sudán de las Adaptaciones en Medio de Sales	87
H.	Fermentaciones de 1L en el Reactor Sartorius a Diferentes Concentraciones de Glicerina de Biodiesel	89
I.	Modelo Cinético del Crecimiento de <i>B. Megaterium</i> ATCC 14581.....	97
J.	Tinción con Negro de Sudán Corridas 1 L.....	101
K.	Espectro IR del PHA Extraído de <i>B. Megaterium</i> ATCC 14581.....	103
L.	Balance de Masa de la Reacción.....	109
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	113
IX.	CONCLUSIONES	130
X.	RECOMENDACIONES	131
XI.	REFERENCIAS.....	132
XII.	ANEXOS	139
A.	Datos Originales de la Experimentación.....	139
B.	Datos Calculados	147
C.	Datos de equipos y reactivos.....	165
a.	Datos de Reactivos.....	165
b.	Datos de equipos	170
D.	Cálculos de Muestra.....	174

a.	Cálculos a partir de los datos experimentales por peso seco y cuantificación de los subproductos del HPLC:	174
c.	Cálculos a partir de la estequiometría de la reacción de producción de PHA.	177
d.	Cálculos estadísticos de los valores obtenidos.....	179
E.	Fotografías	181

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos específicos de crecimiento de <i>B. megaterium</i> con glicerina y glucosa como fuente principal de carbono.....	40
Tabla 2. Composición del medio de sales.....	42
Tabla 3. Rendimientos promedio del crecimiento de la biomasa respecto al consumo de la glicerina en un medio de caldo nutritivo.	69
Tabla 4. Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo y para cada una de las concentraciones de glicerina.	70
Tabla 5. Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.	70
Tabla 6. Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.	70
Tabla 7. Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.	71
Tabla 8. Valor P de la comparación de medias con igual o diferente varianza del aumento de biomasa para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.....	71
Tabla 9. Valor P de la comparación de medias con igual o diferente varianza de los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.....	72
Tabla 10. Rendimientos promedio del crecimiento de la biomasa respecto al consumo de la glicerina en un medio de sales.	80
Tabla 11. Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo.	80
Tabla 12. Valor P de la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.	81

Tabla 13. Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa, consumo de glicerina y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las condiciones carbono nitrógeno evaluadas en el medio de sales (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L).	81
Tabla 14. Valor P de la comparación de medias del aumento de biomasa, consumo de glicerina y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las condiciones carbono nitrógeno evaluadas en el medio de sales (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L) con una significancia de 0.05 y dos colas.	82
Tabla 15. Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 con un medio de sales con 15 g/L.....	89
Tabla 16. Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de <i>B. megaterium</i> con un medio de sales con 20 g/L.....	91
Tabla 17. Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 con un medio de sales con 30 g/L.....	94
Tabla 18. Rendimientos específicos de las tres fermentaciones de 1 L con diferentes concentraciones de glicerina.	96
Tabla 19. PHA producido durante cada día de la fermentación de 1 L con diferentes concentraciones de glicerina obtenido a través del rendimiento $Y_{p/x}$ final.....	97
Tabla 20. Constantes y valores utilizados para la elaboración del modelo cinético para cada una de las concentraciones de glicerina de las fermentaciones de 1 L con <i>B. megaterium</i> ATCC 14581.....	98
Tabla 21. Valores obtenidos del modelo cinético elaborado en Berkeley de los parámetros cinéticos para cada una de las concentraciones de glicerina de las fermentaciones de 1 L con <i>B. megaterium</i> ATCC 14581.	100
Tabla 22. Concentración de ácido acético, ácido láctico, metanol y etanol presente en la glicerina cruda proveniente del proceso de biodiesel determinada por HPLC.	140
Tabla 23. Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.....	140
Tabla 24. Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.....	141
Tabla 25. Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.....	141
Tabla 26. Peso de las cepas bacterianas en la adaptación en el medio de sales formulado 15 g/L.....	142
Tabla 27. Peso de <i>B. megaterium</i> en la adaptación en el medio de sales formulado 20 g/L.....	142
Tabla 28. Peso de <i>B. megaterium</i> en la adaptación en el medio de sales formulado 30 g/L.....	142
Tabla 29. Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina de biodiesel.	143
Tabla 30. Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina de biodiesel.	143

Tabla 31. Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina de biodiesel.	143
Tabla 32. Concentración de glicerina en la adaptación de <i>B. megaterium</i> al medio de sales con 15 g/L de glicerina de biodiesel.	144
Tabla 33. Concentración de glicerina en la adaptación de <i>B. megaterium</i> al medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina de biodiesel.	144
Tabla 34. Concentración de glicerina en la adaptación de <i>B. megaterium</i> al medio de caldo nutritivo con 30 g/L de glicerina de biodiesel.	145
Tabla 35. Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 15 g/L de glicerina.	145
Tabla 36. Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 20 g/L de glicerina.	146
Tabla 37. Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 30 g/L de glicerina.	147
Tabla 38. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.	148
Tabla 39. Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.	149
Tabla 40. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.	149
Tabla 41. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.	150
Tabla 42. Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.	150
Tabla 43. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.	151
Tabla 44. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.	151
Tabla 45. Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.	152

Tabla 46. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.	153
Tabla 47. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación en el medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	153
Tabla 48. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del consumo de glicerina en la adaptación de las cepas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	153
Tabla 49. Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 15 g/L con glicerina de biodiesel.	154
Tabla 50. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	154
Tabla 51. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de <i>B. megaterium</i> con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	155
Tabla 52. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del consumo de glicerina del crecimiento de <i>B. megaterium</i> conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	155
Tabla 53. Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de <i>B. megaterium</i> conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.	156
Tabla 54. Rendimientos específicos de crecimiento de <i>B. megaterium</i> conforme el consumo de sustrato en la adaptación en medio de sales con 20 g/L con glicerina de biodiesel.	156
Tabla 55. Rendimientos específicos de crecimiento de <i>B. megaterium</i> conforme el consumo de sustrato en la adaptación en medio de sales con 30 g/L con glicerina de biodiesel.	157
Tabla 56. Balance de masa de la fermentación de <i>B. megaterium</i> con 15 g/L de glicerina.	157
Tabla 57. Balance de masa de la fermentación de <i>B. megaterium</i> con 20 g/L de glicerina.	158
Tabla 58. Balance de masa de la fermentación de <i>B. megaterium</i> con 30 g/L de glicerina.	159
Tabla 59. Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de <i>B. megaterium</i> conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 15 g/L.	160
Tabla 60. Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de <i>B. megaterium</i> conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 15 g/L.	160
Tabla 61. Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de <i>B. megaterium</i> y producción de PHA en la fermentación de 15 g/L.	160

Tabla 62. Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de <i>B. megaterium</i> conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 20 g/L.	161
Tabla 63. Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de <i>B. megaterium</i> conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 20 g/L.	162
Tabla 64. Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de <i>B. megaterium</i> y producción de PHA en la fermentación de 20 g/L.	162
Tabla 65. Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de <i>B. megaterium</i> conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 30 g/L.	162
Tabla 66. Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de <i>B. megaterium</i> conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 30 g/L.	163
Tabla 67. Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de <i>B. megaterium</i> y producción de PHA en la fermentación de 30 g/L.	164
Tabla 68. Concentración de PHA durante la fermentación de 15 g/L de glicerina de biodiesel.	164
Tabla 69. Concentración de PHA durante la fermentación de 20 g/L de glicerina de biodiesel.	164
Tabla 70. Concentración de PHA durante la fermentación de 30 g/L de glicerina de biodiesel.	165
Tabla 71. Datos de sulfato de zinc heptahidratado	165
Tabla 72. Datos de Sulfato de amonio	166
Tabla 73. Datos de Fosfato monobásico	166
Tabla 74. Datos de Fosfato de disódico	166
Tabla 75. Datos de Cloruro de calcio dihidratado.....	166
Tabla 76. Datos de Sulfato de magnesio heptahidratado	167
Tabla 77. Datos de Ácido bórico	167
Tabla 78. Datos de Ácido clorhídrico	167
Tabla 79. Datos Hidróxido de sodio	167
Tabla 80. Datos de Ácido bórico	167
Tabla 81. Datos de Molibdato de sodio dihidratado	168
Tabla 82. Datos de Xyleno.....	168
Tabla 83. Datos de negro de Sudán B.....	168
Tabla 84. Datos de Hipoclorito de sodio.....	168
Tabla 85. Datos de Cloroformo	168
Tabla 86. Datos de <i>B. megaterium</i>	169
Tabla 87. Datos de <i>B. subtilis</i>	169
Tabla 88. Datos de <i>B. cereus</i>	169
Tabla 89. Datos del caldo nutritivo.....	169

Tabla 90. Agar nutritivo.....	170
Tabla 91. Datos de placa de centrifugadora de 1L.....	170
Tabla 92. Datos de placa de centrifugadora de 400 mL.....	170
Tabla 93. Datos de placa de centrifugadora de 90 mL.....	171
Tabla 94. Datos de placa de centrifugadora de 48 mL.....	171
Tabla 95. Datos de placa del Autoclave.....	171
Tabla 96. Datos de placa de la Incubadora orbital.....	172
Tabla 97. Datos de placa del horno secador.....	172
Tabla 98. Datos de placa de la balanza analítica.....	172
Tabla 99. Datos de placa del reactor BIOSTAT Sartorius.....	172
Tabla 100. Datos de placa del microscopio	173
Tabla 101. Datos de placa de la estufa con agitación magnética	173

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del Polihidroxicanoato (PHA).....	25
Figura 2. Representación del metabolismo de los microorganismos	27
Figura 3. Curva típica del crecimiento bacteriano	29
Figura 4. Ruta metabólica de intracelular para la producción de PHA a partir de Glicerina.....	31
Figura 5. Metabolismo del glicerol en la vía glucolítica para producción de piruvato.....	32
Figura 6. Presencia de gránulos de PHA en <i>C. taiwanensis</i> y <i>P. oleovorans</i> ATCC 29347 observados con un objetivo de inmersión en aceite de 100X.....	33
Figura 7. Reactor STR	35
Figura 8. Estructura de la molécula de glicerina.....	37
Figura 9. Variación de PHB y biomasa producido en función del tiempo.....	38
Figura 10. Cinética de crecimiento de <i>B megaterium</i> según el consumo de sustrato	40
Figura 11. Diagrama de la metodología experimental utilizada para la producción de PHA.....	64
Figura 12. Tinción Gram de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de caldo nutritivo	65
Figura 13. Adaptación de las cepas bacterianas a 20 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	65
Figura 14. Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 20 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	66
Figura 15. Adaptación de las cepas bacterianas a 200 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	67
Figura 16. Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 200 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	68
Figura 17. Adaptación de las cepas bacterianas a 400 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	68
Figura 18. Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 400 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo	69
Figura 19. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L en caldo nutritivo.	73
Figura 20. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 200 g/L en caldo nutritivo.	73
Figura 21. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 400 g/L en caldo nutritivo.	74
Figura 22. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L en caldo nutritivo	74
Figura 23. Tinción Gram de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina en 125 mL.	75

Figura 24. Adaptación de las cepas bacterianas a 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.	76
Figura 25. Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales	77
Figura 26. Adaptación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a 20 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	78
Figura 27. Consumo de glicerina de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	78
Figura 28. Adaptación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	79
Figura 29. Adaptación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	80
Figura 30. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	82
Figura 31. Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales utilizada en el análisis de diferencia de medias.	83
Figura 32. Comparación del peso final obtenido de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en la adaptación de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	84
Figura 33. Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L en caldo nutritivo.....	84
Figura 34. Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 200 g/L en caldo nutritivo.....	85
Figura 35. Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 400 g/L en caldo nutritivo.....	85
Figura 36. Comparación de la glicerina final obtenida por <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en la adaptación de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.....	86
Figura 37. Tinción con negro de Sudán de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina en 125 mL.....	87
Figura 38. Tinción con negro de Sudán de la adaptación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a la corrida con 20 g/L de glicerina en triplicado	88
Figura 39. Tinción con negro de Sudán de la adaptación de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 a la corrida con 30 g/L de glicerina en triplicado	88
Figura 40. Consumo de glicerina conforme el crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de sales con glicerina a 15 g/L.....	90

Figura 41. Logaritmo natural del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 15 g/L.	90
Figura 42. Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol en la fermentación con 15 g/L de glicerina	91
Figura 43. Consumo de glicerina conforme el crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de glicerina de 20 g/L.....	92
Figura 44. Logaritmo natural del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 20 g/L.	93
Figura 45. Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol durante la fermentación de 20 g/L de glicerina	93
Figura 46. Consumo de glicerina conforme el crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de glicerina de 30 g/L.....	95
Figura 47. Logaritmo natural del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 30 g/L.	95
Figura 48. Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol durante la fermentación de 30 g/L.....	96
Figura 49. Modelo cinético del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en el medio formulado con 15 g/L de glicerina de biodiesel	99
Figura 50. Modelo cinético del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en el medio formulado con 20 g/L de glicerina de biodiesel	99
Figura 51. Modelo cinético del crecimiento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 en el medio formulado con 30 g/L de glicerina de biodiesel	100
Figura 52. Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 con 15 g/L de glicerina.	101
Figura 53. Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 con 20g/L de glicerina	102
Figura 54. Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581 con 30 g/L de glicerina	102
Figura 55. Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 15 g/L.....	103
Figura 56. Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 20 g/L.....	104
Figura 57. Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 30 g/L.....	104

Figura 58. Sobreposición de PHA en Espectro IR del producto obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 15 g/L.	105
Figura 59. Sobreposición de PHA en Espectro IR del producto obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 20 g/L.	106
Figura 60. Sobreposición de PHA en espectro IR del producto obtenido de la fermentación de <i>B megaterium</i> en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 30 g/L.	106
Figura 61. Espectro IR de una muestra de glicerina con 98% de pureza.	107
Figura 62. Espectro IR de la glicerina procedente del proceso de producción de biodiesel.....	108
Figura 63. Sobreposición del espectro IR de la glicerina residual del biodiesel con la glicerina de 98% de concentración	108
Figura 64. Balance molar de la reacción estequiométrica aeróbica con <i>B. megaterium</i> ATCC 14581	110
Figura 65. Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 con 15 g/L de glicerina	110
Figura 66. Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 con 20 g/L de glicerina	111
Figura 67. Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de <i>B. megaterium</i> ATCC 14581 con 30 g/L de glicerina	111
Figura 69. Curva de calibración de glicerina	139
Figura 70. Crecimiento de <i>B. megaterium</i> y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 15 g/L.	147
Figura 71. Crecimiento de <i>B. megaterium</i> y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 20 g/L.	148
Figura 72. Crecimiento de <i>B. megaterium</i> y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 30 g/L.	148

PREFACIO

El desarrollo de un proceso de experimentación siempre contiene una serie de pasos y seguimientos que son parte del sistema que se implementa. Al hacer las pruebas, se tiene en cuenta las observaciones y las puntualizaciones que requiere este proceso. Sin embargo, existe el punto clave en el cual se define con bastante certeza lo que se ha querido encontrar. En este punto es donde la persona que investiga tiene la facultad de disfrutar del éxito de su tiempo, esfuerzo y recursos invertidos en dicho proceso.

Es aquí donde confirmo mi pasión por experimentar, llevando minuciosamente el seguimiento a mi proyecto, el cual fue arriesgado, pero con resultados satisfactorios, pude descubrir la funcionalidad de distintas bacterias que pueden ser utilizadas para el desarrollo de nuevas creaciones, las cuales pueden ser ideales para tener un mejor avance de los procesos químicos y biológicos a nivel micro y claro que también en lo macro, respecto al tratamiento de materiales de desecho.

En este trabajo que he creado con tanto optimismo y esfuerzo constante, demuestro la importancia de conocer y seguir los procesos químicos, la trascendencia de una fundamentación teórica para aplicarla en la vida experimental, con todo ello conseguir los resultados que por hoy he obtenido, sobre la evaluación con tres tipos de cepas diferentes, así observar el consumo de glicerina en diversas muestras a variadas concentraciones, siempre para el aprovechamiento de distintos materiales de desecho.

Durante cinco meses, trabajé diariamente en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química, de mi alma mater Universidad del Valle de Guatemala, con el apoyo e instrucción de grandes profesionales como xxx(espacio para los docentes o personal que contribuyó)xxx que con su orientación y acompañamiento, orientaron mi trabajo, contribuyendo significativamente a mi crecimiento profesional, de esta manera pude validar las distintas adaptaciones y fermentaciones, aplicando las variables que garantizaran el control objetivo de los parámetros.

Es por todo esto y más, que me llena de orgullo presentar un estudio con resultados positivos, que me permitieron concluir y aportar al desarrollo de mi Facultad de Ingeniería Química, así enriquecer el crecimiento científico y creativo de otros estudiantes, que como yo, buscamos encontrar nuevas respuestas a lo que ya existe.

RESUMEN

En la industria de la producción de plásticos se han realizado investigaciones que permitan determinar si es factible utilizar sustitutos de la materia prima convencional para generar menor impacto ambiental. En consideración a este último factor, se propuso trabajar en la búsqueda de bioplásticos que tengan las propiedades fisicoquímicas similares a las que se observan en los plásticos derivados del petróleo y, a la vez, se degrade en menos tiempo. Es por ello que los Polihidroxicanoatos (PHA) han adquirido popularidad al ser un biopolímero que se puede generar a partir de bacterias, sin embargo, representa un reto por el costo elevado, ante fuentes de alta concentración de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno. De esta manera se ha realizado este proceso industrial, con el objetivo de producir PHA, a través de un residuo, siendo este, glicerina del proceso de biodiesel, utilizando tres cepas: *B. megaterium*, *B. subtilis* y *B. cereus*; luego del ensayo se determinó que la mejor cepa era la *B. megaterium* por el notable crecimiento que obtuvo en comparación de las otras dos, a pesar de este hallazgo, era necesario escalar a un ensayo con mayor cantidad de contenido, por ello se trabajó con 1L, así evaluar la cantidad de glicerina que era óptima para obtener el mismo resultado, por ello se trabajó con concentraciones de 15, 20 y 30 g/L, estableciendo que la de 20 fue la mejor. Adicionalmente, se realizaron ensayos para reforzar que efectivamente era PHA, a partir de la Tinción con Negro de Sudán, obteniendo un resultado positivo, pues cambió de color a negro. La principal recomendación es dar seguimiento con volúmenes superiores a 1L, para valorar si es factible su implementación o se descarta por el costo que representa la producción.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos (PHA), glicerina residual, fermentación, *B. megaterium*, biorreactor.

ABSTRACT

In the plastics production industry, research has been conducted to determine whether it is feasible to use substitutes for conventional raw materials to generate a lower environmental impact. Considering this last factor, work was proposed on the search for bioplastics that have physicochemical properties similar to those observed in petroleum-derived plastics and, at the same time, degrade more quickly. This is why polyhydroxyalkanoates (PHAs) have gained popularity as a biopolymer that can be generated from bacteria; however, they represent a challenge due to their high cost, compared to sources with high carbon concentrations and low nitrogen concentrations. In this way, this industrial process has been carried out, with the objective of producing PHA, through a residue, this being, glycerin from the biodiesel process, using three strains: *B. megaterium*, *B. subtilis* and *B. cereus*; after the test it was determined that the best strain was *B. megaterium* due to the remarkable growth it obtained compared to the other two, despite this finding, it was necessary to scale up to a test with a greater amount of content, therefore we worked with 1L, in order to evaluate the amount of glycerin that was optimal to obtain the same result, therefore we worked with concentrations of 15, 20 and 30 g / L, establishing that 20 was the best. Additionally, tests were conducted to confirm that it was indeed PHA, using Sudan Black staining, and the result was positive, as the color changed to black. The main recommendation is to continue testing with volumes greater than 1 L to assess whether its implementation is feasible or whether it can be ruled out due to the production cost.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates (PHA), residual glycerin, fermentation, *B. megaterium*, bioreactor.

I. INTRODUCCIÓN

Se estima a nivel mundial que el 99% de los plásticos provienen del petróleo, del cual únicamente el 9% es reciclado, 12% es incinerado y el 79% es llevado a vertederos. Por lo que, a pesar que los plásticos sean económicos, fáciles de producir y utilizados para la mayoría de empaques y productos, la poca responsabilidad respecto a su uso genera una gran cantidad de contaminación, puesto que no pueden ser degradados por microorganismos y deben de ser escindidos. En Guatemala no existen legislaciones que controlen los desechos sólidos inorgánicos, de los cuales el 66% son plásticos, los cuales terminan en botaderos municipales y el resto son descartados en ríos, lagos, barrancos y en las calles, contaminando una diversidad de ecosistemas que después son convertidos en micro plásticos y permanecen en la naturaleza al no poder ser degradados (Geyer et al. 2017; Méndez, 2017).

Según el programa de las Naciones Unidas en 2018 para el Medio Ambiente, más de la mitad de los plásticos que se producen son de un solo uso y son los que más se encuentran presentes en el medio ambiente, como las bolsas de plástico, colillas de cigarro, envoltorios de comida, pajillas y espumas, entre otros. Por lo que se han comenzado a investigar bioplásticos que sean biodegradables en el ambiente y puedan degradarse en un menor tiempo, puesto que los plásticos derivados del petróleo tardan más de 100 años en degradarse y por la cantidad de residuos que han sido producidos es imposible que puedan ser degradados de forma natural en el medio ambiente (ONU, 2018).

Uno de los bioplásticos más conocidos es el polihidroxialcanoato (PHA), que es un polímero que se puede sintetizar a partir de la fermentación de microorganismos bacterianos y es considerado como una alternativa a los plásticos derivados del petróleo debido a que sus características fisicoquímicas son muy similares. Los microorganismos acumulan PHA cuando son sometidos a condiciones limitadas de nutrientes como fósforo, nitrógeno, carbono y sus combinaciones. El carbono es destinado para generar reservas de PHA con el fin de sobrevivir, por lo que aumentar la fuente de carbono es primordial para maximizar la producción de PHA en los microorganismos, mientras que los otros nutrientes son limitados respecto al carbono (Fernandez, Concha, Sánchez, 2016). De esta manera, el PHA podría ser un sustituto de los artículos de plástico de un solo uso, siendo importante estudiar las condiciones que favorecen la producción de PHA en los microorganismos.

Se ha establecido, además, que los microorganismos capaces de degradar los polihidroxialcanoatos han alcanzado hasta el 90% de degradación después de 5 días del cultivo, lo que hace necesario investigar las condiciones que maximizan la producción de este bioplástico y así establecer un proceso de producción

y degradación sostenible de PHA. Sin embargo, la materia prima para la producción de PHA puede alcanzar hasta el 45% del costo total, por lo que también es importante investigar diversos tipos de fuentes de carbono que los microorganismos sean capaces de convertir a PHA (González et al. 2013).

Una posible fuente de carbono es la glicerina residual del proceso de biodiesel, la cual presenta una gran cantidad de impurezas como agua, metanol, sales inorgánicas, ácidos grasos, jabones y metil ésteres. Por consecuencia del creciente mercado de biodiesel ha aumentado la oferta de la glicerina cruda, que representa alrededor del 10% del aceite utilizado en la producción de biodiesel; por lo que al aumentar la oferta de la glicerina se ha comenzado la búsqueda en formas de utilizarla sin que represente un desecho (Hernández et al. 2015). Por esta razón para este estudio se utilizó la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel como fuente de carbono, con el fin de establecer un proceso de producción sostenible y se evaluó la relación carbono/nitrógeno que favorece en el crecimiento de la *Bacillus megaterium* ATCC 14581 para determinar las condiciones que maximizan el rendimiento y producción de PHA.

II. OBJETIVOS

A. General

- Evaluar la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de la fermentación con glicerina obtenida del proceso de producción de biodiesel para determinar las condiciones que permitan obtener los mejores rendimientos.

B. Específicos

- Propagar y adaptar los microorganismos definidos para el estudio y la evaluación del consumo de glicerina como fuente de carbono.
- Evaluar la relación carbono/nitrógeno con el fin de determinar su influencia en el crecimiento de la cepa bacteriana e identificar la relación que favorece el rendimiento.
- Extraer y cuantificar la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) con cada relación carbono/nitrógeno evaluado para determinar las que tengan mayor rendimiento del producto.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los plásticos que se derivan del petróleo constituyen el 99% de producción de todos los polímeros, esto por la facilidad del proceso de producción, el bajo costo y las propiedades fisicoquímicas del plástico. Pese a ello, existe fuerte impacto ambiental, lo que conlleva la producción de plásticos tradicionales, mismos que son perjudiciales para el ecosistema, al ser contaminados por plásticos difíciles de reciclar, que solo pueden ser escindidos y se acumulan en cualquier ambiente; aun con todo esto, siguen siendo producidos en millones de toneladas al año y, al utilizar gran cantidad de aditivos, continúan afectando la salud de todos los seres vivos, por la gran cantidad de residuos tóxicos cancerígenos que implican. (Heinrich Böll, 2019 & González et al. 2013).

Además, el exagerado incremento de producción de plásticos de un solo uso, los niveles altos de contaminación y, que al ser derivados del petróleo, conllevan en promedio 100 años para degradarse en el ambiente; se busca polímeros más biodegradables y de fuentes renovables. (Heinrich Böll, 2019 & González et al. 2013).

Considerando la importancia de disminuir la producción de plásticos y, al mismo tiempo de producir sosteniblemente plásticos de un solo uso, se ha considerado el polihidroxialcanoato, el cual es un bioplástico sustituto del plástico derivado del petróleo, siendo este un poliéster alifático que posee características fisicoquímicas muy similares al plástico y, además, que se puede producir mediante la fermentación de una fuente de carbono por parte de un microorganismo.

Para la producción de polihidroxialcanoatos a partir de microorganismos se tomara la glicerina remanente del proceso de biodiesel, mediante un proceso de fermentación, las bacterias pueden utilizarla como fuente de carbono, debido a que cuenta con una cadena carbonada de tres átomos de carbono y tres grupos hidroxilos y, así acumularla como PHA. La glicerina residual del proceso de producción de biodiesel contiene sal, ácidos grasos libres y metanol, las cuales son impurezas que podrían llegar a contaminar el suelo y el medio ambiente; por ello la glicerina cruda debe refinarse.

Sin embargo, el costo del tratamiento de la glicerina es excesivo, el cual asciende a \$50.85 por kiloGramo. Por lo que en muchos casos es necesario incinerarlo, como en Brasil lo cual tiene un costo de 15\$ por tonelada (Attarbachí et al. 2023). Además, en el mercado la glicerina tiene mucha oferta y los precios del glicerol puro son alrededor de 1% por kiloGramo, por lo que no es factible realizar el proceso de refinación y convierte imperativo investigar alternativas para su aprovechamiento (Dhabhai et al. 2016).

Tomando en cuenta que la glicerina del proceso de biodiesel es un desecho generado en la reacción de transesterificación, esta puede utilizarse como la materia prima principal de para la producción de PHA, con el propósito de aprovechar este desecho para que el proceso sea sostenible y económico (Chilakamarry et al. 2021).

Tomando en cuenta que la Universidad del Valle de Guatemala, se genera glicerina de la planta de producción de biodiesel, pero no se demuestra si puede ser utilizada para la producción de polihidroxialcanoatos; se crea el presente proyecto para evaluar la viabilidad de adaptar algunas cepas bacterianas disponibles para consumir la glicerina utilizables en la producción de PHA. Para este estudio se plantea el uso de las cepas bacterianas *B. megaterium* ATCC 14581, *B. subtilis* ATCC 6051 y *B. cereus* ATCC 14579, con ello validar la que tenga mejores rendimientos de adaptación y consumo de glicerina como principal fuente de carbono.

Finalmente, evaluar la cepa seleccionada a diferentes concentraciones de carbono: nitrógeno (15 g/L, 20g/L, 30g/L), así mediante su cuantificación evidenciar la presencia del PHA en las muestras.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Producción de Plásticos

Los plásticos son polímeros fabricados a partir de los hidrocarburos mediante una reacción de polimerización de las materias primas como el petróleo y el gas natural. El plástico surgió en 1862 como un sustituto del marfil y se fabricó mediante celulosa. En los siguientes años comenzaron a fabricarse el policloruro de vinilo, el polietileno y el polipropileno con el propósito de producir empaques de alimentos, de bebidas, contenedores y bolsas. En la década 1950 los plásticos ya habían adquirido gran popularidad por ser un producto innovador, limpio y moderno. En la actualidad el polietileno, el PVC y el polipropileno son los plásticos que más se utilizan a nivel mundial y se han ido perfeccionando a lo largo de los años (Böll H. y Break Free From Plastic, 2019).

Antes de los plásticos, los materiales se fabricaban para que tuvieran mayor cantidad de vida y no hubiera tanto desecho. Se utilizaban empaques reutilizables o no se utilizaban. Sin embargo, después de la Segunda Guerra Mundial los plásticos se comenzaron a utilizar a lo largo de la vida cotidiana y para 1960 los plásticos ya habían comenzado a generar una gran cantidad de basura en los vertederos, incineradores, etc. El objetivo del plástico era ser utilizado en productos duraderos, productos industriales y artículos cotidianos. Sin embargo, la poca responsabilidad de su uso conllevó a que se utilicen en artículos destinados para un solo uso y entre el período de 1950 a 2017 se fabricaron alrededor de 9.2 millones de toneladas de plástico (Böll H., 2019).

Según la Asociación Internacional de Productores de Plásticos (IAPC), en los últimos años la producción de plásticos ha aumentado significativamente puesto que, en 2014 aumentó de 311 millones a 368 millones de toneladas en 2019, lo cual representa un aumento de 18% en 5 años. Este aumento en la producción se debe a alta demanda respecto a su uso, puesto que tiene una gran cantidad de aplicaciones, como envases, electrónicos, textiles, construcciones, productos farmacéuticos, muebles, bolsas, empaques, etc. Así mismo, la producción de plásticos ha estado creciendo más rápido que la economía global, por su bajo costo de producción y que son altamente versátiles y se pueden utilizar para la gran mayoría de productos nuevos (Asociación Internacional de Productores de Plásticos [IAPC], 2019).

Los plásticos derivados del petróleo se fabrican a partir de hidrocarburos que se obtienen del petróleo. Para el proceso de producción de plásticos se debe de realizar una extracción de petróleo crudo de la tierra o el mar y posteriormente se debe refinar y transformar de fracciones a monómeros. Sin embargo, el proceso de extracción del petróleo tiene diversos impactos ambientales, puesto que existe el riesgo que

se produzcan derrames y explosiones, y llegar a contaminar ríos, lagos y océanos, causando daños a la fauna, así como provocar la degradación del suelo (PlasticsEurope, 2022).

a. Plásticos de Un Solo Uso

En la antigüedad las cosas se hacían con materiales que tenían mayor vida útil. Cosas que se podían reutilizar y que no se desechaban tan fácilmente. Puesto que se usaban otros tipos de materiales como vidrio, cerámica, vajillas, barro, etc. Gran cantidad de los empaques de los alimentos y bebidas se podían retornar, los alimentos no se vendían envueltos en plásticos, así como las frutas y verduras, y no se utilizaban pajillas. Sin embargo, ahora se envuelven los artículos en plásticos y celofán, se utilizan pajillas y una gran cantidad de polímeros.

Después de la segunda Guerra Mundial el plástico se convirtió en una corriente dominante. En esta época el plástico se hacía en piezas de alta durabilidad que se podían volver a utilizar. Pero, a finales de 1950 los fabricantes optaron por simplificar su cadena de suministros con el propósito de ahorrar dinero, con lo cual se comenzó a utilizar los plásticos de un solo uso.

Los plásticos de un solo uso son todos aquellos plásticos que son fabricados para utilizarse una sola vez, como botellas plásticas, envoltorios, pajillas, bolsas, etc., constituyen el 91% de los plásticos fabricados, la cantidad de plásticos producidos en estas seis décadas asciende a 8,300 millones de toneladas métricas. Sin embargo, debido a la alta demanda de estos plásticos, los fabricantes se encuentran renuentes a buscar alternativas menos dañinas o con un menor impacto en el ambiente (Carr, 2020). Lamentablemente la única forma de dejar de producir estos plásticos sería si el mundo dejara de consumirlos y comenzaran a ser más responsables con relación a los desechos. Pero, tomando en cuenta la dificultad de esta realidad, es necesario al menos buscar alternativas que sean menos dañinas para el ambiente.

b. Impacto de los Plásticos en el Ambiente

El plástico genera una gran cantidad de contaminación, no solo en su etapa final, sino que, por su proceso de producción, puesto que para la extracción del petróleo es necesario utilizar más de 170 sustancias cancerígenas, químicos, agua y el gasto de diésel de los equipos de extracción. Además, para la fabricación de plásticos a partir del petróleo se debe de llevar a cabo una reacción para la cual es necesario utilizar una gran cantidad de aditivos dañinos, no solo para la salud del ser humano, sino que para otros ecosistemas y organismos (Heinrich Böll, 2019).

Posterior a la contaminación provocada por la fabricación del plástico viene la contaminación producida por el desecho del plástico. Derivado de utilizar la mayoría de los productos plásticos, estos tienen poco usos y son desechados, generando una gran cantidad de residuos que tardan más de cientos de años en degradarse. Por lo que tienen un gran impacto en los diferentes ecosistemas. Por la gran cantidad de plásticos residuales, no es posible su degradación, esto porque se fabrican con una muy larga durabilidad, un alto peso molecular y baja reactividad. Todos estos factores contribuyen a la acumulación de residuos que provocan un problema ecológico, lo que ha llevado a que se implementen políticas de reciclaje y además que se busquen sustitutos del plástico, para evitar seguir produciendo más residuos e impactar en los ecosistemas (Gómez, 2016; Sánchez, 2020).

c. Bioplásticos (PHA)

La creciente conciencia sobre la contaminación generada por el uso de los plásticos ha comenzado el impulso de la búsqueda de plásticos biodegradables que no impacten negativamente el ambiente. Entre las alternativas para sustituir el uso de plásticos se encuentran los bioplásticos, que son aquellos polímeros fabricados en base a materias primas renovables. Según la Asociación Europea de Bioplásticos, los bioplásticos se clasifican como plásticos sintetizados a partir de fuentes renovables y polímeros biodegradables que cumplen con todos los criterios de las normas científicas reconocidas de biodegradabilidad y compostaje de plásticos según el estándar europeo (Delgado y Córdoba, 2015).

El anteproyecto de norma mexicana PROY-NMX-E-260CNCP-2013 Industria del Plástico Materiales Bioplásticos establece que los bioplásticos son aquellos cuya materia prima es de origen renovable y es o no biodegradable, o cuya materia prima es de origen petroquímico y es biodegradable. Actualmente el 65% de los bioplásticos se utilizan para la creación de productos que son de vida corta y envases y aunque se haya comenzado a utilizarlos en diferentes áreas como en la medicina, agricultura, electrónicos, etc. En el año 2010 se estimó que la producción de bioplásticos en el mercado era menor al 1%, por lo que los bioplásticos aún tienen mucho crecimiento en diferentes sectores y se espera que su producción e implementación siga aumentando hasta llegar a sustituir a los plásticos que se utilizan actualmente.

Existe una gran cantidad de bioplásticos y se clasifican a partir de los recursos renovables que son utilizados como materias primas para su producción, como el maíz, trigo, yuca, algodón, etc. Los bioplásticos pueden ser producidos por distintos organismos como las plantas y microorganismos bacterianos. Se ha determinado que los microorganismos pueden producir mayor cantidad de bioplásticos

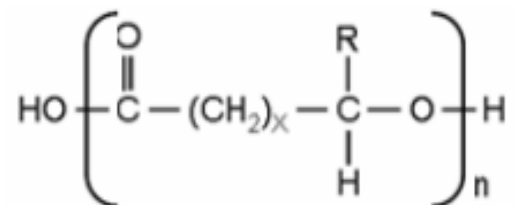
que las plantas, por lo que es más factible utilizar bacterias que plantas (Centro de Desarrollo Tecnológico LEIA, 2007).

Un bioplástico que se ha comenzado a investigar para ser producido e industrializado en lugar del plástico proveniente de los hidrocarburos es el Polihidroxialcanoato (PHA) y es un poliéster alifático que se puede sintetizar a partir de diversas especies bacterianas, tras ser sometidas en condiciones de nutrientes limitantes como el nitrógeno, oxígeno, fósforo y carbono. Las células comienzan a utilizar el carbono para sobrevivir y comienzan a acumular gránulos citoplasmáticos (Fernandez, Concha, Sánchez, 2016).

Los polihidroxialcanoatos se pueden producir mediante la fermentación de una fuente de carbono por parte de un microorganismo, debido a que al suministrar en exceso la fuente de carbono y si hay una limitante de otro nutriente que sea necesario para el crecimiento y el desarrollo del microorganismo, se comienza a acumular el carbono como una fuente de reserva de carbono y de energía, tal y como se observa en la figura 1. El bioplástico es acumulado en el citoplasma y se deposita como gránulos de PHA que pueden constituir el 90% del peso seco celular. La reacción que se lleva a cabo necesita a la enzima PHA sintasa para catalizar la adición estereoselectiva a partir del sustrato y finalmente la liberación del CoA (Centro de Desarrollo Tecnológico LEIA, 2007).

Figura 1.

Estructura del Polihidroxialcanoato (PHA).



Nota. Estructura química general del Polihidroxialcanoato Adaptado de Delgado y Córdoba

Los polihidroxialcanoatos son bioplásticos biocompatibles y biodegradables que han comenzado a ser un material de interés en la industria debido a que no son tóxicos, provienen de fuentes renovables, son materiales biodegradables en diferentes ambientes por su compostabilidad, debido a que sus características fisicoquímicas son similares a los polímeros que se utilizan actualmente. Actualmente las investigaciones se enfocan en la reducción de los costos de la producción de PHA, puesto que a pesar de las ventajas del PHA en comparación a los plásticos tradicionales, la producción de estos biopolímeros presenta un elevado

costo debido a que las fuentes de carbono son la parte fundamental de la producción. Por lo tanto, se están tomando medidas para lograr hacer este material más accesible y así mismo determinar los factores que optimizan la fermentación, purificación y extracción (Delgado y Córdoba, 2015).

B. Producción de PHA en Microorganismos

Actualmente se han identificado alrededor de 90 géneros de bacterias que son capaces de producir PHA, dentro de las cuales se ubican dos grandes grupos. En el primero se encuentran aquellas bacterias capaces de producir PHA y almacenarlo como fuente de energía al tener la limitante de algún nutriente en el medio, como fósforo, nitrógeno, magnesio u oxígeno; y en el segundo grupo se encuentran las bacterias que producen PHA y lo acumulan durante su fase de crecimiento (Esquivel et al. 2021).

Entre los microorganismos que generalmente se utilizan para la producción de PHA se encuentra el género *Bacillus* sp, entre las cuales *Bacillus megaterium* mostró más crecimiento alcanzando 0.21 g/L y una acumulación de PHB en medio peptona de 77% y *B. subtilis* con 78.96%, siendo este el mayor rendimiento. Así mismo se encontró que el rendimiento de acumulación de PHB en *Bacillus megaterium* con glicerina como fuente de carbono fue de 62.43% (Banacore, 2014).

Las especies del género *Bacillus* se consideran atractivas por su alta tasa de crecimiento, por lo que los ciclos de fermentación son más cortos, pueden aprovechar diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerina, peptona, almidón, etc, para obtener buenos resultados en la producción de PHB, además que no representan riesgos con su uso, puesto que son consideradas GRAS, es decir que son seguras (Banacore, 2014).

a. Estequiometría de la Reacción de Producción de PHA

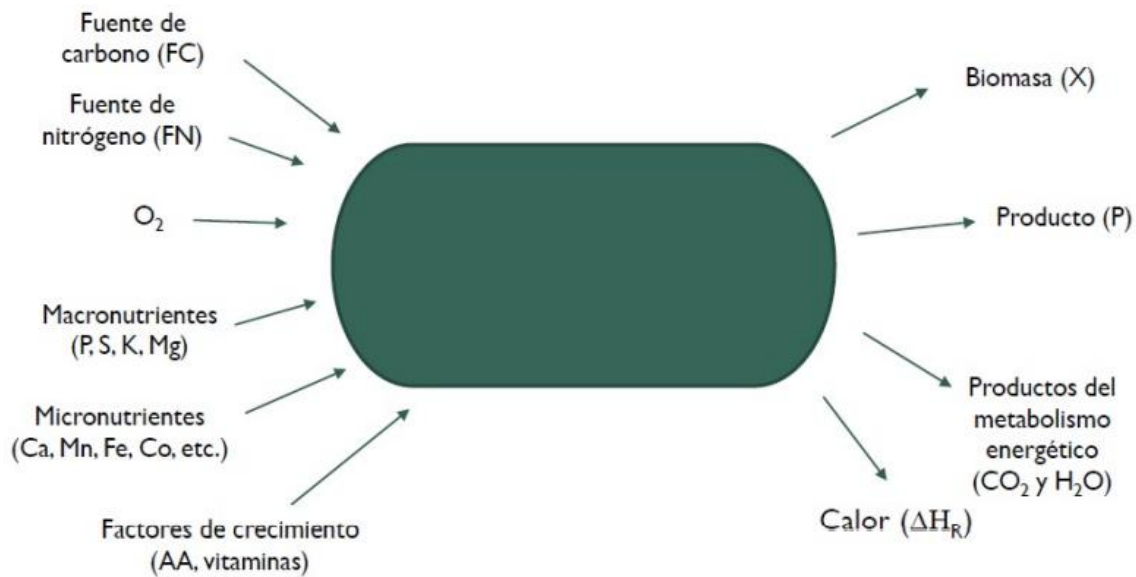
La reacción de producción de PHA con *Bacillus megaterium* es una reacción aeróbica, lo que quiere decir que el aceptor final de electrones es el oxígeno. Por lo que la presencia del oxígeno es fundamental para el crecimiento y desarrollo del microorganismo y por ende para la producción de los polihidroxicanoatos. En este tipo de fermentaciones los procesos biológicos son como procesos químicos, es decir como una reacción química donde se utilizan una serie de nutrientes para que el microorganismo crezca y genere el producto de interés (Castañeda, 2019; Uscanga et al. 2016). Tal como se observa en la Ecuación 1, sobre Estequiometría de reacción aeróbica de *B. megaterium*.



Entre los componentes que son fundamentales para la nutrición y el crecimiento de un microorganismo se encuentra una fuente de carbono (F_{CE}), una de nitrógeno (F_N), una de fósforo, macro y micronutrientes, fuente de energía y por supuesto de Oxígeno (O_2), si es una reacción aeróbica. Esto en conjunto permite que se genere una masa del microorganismo que se denomina biomasa (X). Entre otros de los principales productos por el metabolismo energético del microorganismo que es únicamente oxidativo se genera CO_2 y H_2O . Además, otros sub productos que pueden generarse por las condiciones del medio de cultivo pueden ser alcoholes, lípidos, ácidos orgánicos, polímeros, antibióticos, etc. que se representan como (P) (Castañeda, 2019).

Figura 2.

Representación del metabolismo de los microorganismos



Nota. Esquema de la conversión de nutrientes en la ruta metabólica de los microorganismos para la producción de energía y biomasa. Adaptado de Castañeda (2019).

Estas series de reacciones bioquímicas, presentadas en la figura 2, se llevan a cabo por las rutas metabólicas del microorganismo, donde los sustratos son transformados con el fin de obtener energía (ATP) mediante reacciones catabólicas con el fin de generar biomasa y los productos asociados al metabolismo. Actualmente debido a diversos estudios como la biotecnología, se ha comenzado a comprender más de estos procesos. Por esto es que, con el fin de implicar el desarrollo matemático del metabolismo de los microorganismos se ha planteado estequiométricamente un balance genérico extracelular del proceso, donde los componentes se intercambian con los nutrientes presentes en el medio (Castañeda, 2019).

b. Cinética del Crecimiento y Adaptación de Microorganismos

El proceso de adaptación de los microorganismos a las condiciones en las que se encuentra el medio que los rodea depende de diversos factores, puesto que, de acuerdo a la variabilidad de la composición, nutrientes y el estado de la cepa bacteriana, la cinética del microorganismo tiene una diferente predicción. Las respuestas del microorganismo a las condiciones de crecimiento se pueden evidenciar en parámetros de crecimiento como el tiempo de generación o la velocidad de crecimiento que representa el número de microorganismos por unidad de tiempo, también la velocidad de crecimiento específica, la cual representa el aumento de la concentración celular por unidad de tiempo (h^{-1}) y la velocidad de crecimiento específica máxima es la velocidad máxima de multiplicación que puede llegar a alcanzar el microorganismo (Hernández, 2003).

De acuerdo con la Ecuación 2, de velocidad de crecimiento celular (g/L). Donde X corresponde a la biomasa, dt el cambio de tiempo y μ es la velocidad de crecimiento específica.

$$r_N = \frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (2)$$

Se valida la velocidad de crecimiento específica, según la Ecuación 3. Donde X_0 corresponde a la masa del microorganismo en el tiempo 0.

$$\mu = \frac{dX}{X_0 dt} = \frac{d \ln X}{dt} \quad (3)$$

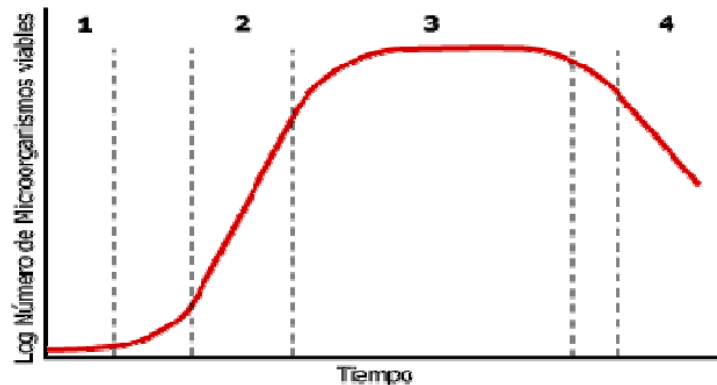
Las condiciones que influyen en el crecimiento son claramente los nutrientes que el microorganismo tiene disponibles en el medio que permiten su crecimiento y desarrollo. Pero también son otros factores intrínsecos inherentes a su alimentación como el pH del medio, la presión, la temperatura, la presencia o ausencia de oxígeno, agitación constante, la composición del aire, o si se encuentra la existencia de otra bacteria en el medio. Que el crecimiento se encuentre definido e influido por la naturaleza química y física del medio permite el estudio y el control del mismo (Benintende et al. 2002).

Los microorganismos en su mayoría no tienen un crecimiento exponencial prolongado, su crecimiento se encuentra delimitado por el consumo de los nutrientes en el medio o por la acumulación de productos del metabolismo de la bacteria que pueden llegar a ser tóxicos para una mayor población. Por lo

que después de un tiempo determinado el crecimiento de los microorganismos va disminuyendo hasta llegar a detenerse (Benintende et al. 2002).

Figura 3.

Curva típica del crecimiento bacteriano



Nota. Esta curva distingue cuatro fases del crecimiento bacteriano. Adaptado de Benintende et al. (2002)

En la figura 3, se observa la primera fase denominada fase de latencia o de retardo es en donde se puede observar un reposo en el cual las células se adaptan al medio en el que se encuentran y sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica, con el fin de aprovechar los nutrientes presentes en el medio. La segunda fase conocida como crecimiento exponencial es donde se observa la velocidad máxima de crecimiento, el cual depende de los factores ambientales externos como la temperatura, el pH, oxigenación, disponibilidad de nutrientes.

Cuando la velocidad comienza a disminuir hasta llegar a ser nula es cuando alcanza la fase estacionaria. Esta fase se caracteriza por el agotamiento del sustrato principal, o también podría deberse a la acumulación de sustancias tóxicas o el cambio de las condiciones externas del cultivo. Finalmente, la última fase corresponde a la muerte, donde, por el agotamiento de los nutrientes del medio y el sustrato principal aumenta el número de células muertas en el medio (Benintende et al. 2002).

Después de transcurrida la reacción bioquímica en el metabolismo del microorganismo, las cantidades iniciales de los nutrientes habrán disminuido y habrá diferentes tipos de sub productos en el medio junto con el incremento de la biomasa inicial derivada de la reproducción celular. Si se toma en cuenta las cantidades del inicio y final de la reacción, se pueden calcular los rendimientos específicos en función de medidas experimentales de las concentraciones. Entre estos rendimientos se puede calcular el

rendimiento, a través de la Ecuación 4: $Y_{x/s}$ que corresponde al rendimiento específico de la biomasa conforme el sustrato, en el caso de $Y_{p/s}$ el rendimiento de la producción del producto de interés en relación con el consumo del sustrato en Ecuación 5 y en Ecuación 6, $Y_{p/x}$ el rendimiento de la producción del producto en relación con el crecimiento del microorganismo (Castañeda, 2019).

Así como se ve, en la Ecuación 4, el rendimiento específico de Biomasa conforme el sustrato consumido en el medio (g/g).

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} = \frac{\text{Aumento de masa celular}}{\text{Masa de sustrato consumida}} \quad (4)$$

También, el rendimiento específico del producto formado conforme el sustrato consumido (g/g), como lo representa la Ecuación 5

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{dS} = \frac{\text{Aumento del producto formado}}{\text{Masa de sustrato consumida}} \quad (5)$$

Además, en la Ecuación 6, el rendimiento específico del producto formado conforme crece el microorganismo (g/g).

$$Y_{p/x} = \frac{dP}{dX} = \frac{\text{Aumento del producto formado}}{\text{Aumento de masa celular}} \quad (6)$$

c. Ruta Metabólica de *Bacillus Megaterium*

Una de las bacterias que se utilizan para la producción de Polihidroxicanoatos es *Bacillus megaterium*, la cual fue con la que se realizó el descubrimiento de que las bacterias eran capaces de sintetizar PHA en 1926 por Lemogine. Actualmente ya se han descubierto más de 300 especies capaces de sintetizar este tipo de polímeros. Los gránulos se sintetizan intracelularmente y se van acumulando dentro de la célula en forma de gránulos y en grandes cantidades que llegan a constituir el 90% de la biomasa (López, 2017; Gutiérrez, 2008).

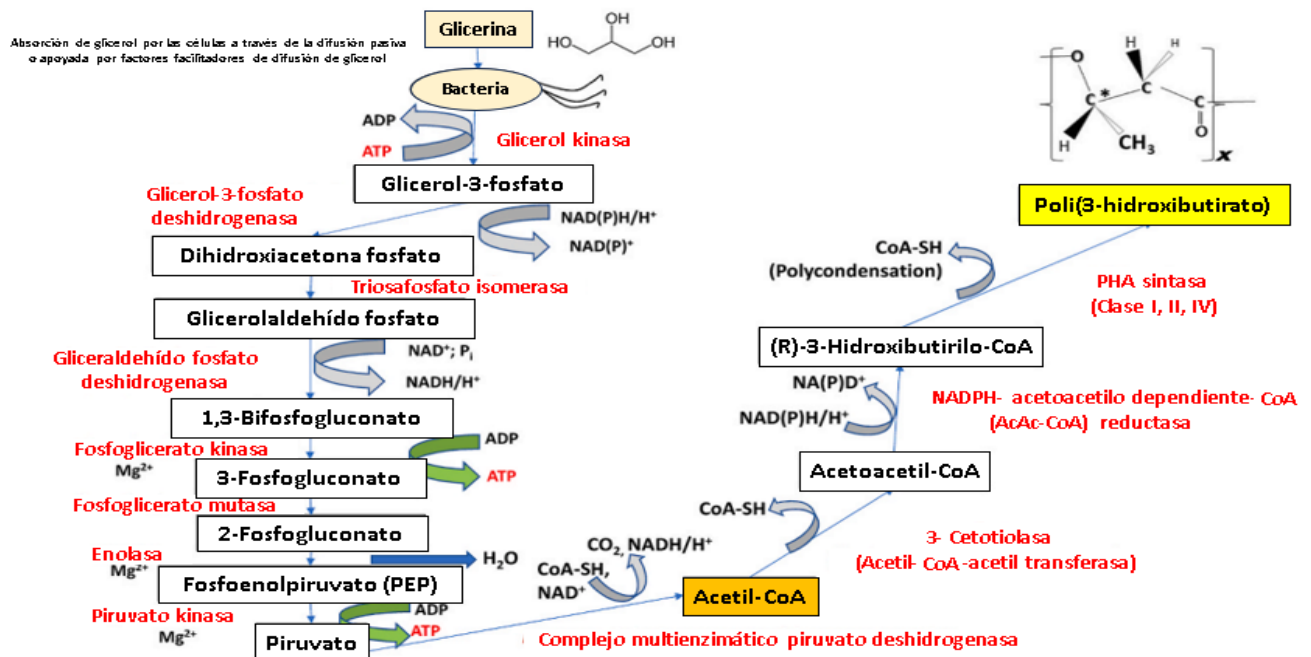
Bacillus megaterium es capaz de sintetizar PHA a partir de diferentes fuentes de carbono, las cuales tienen una gran influencia en la producción de los polihidroxicanoatos. Así mismo, de acuerdo a la fuente de carbono, existen diferentes rutas metabólicas para sintetizar el PHA. Por lo general la glucosa y otros ácidos grasos se utilizan para su producción. La glucosa se metaboliza por las células mediante la glucólisis,

mientras que otras sustancias como el glicerol se metaboliza mediante la ruta beta-oxidación, la cual genera más moléculas de ATP en comparación de la glucólisis (Alvarado et al. 2017; Chen et al. 2020).

Debido a las diferentes rutas metabólicas para sintetizar el PHA, se determinó que la curva de crecimiento de *Bacillus megaterium* con biodiesel del proceso de producción de biodiesel es una buena fuente de carbono, por lo que podría resultar con una mayor productividad en comparación con la glucosa (Alvarado et al. 2017; Chen et al. 2020).

Figura 4.

Ruta metabólica de intracelular para la producción de PHA a partir de Glicerina



Nota. Ruta metabólica de la glicerina para la producción de polihidroxicarboxilatos y energía durante la fermentación bacteriana. Adaptado de Koller y Obruča (2022)

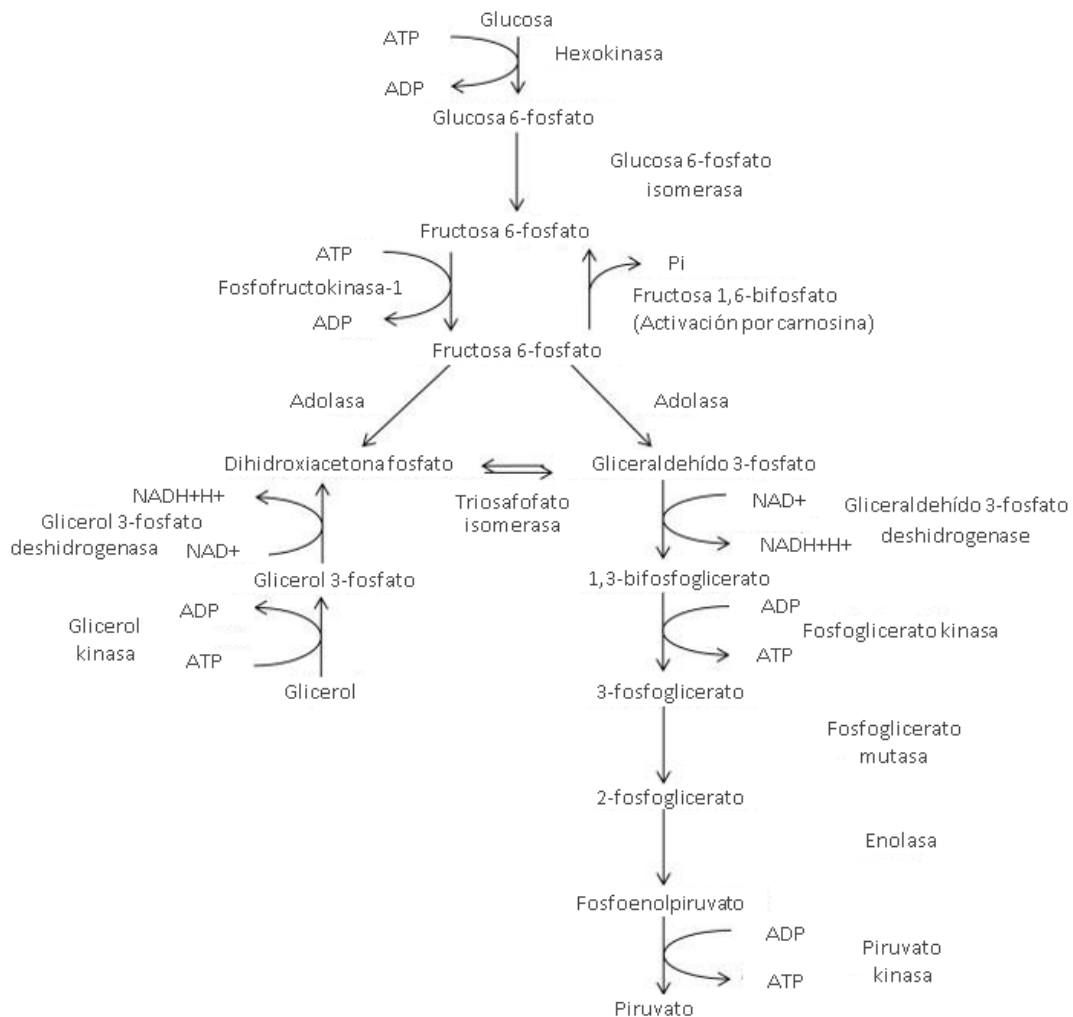
Para comenzar, el glicerol ingresa a las células bacterianas, lo cual se puede facilitar por las proteínas de la membrana facilitadoras de difusión del glicerol. Después de ingresar por las membranas, la glicerol-3-fosfato quinasa con ATP convierte el glicerol en glicerol-3-fosfato, y con una hidrogenación catalizada con la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa se convierte a dihidroxiacetona fosfato, un compuesto que experimenta una mayor conversión en las vías catabólicas centrales, que también se utilizan para la conversión de los azúcares por la glucólisis y el 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), lo cual

finalmente llevan a producir el compuesto C3 piruvato el cual se descarboxila al metabolito central acetil-CoA (Koller y Obruča, 2022).

El acetil CoA sin carencia de nutrientes como el nitrógeno, se acopla con el oxaloacetato para formar un compuesto central del ciclo de Krebs, lo que a través de una cascada de varias reacciones vuelve a formar oxaloacetato y acetil-CoA para ser oxidado y producir a CO₂ en la cadena respiratoria; y así generar energía. Sin embargo, debido a que en una fermentación para la producción de PHA se cuenta con bajos niveles de nitrógeno se obtiene el PHB (Koller y Obruča, 2022).

Figura 5.

Metabolismo del glicerol en la vía glucolítica para producción de piruvato



Nota. Participación bioquímica de la glicerina en la glucolisis para la producción de piruvato. Adaptado de Hipkiss et al. (2013)

Las células que crecen aeróbicamente con glicerol como única fuente de carbono normalmente metabolizan la glicerina a través del dihidroxiacetato fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3- fosfato (G3P). El glicerol ingresa en la ruta metabólica del ciclo de glucólisis donde se lleva a cabo la conversión de glucosa en piruvato para la producción de ATP, energía y NADH para biosíntesis (Hipkiss et al. 2013).

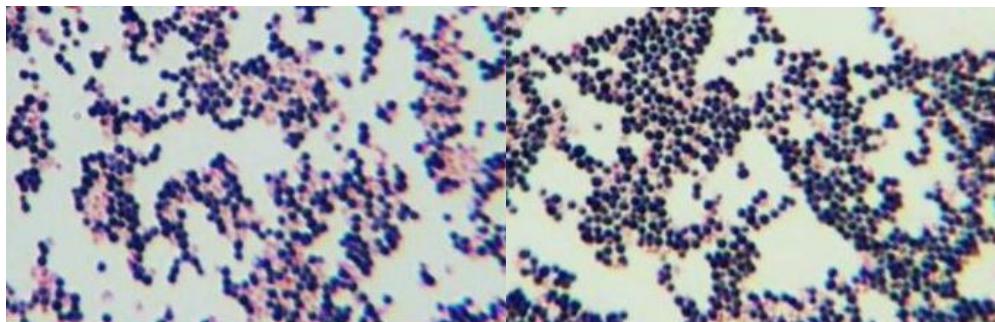
d. Tinción con Negro de Sudán

Uno de los métodos que se utilizan para detectar la producción de los gránulos PHA que sintetizan citoplasmáticamente algunos microorganismos como reversa de materia orgánica y como una fuente de nutrientes es una coloración provocada por el negro de Sudán. Puesto que en una solución alcohólica el negro de Sudán permite visualizar el contenido graso intracelular de las bacterias, ya que al suspender los microorganismos se forma una película bacteriana y genera el contraste de observación con safranina, lo cual permite determinar la presencia o ausencia de los gránulos intracelulares (Blanco, 2010).

Después de la tinción con negro de Sudán, los gránulos de PHA se tiñen de color negro dentro de las células, lo cual se puede observar en el microscopio. Esto es exactamente lo que lo hace un método simple para la detección de cepas potencialmente productoras de PHA. La tinción de negro de Sudán funciona tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas, por lo que es utilizado para los dos tipos de bacterias (Wei et al. 2011).

Figura 6.

*Presencia de gránulos de PHA en *n. C. taiwanensis* y *P. oleovorans* ATCC 29347 observados con un objetivo de inmersión en aceite de 100X*



Nota. Visualización intracelular de gránulos de PHA en bacterias. Adaptado de Wei et al. (2011).

e. Biorreactor

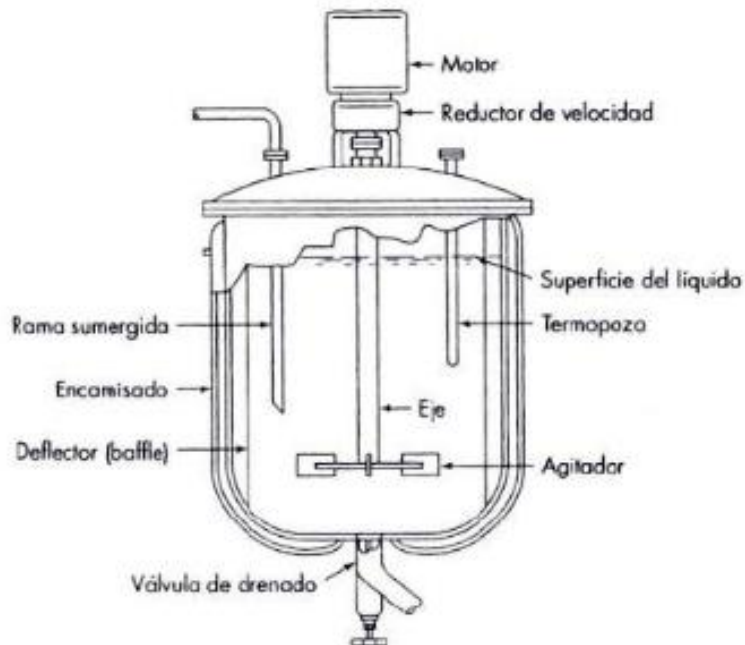
Un biorreactor es un sistema en dónde se llevan a cabo conversiones biológicas, como para las enzimas, microorganismos, células animales o vegetales. Es el corazón del proceso de fermentación o conversión de enzimas. Por lo que su diseño debe cumplir con los aspectos básicos de microbiología y además se deben considerar todas las variables para su configuración, diseño, dimensiones y condiciones de operación apropiadas. Puesto que se debe garantizar que el sistema biológico tendrá las condiciones óptimas para su crecimiento, maximizando la producción y minimizando los costos. El diseño del biorreactor influye directamente en el desempeño de todo el proceso, por lo que se deben tomar en cuenta la cinética de la reacción, el balance de masa, la energía, las operaciones de transferencia, entre otros. Por lo que, para definir las dimensiones, condiciones y diseño es necesario determinar el objetivo del proceso de producción y determinar la pureza que se quiere alcanzar (Trujillo y Valdez, 2009; González, 2018).

Existen tres tipos de reactores ideales para reacciones homogéneas con un solo fluido reaccionante, entre los cuales se encuentra el reactor discontinuo, el reactor de flujo de pistón y el reactor de mezcla completa. Estos reactores representan el mejor método para poner en contacto a los agentes reaccionantes sin que importen las condiciones de operación (Levenspiel, 1987).

En el reactor de flujo discontinuo STR (Stirred Tank Reactor) se agregan los reactantes en el reactor, se mezclan y se dejan reaccionar hasta que se cumple el tiempo establecido y se descarga la mezcla resultante. Este reactor cumple con una operación no estacionaria, puesto que la composición va variando con el tiempo, pero en todos los puntos del reactor la mezcla es uniforme. Este reactor se utiliza en diferentes casos de estudios. Es un tipo de tanque agitado con una camisa que rodea el exterior que permite calentar o enfriar el medio. Además, también es apropiado para las pruebas matemáticas y simulaciones (Levenspiel, 1987; Rolon et al. 2019).

Figura 7.

Reactor STR



Nota. Representación de los componentes principales de un bioreactor para la fermentación de microorganismos. Adaptado de Rolón et al. (2019).

El reactor de flujo de pistón PFR (Plug Flow Reactor), es también conocido como reactor de flujo en tapón, de flujo tubular ideal y de flujo uniforme. Se conoce principalmente porque el flujo del fluido es ordenado, sin que ningún elemento se mezcle o sobrepase con cualquier otro elemento antes o después del flujo. En este reactor no se puede dar una mezcla o difusión a lo largo de la trayectoria del flujo, pero sí una mezcla o difusión a lo largo de la trayectoria. La condición necesaria para que en el reactor exista un flujo en el pistón es que el tiempo de residencia en el reactor sea el mismo para todos los elementos del fluido (Levenspiel, 1987).

El último reactor ideal de flujo estacionario CSTR (Constant flow stirred tank reactor) se denomina reactor de mezcla completa, reactor de retromezcla, reactor ideal con agitación y, como su nombre indica, en el reactor el contenido se encuentra perfectamente agitado y su composición en todos los puntos del reactor es la misma en cada instante. Por lo que la corriente de salida del reactor tiene la misma composición que la del fluido. Así mismo, la alimentación de este reactor con los diferentes reactantes es constante, al igual que la salida (Levenspiel, 1987).

C. Producción de Biodiesel

Desde el siglo XX se comenzó a utilizar combustibles fósiles con el propósito de obtener energía. Sin embargo, debido a que el petróleo no es una fuente renovable y que los combustibles fósiles han comenzado a ocasionar impactos negativos en el ambiente, se ha comenzado la búsqueda de otras fuentes de energía más amigables con el ambiente y que sean renovables. Dentro de esta búsqueda se ha dado lugar a los biocombustibles, que son combustibles que provienen de fuentes renovables y que además puedan reducir la cantidad de gases de efecto invernadero que se producen actualmente por el uso de los combustibles provenientes del petróleo (Mussengue, 2016).

El biodiesel es un biocombustible que se produce por la reacción de transesterificación y se encuentra conformado por una mezcla de ésteres de ácidos. El proceso de transesterificación implica la reacción de un alcohol con un triglicérido que se encuentra generalmente en los aceites vegetales o las grasas de los animales en presencia de un catalizador, normalmente una base fuerte como el hidróxido de sodio o potasio. El alcohol reacciona con los ácidos grasos formando el éster mono alquílico conocido como el biodiesel y el desecho de la reacción es la glicerina (Mussengue, 2016).

El metanol o el etanol son los alcoholes más utilizados en este proceso. El metanol produce ésteres metílicos, comúnmente denominados ésteres metílicos de ácidos grasos-FAME, y el etanol produce ésteres etílicos, comúnmente denominados ésteres etílicos de ácidos grasos-FAEE. En la fase final del proceso se elimina el glicerol y se extrae el exceso de alcohol para su reciclaje, quedando el biodiesel (Mussengue, 2016).

Las reacciones de transesterificación son lentas, por lo cual, generalmente se utilizan catalizadores que ayudan al incremento de la velocidad de reacción. Estos catalizadores pueden ser homogéneos ácidos y básicos, enzimáticos o heterogéneos (Bulla, 2014).

Los catalizadores básicos alcanzan altas velocidades de reacción, pero requieren de etapas posteriores de purificación. Los catalizadores ácidos son los más utilizados en la producción de biodiesel, pero suele tener velocidades de reacción bastante lentas y los catalizadores enzimáticos son amigables con el medio ambiente y actúan a temperaturas cercanas a 20-30°C. Requiere de menos procesos de purificación que con los catalizadores básicos. Además, la glicerina que se produce es limpia. La desventaja es que las velocidades de reacción son bajas y las enzimas se inactivan (Bulla, 2014).

a. Glicerina Residual del Proceso de Biodiesel

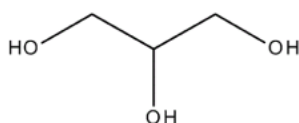
Se conoce como glicerol y es un compuesto químico que se puede obtener como coproducto de la industria óleo química. Mientras que la glicerina es aquella mezcla que posee un alto contenido de glicerol. La glicerina es un tialcohol versátil, puesto que contiene dos grupos hidroxilos primarios y uno secundario, lo cual le permite una gran cantidad de variantes de reacción (Polich, 2019).

La glicerina se presenta como un producto secundario del proceso de biodiesel y se obtiene en una proporción alrededor de 10% del aceite que se utiliza en la reacción de transesterificación, por lo que el aumento de la producción de biodiesel lleva consigo un aumento en la producción de glicerina como un desecho de la reacción. La glicerina al ser extraída de este proceso se presenta con diversas impurezas debido a la reacción, entre las cuales se encuentran los restos del catalizador utilizado, agua, metanol, sales inorgánicas, jabones, ácidos grasos libres, residuos de la materia prima, metil ésteres, etc.

Esta glicerina se conoce como glicerina cruda al presentar una gran cantidad de impurezas y puede refinarse. Sin embargo, los costos de la purificación son demasiado altos, por lo que suele acumularse o desecharse. Lo que genera un residuo en lugar de un recurso aprovechable en el proceso de producción de biodiesel. Por esto es importante buscar alternativas para la utilización de este desecho como un recurso fundamental (Polich, 2019).

Figura 8.

Estructura de la molécula de glicerina.



Nota. Estructura química general de la glicerina. Adaptado de Polich (2019)

V. ANTECEDENTES

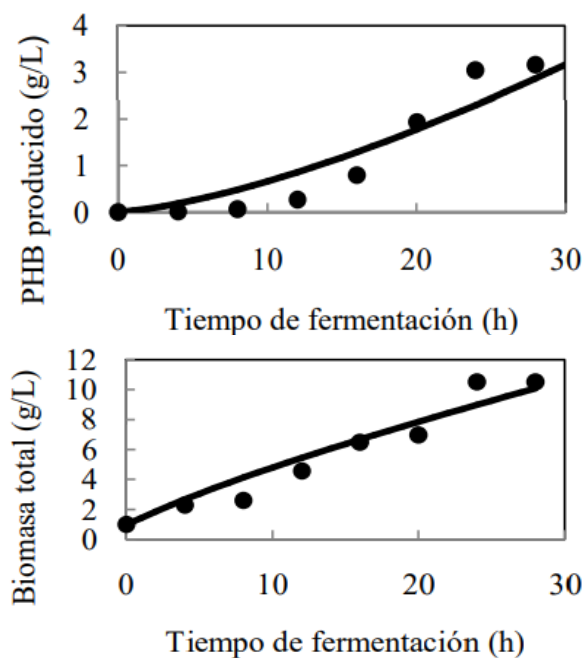
En 2014 se realizó un estudio por Ramos et al. (2014) en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Sur (UNS) en Argentina, donde se realizó el dimensionamiento de una planta de producción de Poli (β -hidroxibutirato) utilizando glicerol como fuente principal de carbono y la cepa de *Bacillus megaterium*.

Inicialmente, realizaron la purificación del glicerol proveniente del proceso de producción de biodiesel para retirar cualquier resto de metanol, agua, trazas del catalizador utilizado y restos de triglicéridos que esto pudiese contener. El glicerol se calentó para separar el metanol y se separó el agua con un evaporado instantáneo. Además, con ácido clorhídrico se neutralizó el catalizador metóxido de sodio de la producción de biodiesel y finalmente se eliminaron las trazas con cenizas utilizando la centrifugación.

En la siguiente etapa se realizó la fermentación y finalmente se realizó la separación del biopolímero, donde se rompió la estructura celular utilizando formiato de metilo en un digestor. Se realizó una separación de los restos insolubles de las paredes celulares que se generaron con una centrifugación y finalmente se purificó el producto mediante una evaporación.

Figura 9.

Variación de PHB y biomasa producido en función del tiempo.



Nota. Representación gráfica del aumento de producción de PHB conforme aumenta la biomasa en el tiempo. Adaptado de Schmidt et al. 2022

En otro estudio que se realizó en la Universidad Federal de Santa Caterina en Brasil por Schitmit et al.. se investigó la producción de polihidroxialcanoatos a partir de los residuos de glicerol del biodiesel e hidrolizado de cáscara de arroz con la cepa *Bacillus megaterium* a una temperatura de 30°C, 180 rpm de agitación durante 72 horas. Y así mismo se realizó una comparación con glucosa como la principal fuente de carbono. Para extraer el PHA presente en las células de *B. megaterium* se utilizó una mezcla de hipoclorito de sodio: cloroformo (Schmidt et al. 2022).

Se terminó el porcentaje de PHA intracelular de peso seco basandose en la captura de Gramos de polimero en cada extracción y el total de células para realizar la comparación entre las dos principales fuentes de carbono para la producción de PHA conforme la cantidad de biomasa generada (Schmidt et al. 2022).

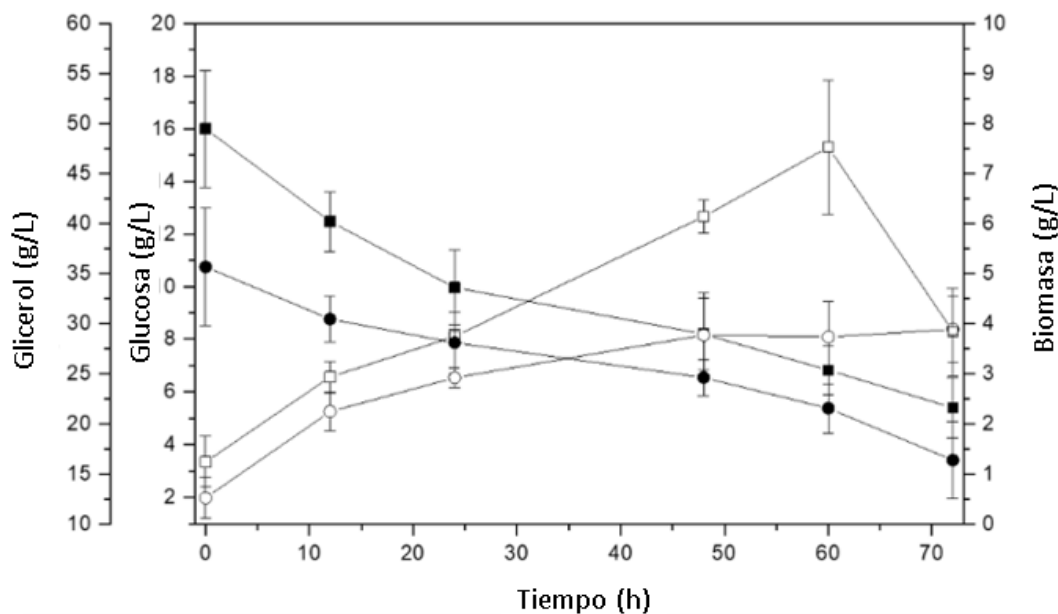
En cuanto Porcentaje de PHA presente en la biomasa, se observa la Ecuación 7.

$$\%_{\text{PHA}} = \frac{\text{PHA}}{X_r} \times 100 \quad (7)$$

Así también, se estableció la cinética microbiana de *Bacillus megaterium* al consumir los dos sustratos y los rendimientos correspondientes $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, donde se encontró que el $Y_{x/s}$ con la glucosa, como fuente de carbono, fue significativamente mayor en comparación que con glicerina. Por lo que por ende también presentó una mayor cantidad de PHB en peso seco, el cual fue de $1.19 \pm 0.40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que al utilizar la glucosa como sustrato principal fue de $0.66 \pm 0.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Schmidt et al. 2022).

Figura 10.

Cinética de crecimiento de B megaterium según el consumo de sustrato



Nota. Representación gráfica de la cinética de crecimiento de *B. Megaterium* conforme se consume la glicerina y la glucosa como fuente de carbono. Adaptado de Schmidt et al. (2022)

Tabla 1.

Rendimientos específicos de crecimiento de B. megaterium con glicerina y glucosa como fuente principal de carbono

Sustrato	$Y_{X/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	P_x ($g \cdot L^{-1} h^{-1}$)	PHA ($g \cdot L^{-1}$)
Glucosa	$0,52 \pm 0,18$	$0,18 \pm 0,04$	$0,06 \pm 0,00$	$1,19 \pm 0,40$
Glicerol	$0,05 \pm 0,07$	$0,02 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00$	$0,66 \pm 0,38$

Nota. Comparación de los resultados de concentración con glicerina y glucosa. Adaptado de Schmidt et al. (2022)

VI. METODOLOGÍA

A. Purificación de Glicerina

Se realizó la purificación de la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel a través de carbón activado para eliminar las impurezas mediante adsorción y centrifugación.

Materiales y equipo:

- Probeta de 500 mL
- Beaker de 500 mL
- Papel parafinado
- Agitador magnético
- Estufa
- Probeta de 100 mL
- Carbón activado
- Balas de 250 mL
- Centrifugadora Sorvall RT7 para 1 L

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 38 g de carbón activado en una balanza analítica, empleando papel parafinado.
2. Con una probeta de 500 mL se midieron 500 mL de glicerina proveniente del proceso de biodiesel y se agregaron a un beaker de 500 mL.
3. Se agregó el carbón activado previamente pesado a los 500 mL de glicerina y se colocó el beaker sobre una estufa con agitación.
4. Se añadió un agitador magnético y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
5. Se encendió el calentamiento de la estufa a 150°C y se mantuvieron las condiciones constantes por 1 hora hasta tener una solución homogénea y que el carbón activado absorbiera las impurezas de la glicerina.
6. Con una probeta de 100 mL se trasladaron 125 mL de glicerina a 4 balas de 250 mL y se colocaron en la centrifugadora.
7. Se configuró la centrifugadora a 3,500 rpm por 20 min y se puso en marcha.
8. Se recogió la glicerina de las 4 balas en un beaker de 500 mL y se desechó el pellet de carbón activado resultante en la parte inferior de cada una de las balas.

B. Preparación del Medio de Sales

Se formuló un medio de sales rico en glicerina como fuente de carbono y con limitación de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para promover la acumulación de PHA como fuente energética.

Materiales y equipo:

- Espátula analítica
- Balanza analítica
- Papel parafinado
- Balón aforado de 1 L
- Cinta testigo
- Agua destilada

Procedimiento:

1. Se utilizó una espátula analítica y papel parafinado para pesar en una balanza analítica cada una de las especies presentes en el Tabla 1.
2. Se agregó cada una de las especies en un balón aforado de 1 L y se aforó con agua destilada hasta el menisco.
3. Se colocó tapón del balón aforado de 1 L y se agitó hasta obtener una solución homogénea.
4. Se trasladó la solución a un frasco con tapadera de 1 L. Se le colocó una tira de cinta testigo al frasco y se trasladó a la autoclave.
5. Se esterilizó el medio a una temperatura de 121°C a 103kPa por 1 hora y 30 minutos.

Tabla 2.

Composición del medio de sales:

Reactivos	Composición (p/v)
Sulfato de amonio	1
Bicarbonato de sodio	1.2499
Fosfato monopotásico	5.0034
Fosfato de disódico	3.9902
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.2500
Cloruro de calcio dihidratado	0.0249

Citrato de amonio férrico	0.1256
Sulfato de zinc	0.2032
heptahidratado	0.7507
Ácido bórico	0.0553
Molibdato de sodio	
dihidratado	

Nota: La fuente de carbono se agregó de acuerdo a la corrida realizada.

C. Propagación de Cepas Bacterianas en Agar Nutritivo

Se realizó la reactivación de las cepas microbiológicas en un medio rico en nutrientes para recuperar viabilidad y actividades metabólicas.

Materiales y equipo:

- Caldo Nutritivo
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 150 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri
- Parafilm
- Etanol al 70%
- Cloro al 20%
- Par de guantes térmicos
- Tabla de asbesto
- Asa bacteriológica

Material biológico:

- *Bacillus megaterium* ATCC 14581
- *Bacillus cereus* ATCC 14579
- *Bacillus subtilis* ATCC 6051

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 2.04 g de agar nutritivo en una balanza analítica con papel parafinado.
2. Se agregó el agar nutritivo previamente pesado en un Erlenmeyer de 250mL y se colocó sobre una estufa.
3. En una probeta de 150 mL se midieron 102 mL de agua destilada y se vertieron en el Erlenmeyer con el medio de cultivo.
4. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
5. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 15 minutos hasta que el medio se clarificara y comenzara a ebulir.
6. Se cubrió el Erlenmeyer con aluminio y se colocó una tira de cinta testigo al costado del Erlenmeyer para garantizar la esterilización del medio.
7. Se ingresó el medio de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.
8. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiró el medio de cultivo de la autoclave y se colocó sobre una tabla de asbesto.
9. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20% y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
10. Se colocaron 6 cajas Petri alrededor de cada mechero y se abrieron.
11. Se vertieron alrededor de 17 mL en cada una de las cajas Petri a utilizar y se dejaron con la tapadera entre abierta para que se solidificara el agar.
12. Después de que el agar solidificara y se hubiera adaptado a la temperatura ambiente, se tomaron las 3 cepas bacterianas y se inocularon en el agar utilizando el hisopo asegurándose de cubrir todo el agar.
13. Se rodeó cada una de las cajas Petri con Parafilm y se ingresaron a la incubadora a 35°C durante 48 horas para que crecieran.
14. Después de que las cepas se hubieran propagado en cada una de las cajas Petri, se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20%, y con un encendedor se encendió 1 mechero para mantener estéril el área a trabajar.

15. Se tomaron las otras tres cajas Petri con agar nutritivo y las tres placas madre de las cepas bacterianas y con un asa bacteriológica y la técnica de estriado se volvieron a inocular en las placas Petri.
16. Después de cada estriado se colocaba el asa bacteriológica en el fuego para eliminar las bacterias adheridas restantes y se dejaba enfriar alrededor del mechero para que no se contaminara.
17. Las placas se rodearon con Parafilm y se incubaron a 35°C durante 48 horas para que crecieran.

D. Propagación de las Cepas en Caldo Nutritivo

Se realizó la siembra de la cepa microbiológica recuperada en un caldo rico en nutrientes para propiciar el crecimiento bacteriano.

Materiales y equipo:

- Caldo nutritivo
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 250 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri
- Parafilm
- Etanol al 70%
- Cloro al 20%
- Par de guantes térmicos
- Tabla de asbesto

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 3.6 g de caldo nutritivo en una balanza analítica con papel parafinado.

2. Se agregó el caldo nutritivo previamente pesado en un Erlenmeyer de 500 mL y se colocó sobre una estufa.
3. En una probeta de 500 mL se midieron 450 mL de agua destilada y se vertieron en el Erlenmeyer con el medio de cultivo.
4. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
5. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 20 minutos hasta que el medio se clarificara y comenzara a ebullición.
6. Se tomaron 9 Erlenmeyer de 250 mL y a cada uno se le colocó 50 mL de caldo nutritivo medidos con una probeta de 50 mL.
7. Se cubrieron los Erlenmeyer con aluminio y se les colocó una tira de cinta testigo al costado para garantizar la esterilización del medio.
8. Se ingresaron los medios de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.
9. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiraron los medios de cultivo de la autoclave y se colocaron sobre una tabla de asbesto hasta que alcanzarán la temperatura ambiente.
10. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20%, y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
11. Se tomaron las 4 cajas Petri con la propagación de las cepas previamente inoculadas y con un asa bacteriológica se inoculó cada cepa en cada uno de los Erlenmeyer con caldo nutritivo.
12. Se ingresaron los Erlenmeyer a una incubadora orbital y se configuró la incubadora a 180 rpm y 35°C durante 72 horas.
13. Se realizó el peso seco de 10 mL de cada uno de los medios después de 72 horas para determinar el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas.

E. Adaptación de las Cepas a 20 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo

Se realizó la adaptación de las cepas reactivadas en un medio con poca proporción de glicerina residual del proceso de biodiesel, en un medio rico en nutrientes para que las cepas comenzaran a adaptarse a la glicerina.

Materiales y equipo:

- Caldo nutritivo
- Agua destilada

- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 250 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri
- Parafilm
- Etanol al 70%
- Cloro al 20%
- Par de guantes térmicos
- Tabla de asbesto

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 8.115 g de caldo nutritivo en una balanza analítica con papel parafinado.
2. Se agregó el caldo nutritivo previamente pesado en un Erlenmeyer de 2 L y se colocó sobre una estufa.
3. En una probeta de 500 mL se midieron 1.014 L de agua destilada y se vertieron en el Erlenmeyer con el medio de cultivo.
4. Con una probeta de 50 mL se midieron 20.6107 mL de glicerina purificada y se agregó al Erlenmeyer de 2 L.
5. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
6. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 20 minutos hasta que el medio se clarificara y comenzara a ebulir.
7. Se tomaron 9 Erlenmeyer de 250 mL y a cada uno se les colocó 125 mL de caldo nutritivo con glicerina usando una probeta de 150 mL.
8. Se cubrieron los Erlenmeyer con aluminio y se les colocó una tira de cinta testigo al costado para garantizar la esterilización del medio.
9. Se ingresaron los medios de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.

10. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiraron los medios de cultivo de la autoclave y se colocaron sobre una tabla de asbesto hasta que alcanzarán a temperatura ambiente.
11. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20% y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
12. Se tomaron los 3 Erlenmeyer con la propagación de las cepas previamente inoculadas y con una macropipeta de 5 mL se tomaron 2 alícuotas de 5 mL del caldo. Se inoculó cada cepa en 3 Erlenmeyer con caldo nutritivo y glicerina hasta completar los 9 Erlenmeyer.
13. Se ingresaron los Erlenmeyer a una incubadora orbital y se configuró la incubadora a 180 rpm y 35°C durante 6 días.
14. Se realizó el peso seco de cada uno de los medios en el día 3 y en el día 6 para determinar el crecimiento de cada una de las cepas en triplicado.

F. Adaptación de las Cepas A 200 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo

Se realizó la siembra de las cepas adaptadas al medio de 20g de glicerina residual de biodiesel / L de medio de cultivo a una proporción de 200g de glicerina residual de biodiesel/ L de medio de cultivo para propiciar que la cepa se adaptara mejor a la glicerina y comenzara a utilizarla como fuente de carbono.

Materiales y equipo:

- Caldo Nutritivo
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 2 L
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 250 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri

- Parafilm
- Etanol al 70%
- Cloro al 20%
- Par de guantes térmicos
- Tabla de asbesto

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 6.63 g de caldo nutritivo en una balanza analítica con papel parafinado.
2. Se agregó el caldo nutritivo previamente pesado en un Erlenmeyer de 2 L y se colocó sobre una estufa.
3. En una probeta de 500 mL se midieron 828.89 mL de agua destilada y se vertieron en el Erlenmeyer con el medio de cultivo.
4. Con una probeta de 250 mL se midieron 206.11 mL de glicerina purificada y se agregó al Erlenmeyer de 2 L.
5. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
6. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 20 minutos hasta que el medio se clarificara y comenzara a ebulir.
7. Se tomaron 9 Erlenmeyer de 250 mL y a cada uno se les colocó 115 mL de caldo nutritivo con glicerina con una probeta de 150 mL.
8. Se cubrieron los Erlenmeyer con aluminio y se les colocó una tira de cinta testigo al costado para garantizar la esterilización del medio.
9. Se ingresaron los medios de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.
10. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiraron los medios de cultivo de la autoclave y se colocaron sobre una tabla de asbesto hasta que alcanzarán la temperatura ambiente.
11. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20%, y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
12. Se tomaron los 9 Erlenmeyer de la propagación de las cepas en medio con glicerina 20 g/L y con una macropipeta de 5 mL se tomaron dos alícuotas de 5 mL del medio de cada Erlenmeyer y se inoculó cada Erlenmeyer con medio nutritivo con glicerina al 200g/L hasta completar los 9 Erlenmeyer.

13. Se ingresaron los Erlenmeyer a una incubadora orbital y se configuró la incubadora a 180 rpm y 35°C durante 6 días.
14. Se realizó el peso seco de cada uno de los medios en el día 3 y en el día 6 para determinar el crecimiento de cada una de las cepas en triplicado.

G. Adaptación de las Cepas a 400 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio de Cultivo

Se realizó la siembra de las cepas adaptadas al medio de 200g de glicerina residual/L de medio de cultivo a una proporción de 400 g de glicerina de biodiesel/L:3 medio de cultivo para propiciar que las cepas ya utilicen la glicerina como fuente de carbono.

Materiales y equipo:

- Caldo Nutritivo
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 2 L
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 250 mL
- Probeta de 500 mL
- Estufa
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta indicadora de esterilización
- Cajas Petri
- Parafilm
- Etanol al 70%
- Cloro al 20%
- Par de guantes térmicos
- Tabla de asbesto

Procedimiento:

1. Con una espátula analítica se pesaron 4.98 g de caldo nutritivo en una balanza analítica con papel parafinado.
2. Se agregó el caldo nutritivo previamente pesado en un Erlenmeyer de 2 L y se colocó sobre una estufa.
3. En una probeta de 500 mL se midieron 622.776 mL de agua destilada y se vertieron en el Erlenmeyer con el medio de cultivo.
4. Con una probeta de 250 mL se midieron 412.21 mL de glicerina purificada y se agregó al Erlenmeyer de 2 L.
5. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
6. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 20 minutos hasta que el medio se clarificara y comenzara a ebulir.
7. Se tomaron 9 Erlenmeyer de 250 mL y a cada uno se les colocó 115 mL de caldo nutritivo con glicerina usando una probeta de 150 mL.
8. Se cubrieron los Erlenmeyer con aluminio y se les colocó una tira de cinta testigo al costado para garantizar la esterilización del medio.
9. Se ingresaron los medios de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.
10. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiraron los medios de cultivo de la autoclave y se colocaron sobre una tabla de asbesto hasta que alcanzaran la temperatura ambiente.
11. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20%, y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
12. Se tomaron los 9 Erlenmeyer de la propagación de las cepas en medio con glicerina 200 g/L y con una macropipeta de 5 mL se tomaron dos alícuotas de 5 mL del medio de cada Erlenmeyer y se inoculó cada Erlenmeyer con medio nutritivo con glicerina al 200g/L hasta completar los 9 Erlenmeyer.
13. Se ingresaron los Erlenmeyer a una incubadora orbital y se configuró la incubadora a 180 rpm y 35°C durante 6 días.
14. Se realizó el peso seco de cada uno de los medios en el día 3 y en el día 6 para determinar el crecimiento de cada una de las cepas en triplicado.

H. Adaptación de las Cepas A 15 G de Glicerina de Biodiesel/L de Medio Formulado

Se realizó la siembra de las cepas microbiológicas adaptadas al medio de 400 g de glicerina residual/L de medio de cultivo a un medio de 15 g de glicerina/L de medio formulado preparado anteriormente con los requerimientos nutricionales específicos para propiciar la producción de PHA.

Materiales y equipo:

- Agua destilada
- Macropipeta de 5 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Probeta de 500mL
- Probeta de 50 mL
- Estufa
- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Aluminio
- Autoclave
- Cinta testigo

Procedimiento:

1. Con una probeta de 500 mL se midieron 1019.54 mL del medio de sales preparado previamente y se vertieron en un Erlenmeyer de 2 L y se colocó sobre una estufa.
2. Con una probeta de 50 mL se midieron 15.45 mL de glicerina purificada y se agregó al Erlenmeyer de 2 L.
3. Se agregó un agitador magnético dentro del Erlenmeyer y se encendió la agitación de la estufa a 150 rpm.
4. Se encendió el calentamiento de la estufa a 100°C y se esperó 20 minutos hasta homogenizar el medio de sales.
5. Se cubrieron los Erlenmeyer con aluminio y se les colocó una tira de cinta testigo al costado para garantizar la esterilización del medio.
6. Se ingresaron los medios de cultivo a la autoclave por 1 hora y media a 120°C.

7. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se retiraron los medios de cultivo de la autoclave y se colocaron sobre una tabla de asbesto hasta que alcanzarán a temperatura ambiente.
8. Se esterilizó el área a trabajar con etanol al 70% y cloro al 20%, y con un encendedor se encendieron dos mecheros para mantener estéril el área a trabajar.
15. Se tomaron los 9 Erlenmeyer de la propagación de las cepas en medio con glicerina 40% y con una macropipeta de 5 mL se tomaron 5 mL del medio de cada Erlenmeyer y se inoculó cada Erlenmeyer con medio de sales hasta completar los 9 Erlenmeyer.
9. Se ingresaron los Erlenmeyer a una incubadora orbital y se configuró la incubadora a 180 rpm y 35°C durante 5 días.
10. Se realizó el peso seco de cada uno de los medios en el día 3 y en el día 5 para determinar el crecimiento de cada una de las cepas en triplicado.
11. Se realizó el mismo procedimiento con 20g de glicerina de biodiesel/L de medio formulado y 30 g de glicerina/L de medio de cultivo.

I. Calibración del Potenciómetro del Reactor Sartorius

Se realizó la calibración del potenciómetro del reactor sartorius utilizando soluciones estándar de pH de 4 y 7 para asegurar que durante la fermentación el equipo mantenga el pH configurado

Materiales y equipo:

- Solución estándar con pH de 4
- Solución estándar con un pH de 7
- Agua destilada
- Kimwipes
- Etanol 70%
- Bioreactor Sartorius

Procedimiento:

1. Se encendió el biorreactor Sartorius presionando el botón naranja en el módulo principal.
2. Se abrió el programa Sartorius en el computador, se ingresó al panel de calibraciones y se seleccionó para calibrar el potenciómetro.
3. Se seleccionó *Iniciar la calibración* y se sumergió el potenciómetro en la solución con un pH de 7 como indicaba el programa. Se esperó hasta que el equipo se calibrara a un pH de 7.

4. Después de terminar con la solución de 7 se sacó el potenciómetro y se limpió con un chorro de agua destilada, se secó con un Kimwipe y se sumergió en la solución con un pH de 4.
5. Al finalizar la calibración se volvió a lavar el potenciómetro con agua destilada, se secó con un Kimwipe y se colocó en el plato del reactor.

J. Preparación del Medio Formulado con Glicerina A 15 G de Glicerina/L de Medio Formulado para la Fermentación de 1 L en el Reactor Sartorius

Se realizó la preparación del medio formulado rico en glicerina (15g/L, 20 g/L y 30 g/L) y con limitante en nitrógeno (1g/L) para propiciar la producción de PHA durante la fermentación bacteriana.

Materiales y equipo:

- Agua destilada
- Cinta testigo
- Autoclave
- Probeta de 500 mL
- Probeta de 10 mL
- Aluminio
- Etanol 70%
- Embudo de plástico

Procedimiento:

1. Se retiraron los sensores y el motor del plato del biorreactor. También se retiró la chaqueta térmica, se quitaron los 3 tornillos que ajustan el plato y se retiró el plato del envase.
2. Con una probeta de 500 mL se midieron 886.6 mL del medio de sales preparado previamente y se vertieron en el envase del biorreactor.
3. Con una probeta de 10 mL se midieron 13.44 mL de glicerina purificada y se agregaron al envase con el medio de sales formulado.
4. Se volvió a colocar el plato y se ajustaron los tornillos del plato.
5. Se colocó aluminio a las entradas de los sensores y se colocó un trozo de cinta testigo al costado del envase.
6. Se trasladó el biorreactor a la autoclave y se desatornillaron parcialmente los tornillos del plato del reactor y se autoclaveó el medio por 1 hora y media a 120°C.

7. Se esperó a que la presión se estabilizara y con unos guantes térmicos se volvieron a ajustar los tornillos del reactor. Se retiró de la autoclave y se colocó una tabla de asbesto hasta que alcanzara la temperatura ambiente.
8. Con etanol al 70% se rociaron los sensores del biorreactor que están en contacto directo con el medio y un embudo de plástico, y se dejaron esterilizar por 15 minutos. Luego se retiró el exceso con papel y se repitió el proceso con cloro al 20%.
9. Después de que el reactor, con el medio, alcanzará la temperatura ambiente, se trasladó al lugar donde se encontraba el módulo.
10. Se encendió un mechero para mantener estéril el ambiente y se retiró el aluminio de las entradas del plato del biorreactor.
11. Se ingresaron los sensores de oxígeno disuelto, potenciómetro y termómetro. Junto con esto, se colocó el motor, la manguera del aire, las mangueras de las soluciones reguladoras del pH y se ajustaron correctamente.
12. Se colocó la chaqueta térmica alrededor del envase y se encendió el biorreactor y se abrió el programa Sartorius en el computador.
13. Se configuró la temperatura del reactor a 35°C, el pH a 7 y se inició la agitación a 180 rpm.
14. Se encendió el compresor y se ajustó la manguera del biorreactor. También se abrió parcialmente la válvula del aire y se reguló el flujo en el módulo principal.
15. Se esperó hasta que la temperatura y el pH del medio se ajustaran.
16. Se tomó la cepa de *Bacillus megaterium* ATCC 14581, que obtuvo mayor crecimiento y se trasladó hacia el reactor.
17. Se detuvo la agitación, el calentamiento, la regulación de pH y el flujo del aire, y se retiró uno de los sensores del plato.
18. Se colocó un embudo de plástico previamente esterilizado en la entrada del sensor y se vertieron 100 mL del Erlenmeyer con la adaptación al 15 g/L al biorreactor.
19. Se retiró el embudo y se volvió a colocar el sensor en la entrada.
20. Después de ajustar correctamente el sensor se volvió a encender la agitación, el calentamiento, la regulación del pH y el flujo del aire.
21. Se llevó a cabo la fermentación durante 6 días y se tomó muestras cada uno de los días para determinar el consumo de sustrato y el crecimiento de *Bacillus megaterium* ATCC 14581.
22. Se realizó el mismo procedimiento con 20g de glicerina de biodiesel/L de medio formulado y 30 g de glicerina/L de medio de cultivo.

K. Cuantificación de Glicerina

Se realizó una curva estandar de glicerina a través de soluciones de 3, 5, 6,7 y 8% para poder cuantificar muestras desconocidas.

Materiales y equipo:

- Glicerina pura
- Balón aforado 100 mL
- Agua destilada
- Pipeta graduada de 10 mL
- Bulbo para pipeta
- Tubo de ensayo
- Beaker de 50 mL
- Probeta de 50 mL
- Jeringa 5 mL

Procedimiento:

1. Con una probeta de 50 mL se midió 50 mL de glicerina pura y se colocaron en un beaker de 50 mL.
2. Usando una pipeta graduada se tomaron 10 mL de glicerina y se vertió en un balón de 100 mL.
3. Utilizando una pisseta de agua destilada se llenó el balón aforado hasta el menisco y se colocó el tapón.
4. Se agitó el balón durante 5 minutos hasta homogenizar la solución.
5. Se vertió 10 mL de la solución en un tubo de ensayo de 10 mL para enviar a HPLC.
6. Se repitió este procedimiento con las soluciones de 3%, 5%, 6%, 7% y 8%, v/v.
7. Utilizando una pipeta graduada de 5 mL se tomaron 2 mL de cada solución preparada con glicerina y se vertió en tubos de ensayo de 10 mL.
8. La solución se analizó a través de HPLC para establecer una curva estándar con concentraciones conocidas de glicerina.
9. Con una jeringa de 5 mL se tomaron 2 mL del medio fermentativo en el biorreactor Sartorius y se vertieron en un tubo de ensayo de 10 mL.
10. Se analizó a solución empleando HPLC y a través de la curva estándar de glicerina se cuantificó la concentración de glicerina presente en el medio fermentativo.

L. Preparación Solución Hcl 1 Molar

Se realizó la preparación de un buffer 1 molar de ácido clorhídrico para ajustar el pH en el reactor sartorius durante la fermentación bacteriana

Materiales y equipo:

- Ácido clorhídrico 32%
- Balón aforado de 100 mL
- Pisseta de agua destilada
- Guantes de látex
- Pipeta graduada de 10 mL
- Beaker de 50 mL
- Bicarbonato de sodio

Procedimiento:

1. Con los guantes de látex puestos se vertieron 10 mL de ácido clorhídrico en un beaker de 50 mL.
2. Con una pipeta graduada de 10 mL se midieron 9.49 mL de ácido clorhídrico al 32% y se vertieron en un balón aforado de 100 mL previamente lavado.
3. Con una pisseta de agua destilada se llevó el volumen del balón aforado hasta el menisco y se colocó el tapón del balón.
4. Se agitó el balón de abajo hacia arriba para obtener una solución homogénea de ácido clorhídrico 1 molar.
5. Se vertió la solución en el frasco correspondiente al ácido del reactor Sartorius para garantizar que el pH se mantuviera constante durante la fermentación.
6. Después de terminar de utilizar la cristalería se les agregó bicarbonato de sodio para neutralizar el ácido y no desechar restos de ácido en el lavabo.

M. Preparación Solución Naoh 1 Molar

Se realizó la preparación de un buffer 1 molar de hidróxido de sodio para ajustar el pH en el reactor sartorius durante la fermentación bacteriana

Materiales y equipo:

- Hidróxido de sodio
- Balón aforado de 100 mL
- Piseta de agua destilada
- Guantes de látex
- Pipeta graduada de 10 mL
- Beaker de 50 mL

Procedimiento:

1. En un papel parafinado se pesaron 3.999 g de hidróxido de sodio en una balanza analítica.
2. Se colocaron las perlas de hidróxido de sodio en un balón de 100 mL y con una piseta de agua destilada se llevó el volumen del balón aforado hasta el menisco y se colocó el tapón del balón.
3. Se agitó el balón de abajo hacia arriba para obtener una solución homogénea de hidróxido de sodio hasta que todas las perlas se hayan diluido en el agua.
4. Se vertió la solución en el frasco correspondiente a la base del reactor Sartorius para garantizar que el pH se mantuviera constante durante la fermentación.

N. Determinación del Peso Seco

Se realizó la cuantificación del peso seco obtenido durante el proceso de fermentación a través de la centrifugación del medio y el pesaje del Pellet seco

Materiales y equipo:

- Centrifugadora Eppendorf 5804 R
- Balas de 50 mL para centrifugar
- Balanza analítica
- Pipeta Pasteur
- Secador de bandejas

Procedimiento:

1. Se rotularon 8 balas de 50 mL y se pesaron en una balanza analítica.
2. Se recolectaron 30 mL del medio fermentativo y se vertieron en las 8 balas de 50 mL de la centrifugadora.

3. Se colocó cada una de las balas en la balanza y utilizando una pipeta Pasteur de 1 mL. Se ajustó el peso hasta cuadrar 1 cifra significativa.
4. Se trasladaron las balas hasta la centrifugadora y se colocaron en los adaptadores.
5. Se ajustó la velocidad a 3,500 rpm y se centrifugó por 25 minutos.
6. Se tomó en un tubo de ensayo el sobrenadante para analizarlo mediante HPLC y el resto se desechó.
7. Las balas de 50 mL con el pellet se ingresaron a un secador de bandejas a 60°C durante 48 horas para eliminar cualquier residuo de agua.
8. Se pesaron las balas con el pellet seco en la balanza analítica y por diferencia de pesos se determinó el peso seco de la cepa bacteriana a lo largo del tiempo.

O. Preparación del Indicador Negro de Sudán

Se realizó la preparación del indicador negro de Sudán 3% p/v en etanol al 99% para disolverlo correctamente y que permita un secado rápido

Materiales y equipo:

- Negro de Sudán
- Espátula analítica
- Balanza analítica
- Etanol 99%
- Balón aforado
- Probeta de 50 mL
- Varilla de vidrio
- Beaker de 100 mL
- Aluminio

Procedimiento:

1. Con una probeta se midió 71 mL de etanol al 99% y se agregó a un balón aforado de 100mL.
2. Se aforó el balón con agua destilada hasta llegar al menisco.
3. Se cerró el balón aforado y se colocó un dedo sobre la tapadera. Luego se procedió a agitar el balón hasta obtener una solución de etanol 70%.
4. Se colocaron guantes de látex y gafas protectoras antes de utilizar el reactivo negro de Sudán.
5. Se envolvió un Beaker de 100 mL en aluminio para evitar que el tinte se degrade por la luz.

6. Se utilizó una espátula analítica y papel parafinado para pesar en una balanza analítica 0.003 g de negro de Sudán y se colocó en un beaker de 100 mL.
7. Se agregaron 50 mL de la solución de etanol al 70% al beaker con el reactivo negro de Sudán.
8. Con una varilla de vidrio se agitó la mezcla hasta que el negro de Sudán se encontró completamente disuelto en el etanol al 70%.
9. Se envolvió el balón aforado de 100 mL con aluminio para preparar la solución de negro de sudan 3% p/v en etanol a 70%.
10. Se colocó la mezcla en el balón aforado y se agregó el resto de etanol al 70% restante en el beaker para hacer un lavado, si quedaron restos del reactivo en el fondo del beaker.
11. Con esta solución aforó el balón aforado hasta el menisco.
12. Se vertió la solución de negro de Sudán en un gotero de 100mL cubierto con papel aluminio y se almacenó a temperatura ambiente.

P. Identificación del PHA Mediante Tinción con Negro de Sudán

Se realizó la identificación del PHA utilizando una gota del medio de cultivo y el indicador negro de Sudán en conjunto con xileno y safranina para evaluar en el microscopio si las bacterias tenían PHA.

Materiales y equipo:

- Indicador negro de Sudán en etanol 70%
- Etanol 70%
- Cloro 20%
- Mechero
- Encendedor
- Portaobjetos
- Aceite de inmersión
- Kimwipes
- Microscopio
- Agua destilada
- Safranina
- Xileno
- Pipeta Pasteur

Procedimiento:

1. Se desinfectó la zona a trabajar utilizando etanol al 70% y Cloro al 20%.
2. Se utilizó un encendedor para encender un mechero y mantener una zona estéril.
3. Con una pipeta Pasteur se tomó una muestra del caldo de cultivo y se depositó en el centro de un portaobjetos identificado.
4. Se movió de un lado a otro el portaobjetos sobre la llama del mechero hasta fijar el cultivo al portaobjetos.
5. Se agregó de 3 a 5 gotas de la solución de negro de Sudán 3% p/v en 70% de etanol sobre el medio de cultivo en el portaobjetos.
6. Se espero entre 15 y 20 minutos a que el etanol de la solución de negro de Sudán se evaporó.
7. Se agregó de 3 a 5 gotas de xileno sobre el cultivo fijado en el portaobjetos y se esperó a que se seicara por completo.
8. Se agregó 1 gota de safranina por 10 segundos sobre el cultivo fijado en el portaobjetos y se retiró con agua destilada.
9. Se esperó a que el portaobjetos se seicara por completo y se agregó una gota de aceite de inmersión sobre el cultivo fijado y se hizo observación debajo del microscopio a 100x.

Q. Tinción GRAM

Se realizó la Tinción GRAM utilizando cristal violeta, Luigi, alcohol acetona y safranina para determinar si las bacterias eran GRAM positivo o gran negativo

Materiales y equipo:

- Etanol 70%
- Cloro 20%
- Mechero
- Encendedor
- Portaobjetos
- Aceite de inmersión
- Kimwipes
- Microscopio
- Agua destilada
- Safranina
- Lugol

- Alcohol acetona
- Cristal violeta
- Pipeta Pasteur

Procedimiento:

1. Se desinfectó la zona a trabajar utilizando etanol al 70% y cloro al 20%.
2. Se utilizó un encendedor para encender un mechero y mantener una zona estéril.
3. Con un gotero se tomó una muestra del caldo de cultivo y se depositó en el centro de un portaobjetos identificado.
4. Se movió de un lado a otro el portaobjetos sobre la llama del mechero hasta que se fijó el cultivo al portaobjetos.
5. Se agregó de 2 a 3 gotas de cristal violeta durante un minuto sobre el cultivo fijado en el portaobjetos y se retiró con agua destilada.
6. Se agregó de 2 a 3 gotas de Lugol sobre el cultivo fijado en el portaobjetos. Luego, se esperó durante 1 minuto y se retiró con agua destilada.
7. Se agregó de 5 a 6 gotas de alcohol acetona un decolorante para retirar el cristal violeta de las células y se lavó el portaobjetos con agua destilada.
8. Se agregó de 1 a 2 gotas de safranina por 45 segundos y se retiró con agua destilada.
9. Se agregó 1 gota de aceite de inmersión en el portaobjetos y se observó en el microscopio con el lente de 100x.

R. Cuantificación de PHA

Se realizó la cuantificación de PHA utilizando el peso seco obtenido durante la fermentación de *Bacillus megaterium* a través de una solución de hipoclorito para inducir la lisis celular y cloroformo para extraer el PHA, posteriormente se separaron las fases por gravedad y el cloroformo se destiló para recuperar el pellet (PHA) y se analizó a espectro IR

Materiales y equipo:

- Centrifugadora Fisher Cientific 228
- Balas de 250 mL
- Balas de vidrio 15 mL
- Secador de bandejas
- Probeta de 50 mL
- Erlenmeyer de 250 mL

- Pipeta Pasteur
- Balanza semi analítica
- Balanza analítica
- Espátula analítica
- Cloroformo
- Hipoclorito de sodio
- Beaker de 150 mL

Procedimiento:

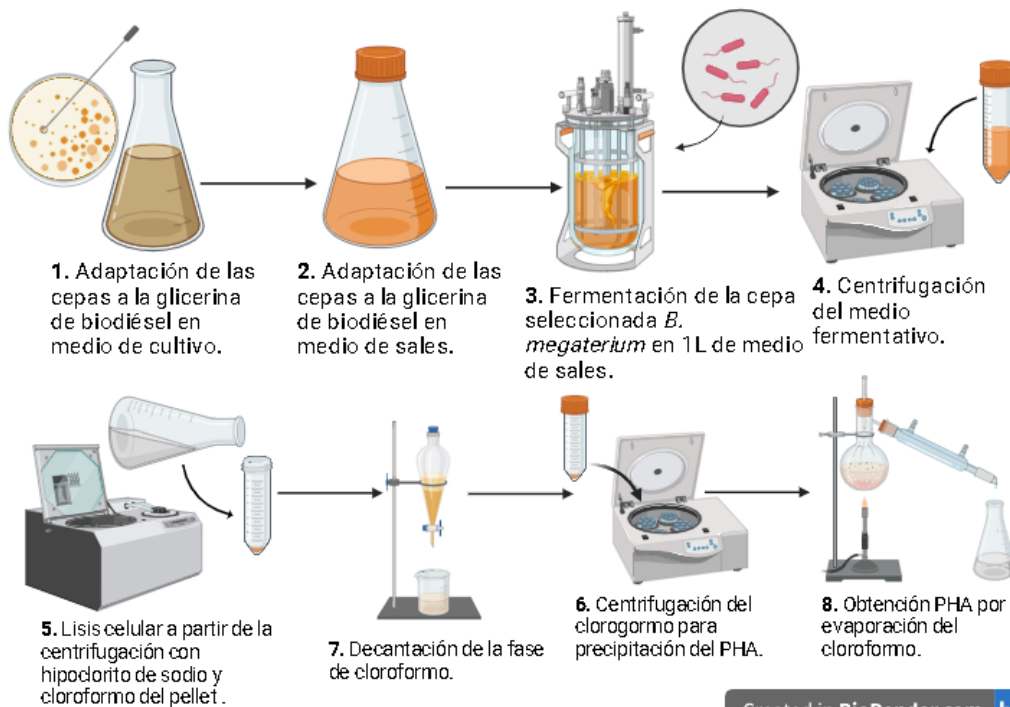
1. Se trasladó el medio de cultivo resultante de la fermentación de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a una centrifugadora con capacidad de 1 L.
2. Se trasladaron 250 mL del medio fermentativo a 4 balas de 250 mL y se colocaron en la centrifugadora.
3. Se pesaron las balas de 250 mL en una balanza semianalítica y se cuadraron a una cifra significativa.
4. Se configuró la centrifugadora a 3,800 rpm por 30 minutos y se encendió.
5. Se tomó una muestra del sobrenadante y se almacenó para realizar HPLC.
6. Se ingresaron las balas con el pellet a un horno a 60°C por 48 h para secar la biomasa.
7. Se raspó el pellet obtenido en la parte inferior de las balas y se trasladó a un Erlenmeyer de 250 mL.
8. Se trasladó el Erlenmeyer con la biomasa a la campana y se le agregó con una probeta de 50 mL, 20 mL de cloroformo y 20 mL de hipoclorito de sodio 4% p/v.
9. Se agregó un agitador magnético al beaker y se colocó sobre una estufa.
10. Se encendió la agitación a 100 rpm y se configuró la temperatura a 35°C durante 40 minutos.
11. Se colocó el aluminio en la parte superior del Erlenmeyer para evitar evaporar los solventes.
12. Al finalizar de homogenizar la muestra para producir la lisis celular del medio, se trasladó la muestra a una ampolla de decantación para separar los solventes mediante gravedad.
13. Se recuperó la fase inferior de cloroformo en un beaker de 150 mL.
14. Se trasladó el cloroformo con el PHA a 2 balas de 15 mL de vidrio.
15. Se pesaron las balas en una balanza semianalítica y se cuadró a una cifra significativa con ayuda de una pipeta Pasteur hasta llegar.
16. Se ingresaron las balas a la centrifugadora y se centrifugó a 3,400 rpm durante 20 minutos para precipitar el PHA.
17. Al finalizar la centrifugación, se recuperó el precipitado y el cloroformo, se transvasó a otro recipiente, y se montó el sistema de destilación.

18. Se encendió la estufa a 61°C y se esperó 1 hora a que el solvente se evaporara y se recuperó en la otra parte del sistema de destilación.
19. Cuando el cloroformo empezó a agotarse en el balón, se retiró y transvasó el medio a un beaker de 50 mL.
20. Se dejó secar la muestra en un espacio cerrado durante 72 horas.
21. Cuando la muestra ya no presentó cloroformo líquido, se ingresó el beaker al secador de bandejas durante 48 horas.
22. Se pesó el resultante de la destilación en una balanza analítica.
23. Se determinó la diferencia del peso del beaker con el PHA obtenido para cuantificar la producción de PHA en la fermentación.
24. Se repitió este paso con todas las muestras a analizar.
25. Se envió la muestra a espectroscopía infrarroja para analizar.

En la figura 11 se observa cada fase del diseño experimental utilizado para la producción de polihidroxialcanoatos.

Figura 11.

Diagrama de la metodología experimental utilizada para la producción de PHA.



Created in **BioRender.com** **bio**

Nota. Procesos necesarios para realizar los ensayos de producción de PHA. Adaptado de Schmidt et al. (2022)

VII. RESULTADOS

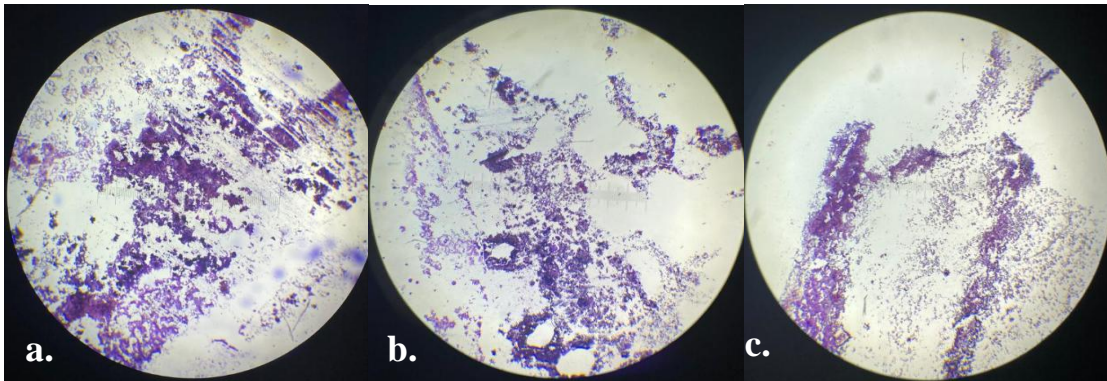
A. Identificación de Bacilos con Tinción GRAM

Tinción GRAM de las cepas utilizadas en la adaptación en medio de cultivo con glicerina para evidenciar si las bacterias utilizadas en el estudio son Gram negativo o positivo

En la figura 12 se observa la tinción Gram de las bacterias en el medio de adaptación a 35°C y 180 rpm donde a) *Bacillus megaterium* ATCC 14581, b) *Bacillus cereus* ATCC 14579, y c) *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

Figura 12.

Tinción GRAM de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de caldo nutritivo.

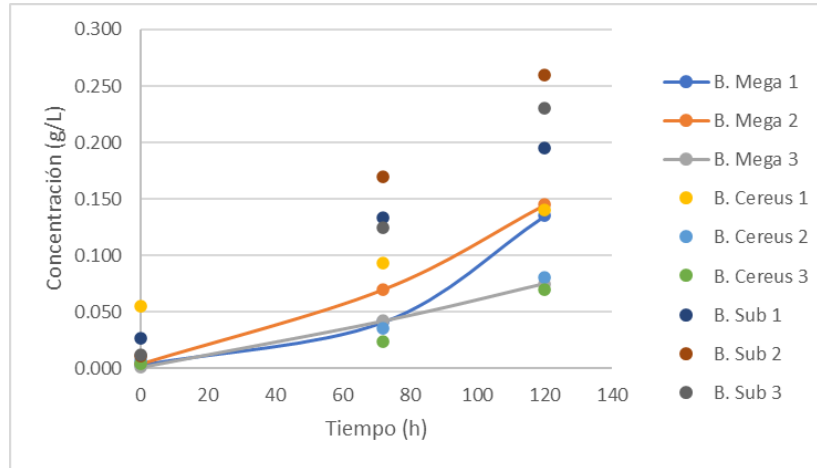


B. Adaptación de las Cepas Bacterianas al Consumo de Glicerina en Caldo Nutritivo

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en un caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina, como etapa inicial de adaptación.

Figura 13.

Adaptación de las cepas bacterianas a 20 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.

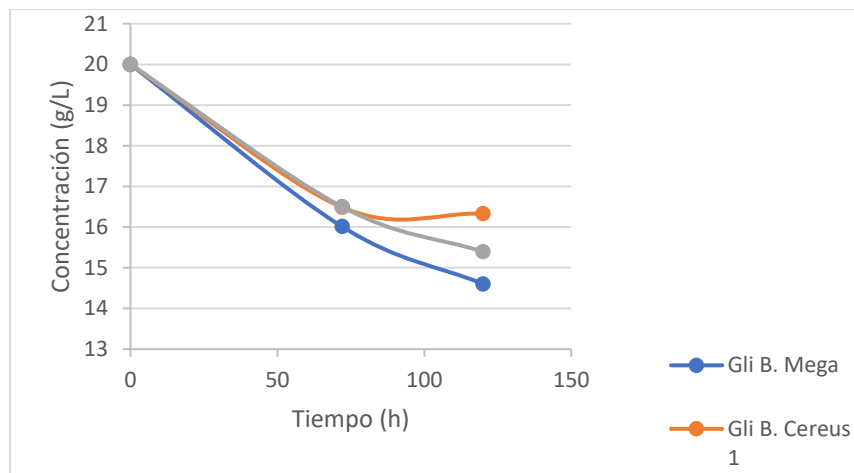


*Nota. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579, y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051, en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.*

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina, como etapa inicial de adaptación de las cepas bacterianas

Figura 14.

Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 20 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.

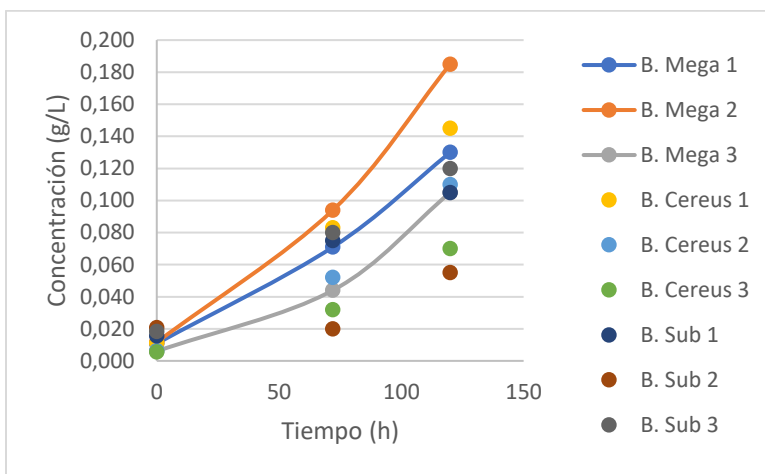


Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579 y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en un caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina, como segunda etapa de la adaptación.

Figura 15.

Adaptación de las cepas bacterianas a 200 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.

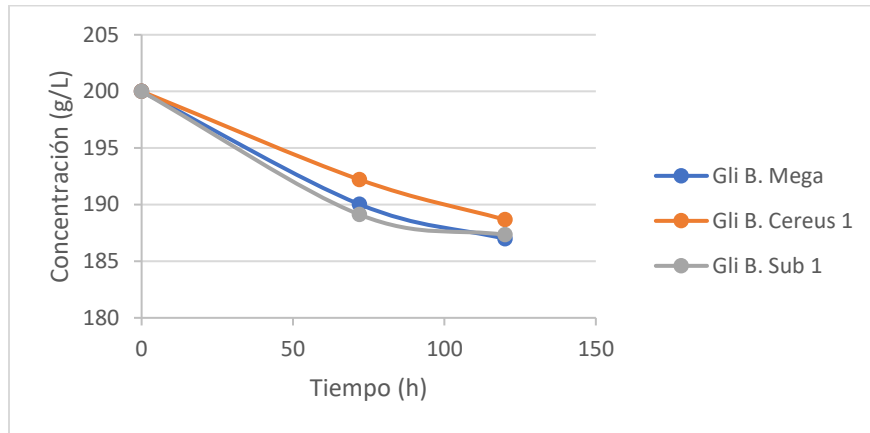


Nota. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579, y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina, como segunda etapa de adaptación de las cepas bacterianas

Figura 16.

Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 200 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.

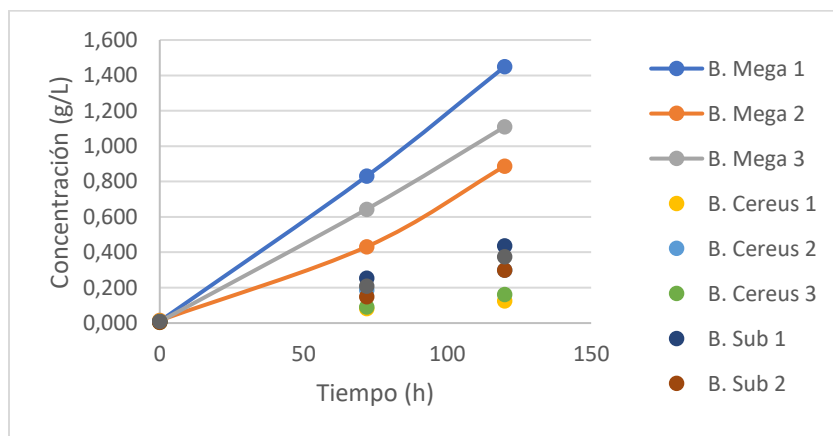


Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 1479, y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en un caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina, como tercera etapa de la adaptación.

Figura 17.

Adaptación de las cepas bacterianas a 400 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.

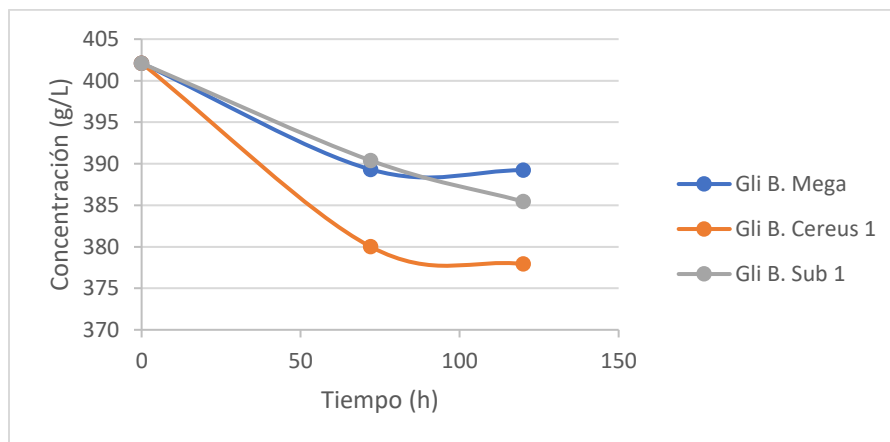


Nota. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579, y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina, como tercera etapa de adaptación de las cepas bacterianas.

Figura 18.

Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 400 g/L de glicerina de biodiesel en caldo nutritivo.



Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 1479, y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se determinó los rendimientos específicos promedio del crecimiento bacteriano conforme el consumo de la fuente de carbono de las cepas bacterianas.

Tabla 3.

Rendimientos promedio del crecimiento de la biomasa respecto al consumo de la glicerina en un medio de caldo nutritivo.

Cepa bacteriana	Rendimiento $Y_{x/s}$ (g/g)					
	20 (g/L)	$\pm(g/g)$	200 (g/L)	$\pm(g/g)$	400 (g/L)	$\pm(g/g)$
<i>B. megaterium</i>	0.1612	0.0239	0.0885	0.0123	0.7068	0.0835
<i>B. cereus</i>	0.1488	0.0090	0.0796	0.0130	0.0619	0.0145
<i>B. subtilis</i>	0.4218	0.0384	0.0524	0.0118	0.1746	0.0151

C. Análisis Estadístico de las Adaptaciones en Caldo Nutritivo.

Hipótesis planteadas para la adaptación de las cepas bacterianas en el caldo nutritivo con glicerina residual de biodiesel

Tabla 4.

Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo y para cada una de las concentraciones de glicerina.

Hipótesis nula (H_0)	Hipótesis alternativa (H_0)
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	$M_{B. Mega} \neq M_{B. Subtilis} \neq M_{B. Cereus}$
$M_{20\text{ g/L}} = M_{200\text{ g/L}} = M_{400\text{ g/L}}$	$M_{20\text{ g/L}} \neq M_{200\text{ g/L}} \neq M_{400\text{ g/L}}$

Valor p obtenido del análisis de medias emparejadas biomasa, rendimiento de crecimiento y consumo de sustrato para cada cepa en medio con 20 g/L de glicerina.

Tabla 5.

Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento	Valor P del rendimiento específico $Y_{x/s}$
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis}$	0.0427	0.1488
$M_{B. Mega} = M_{B. Cereus}$	0.6428	0.1134
$M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	0.0390	0.0263

Valor p obtenido del análisis de medias emparejadas biomasa, rendimiento de crecimiento y consumo de sustrato para cada cepa en medio con 200 g/L de glicerina.

Tabla 6.

Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento	Valor P del rendimiento específico Yx/s
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis}$	0.3252	0.3465
$M_{B. Mega} = M_{B. Cereus}$	0.3459	0.6684
$M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	0.5108	0.3749

Valor p obtenido del análisis de medias emparejadas biomasa, rendimiento de crecimiento y consumo de sustrato para cada cepa en medio con 400 g/L de glicerina.

Tabla 7.

Valor P de la comparación de medias emparejadas del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento	Valor P del rendimiento específico Yx/s
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis}$	0.0257	0.0240
$M_{B. Mega} = M_{B. Cereus}$	0.0475	0.0323
$M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	0.1934	0.0884

Comparación del valor P obtenido para el crecimiento bacteriano de las cepas en cada concentración de glicerina evaluada.

Tabla 8.

Valor P de la comparación de medias con igual o diferente varianza del aumento de biomasa para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento de <i>B. megaterium</i>	Valor P del crecimiento de <i>B. cereus</i>	Valor P del crecimiento de <i>B. subtilis</i>
$M_{20\text{ g/L}} = M_{200\text{ g/L}}$	0.4508	0.1232	0.0025
$M_{20\text{ g/L}} = M_{400\text{ g/L}}$	0.0243	0.5502	0.3930
$M_{200\text{ g/L}} = M_{400\text{ g/L}}$	0.0240	0.2423	0.0066

Comparación del valor P obtenido para los rendimientos específicos de las cepas en cada concentración de glicerina evaluada.

Tabla 9.

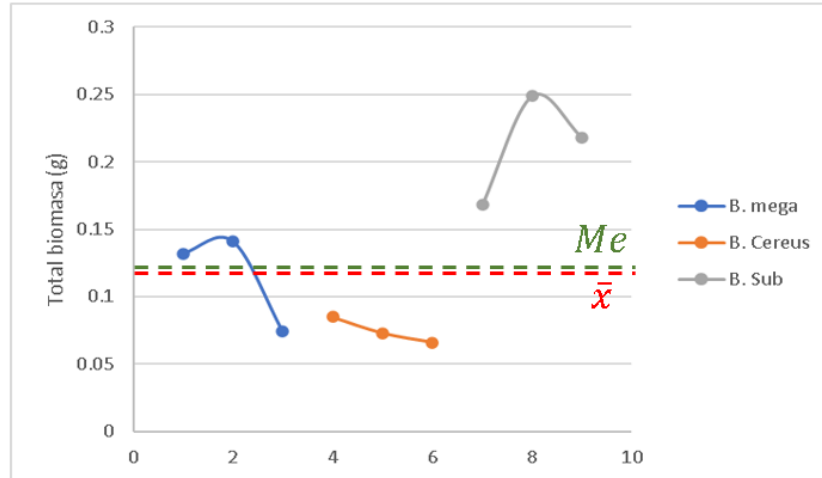
Valor P de la comparación de medias con igual o diferente varianza de los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo con 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento de <i>B. megaterium</i>	Valor P del crecimiento de <i>B. cereus</i>	Valor P del crecimiento de <i>B. subtilis</i>
$M_{20\text{ g/L}} = M_{200\text{ g/L}}$	0.0054	0.0452	0.0802
$M_{20\text{ g/L}} = M_{400\text{ g/L}}$	0.0206	0.0911	0.0008
$M_{200\text{ g/L}} = M_{400\text{ g/L}}$	0.0243	0.4996	0.0076

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina.

Figura 19.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L en caldo nutritivo.

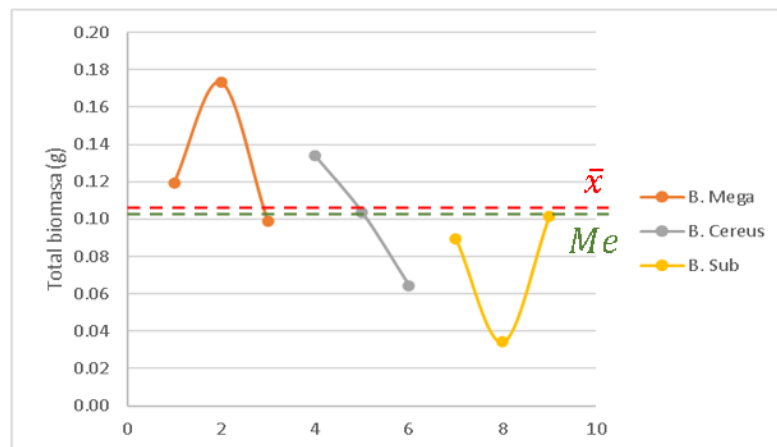


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 145579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 20 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina.

Figura 20.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 200 g/L en caldo nutritivo.

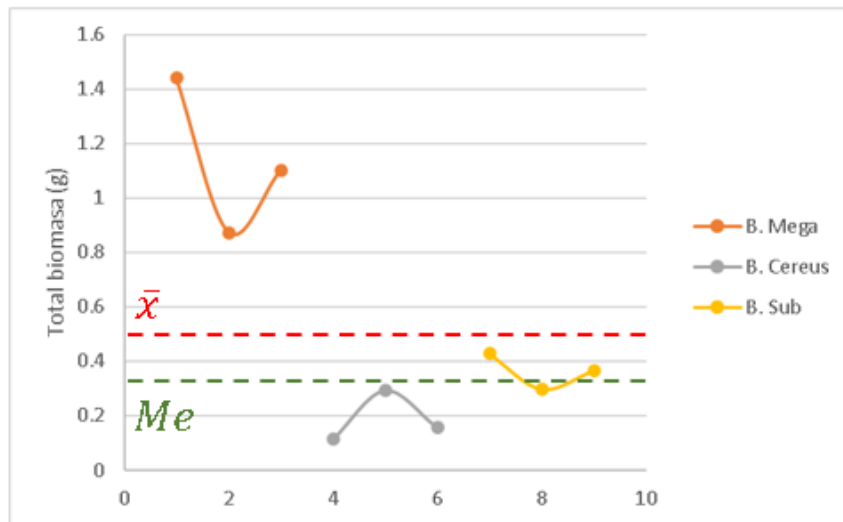


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 200 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina.

Figura 21.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 400 g/L en caldo nutritivo.

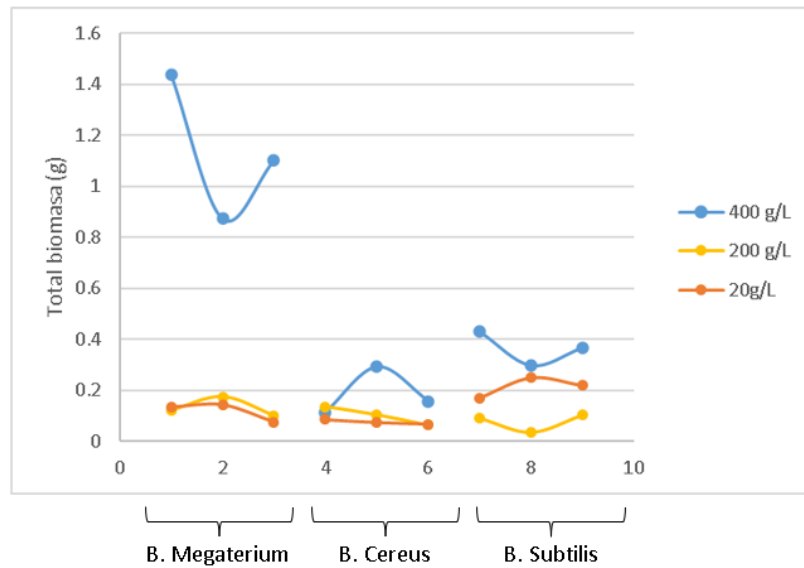


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 400 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el caldo nutritivo con 20g/L, 200g/L y 400 g/L de glicerina

Figura 22.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L en caldo nutritivo.



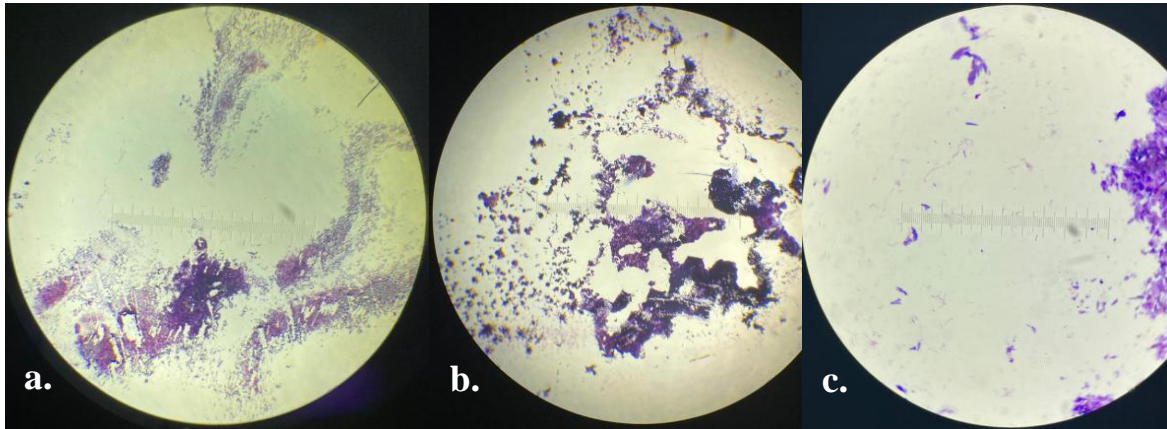
Nota. En la figura se observa la comparación entre el crecimiento de las tres cepas bacterianas en las tres concentraciones de adaptación en caldo nutritivo a con 180 rpm y 35°C.

D. Identificación de Bacilos con Tinción GRAM de las Cepas en el Medio Formulado de Sales

Tinción Gram de las cepas utilizadas en la adaptación en medio de sales formulado con glicerina para evidenciar si las bacterias utilizadas en el estudio son Gram negativo o positivo.

Figura 23.

Tinción Gram de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina en 125 mL.



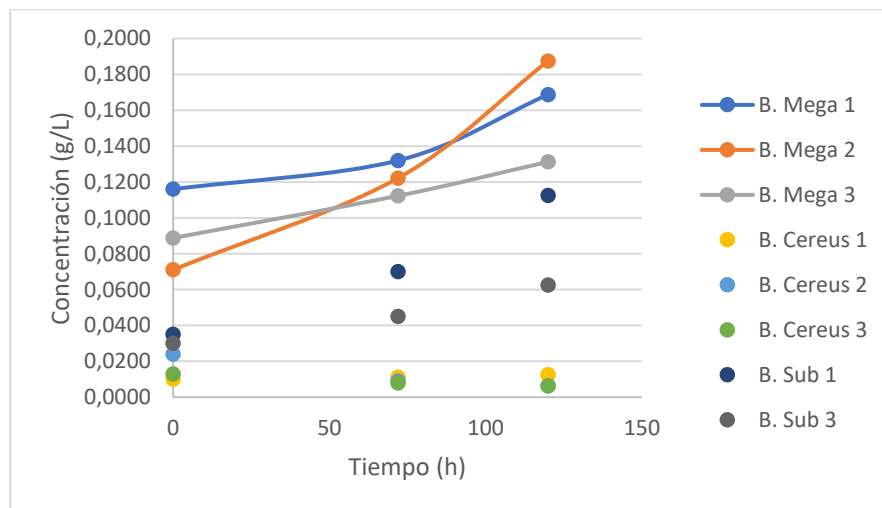
Nota. En la figura se observa la tinción Gram de las bacterias en el medio de adaptación a 35°C y 180 rpm donde a) *Bacillus megaterium* ATCC 14581 b) *Bacillus cereus* ATCC 14579 c) *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

E. Adaptación de las Cepas Bacterianas al Consumo de Glicerina en Medio de Sales

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en un medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina, como siguiente etapa de la adaptación.

Figura 24.

Adaptación de las cepas bacterianas a 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

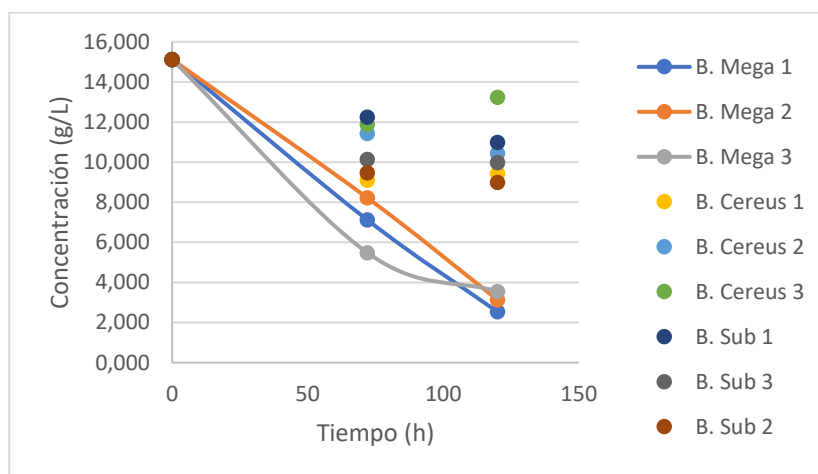


Nota. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579 y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina, como siguiente etapa de la adaptación.

Figura 25.

Consumo de glicerina de las cepas bacterianas en un medio de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

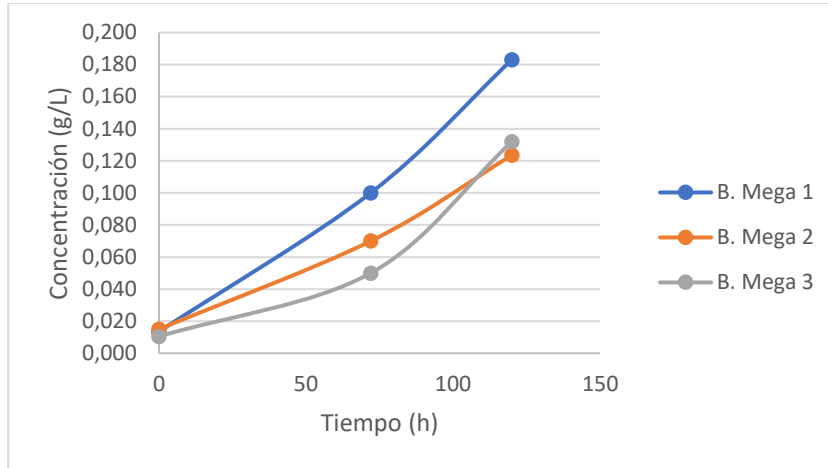


Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581, (B. cereus) *B. cereus* ATCC 14579 y (B. Sub) *B. subtilis* ATCC 6051 en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en un medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina, como segunda etapa de la adaptación al medio específico.

Figura 26.

Adaptación de Bacillus megaterium ATCC 14581 a 20 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

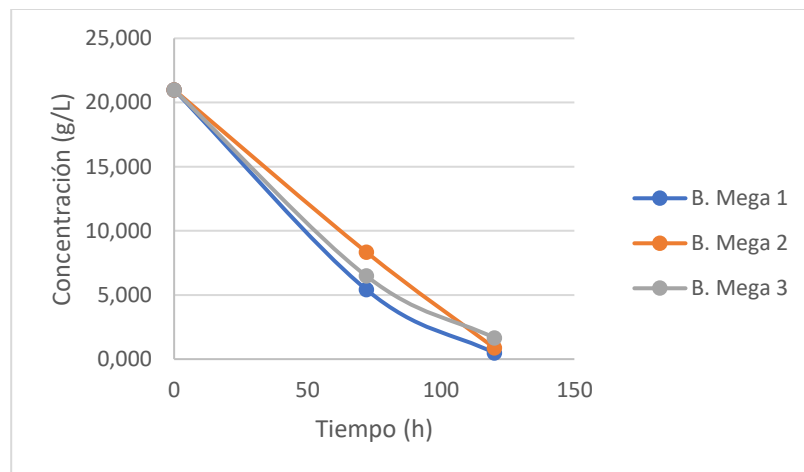


Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina, como segunda etapa de adaptación al medio específico.

Figura 27.

Consumo de glicerina de B. megaterium ATCC 14581 en un medio de 20 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

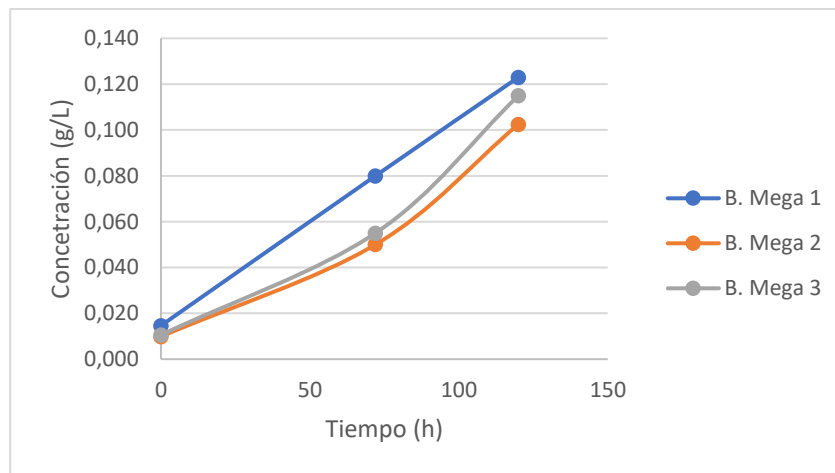


Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el crecimiento bacteriano de las cepas en el medio de sales formulado con 30 g/L de glicerina, como tercera etapa de adaptación al medio específico.

Figura 28.

Adaptación de *Bacillus megaterium* ATCC 14581 a 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

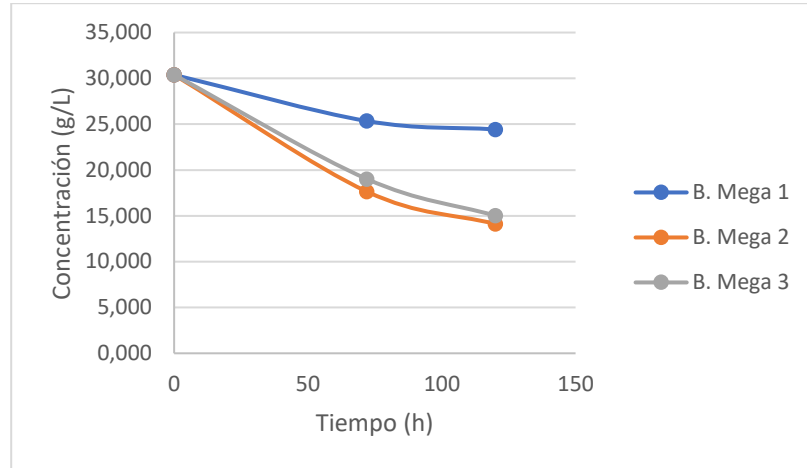


Nota. Las líneas representan la tendencia de datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el crecimiento de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se monitoreó el consumo de la fuente de carbono en el medio de sales formulado con 400 g/L de glicerina, como tercera etapa de adaptación al medio específico.

Figura 29.

Adaptación de Bacillus megaterium ATCC 14581 a 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.



Nota. Las líneas representan la tendencia de los datos generados por Microsoft Excel. En la figura se observa el consumo de glicerina por de (B. Mega) *B. megaterium* ATCC 14581 en triplicado en una fermentación de 125 mL a 35°C y 180 rpm.

Se determinó los rendimientos específicos promedio del crecimiento bacteriano conforme el consumo de la fuente de carbono de las cepas bacterianas.

Tabla 10.

Rendimientos promedio del crecimiento de la biomasa respecto al consumo de la glicerina en un medio de sales.

Cepa bacteriana	Rendimiento $Y_{x/s}$ (g/g)					
	15 (g/L)	\pm (g/g)	20 (g/L)	\pm (g/g)	30 (g/L)	\pm (g/g)
<i>B. megaterium</i>	0.0469	0.0127	0.0532	0.0055	0.0819	0.0261
<i>B. cereus</i>	0.0023	0.00007	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	0.0314	0.0136	-	-	-	-

F. Análisis Estadístico de las Adaptaciones en Medio de Sales

Hipótesis planteadas para la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de sales formulado con glicerina residual de biodiesel.

Tabla 11.

Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de caldo nutritivo.

Hipótesis nula (H_0)	Hipótesis alternativa (H_0)
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	$M_{B. Mega} \neq M_{B. Subtilis} \neq M_{B. Cereus}$

Valor p obtenido del análisis de medias emparejadas biomasa, rendimiento de crecimiento y consumo de sustrato para cada cepa en medio con 15 g/L de glicerina.

Tabla 12.

Valor P de la comparación de medias del aumento de biomasa y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las cepas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento	Valor P del consumo de glicerina	Valor P del rendimiento específico Y_x/s
$M_{B. Mega} = M_{B. Subtilis}$	0.1477	0.0126	0.4231
$M_{B. Mega} = M_{B. Cereus}$	0.0947	0.0118	0.1041
$M_{B. Subtilis} = M_{B. Cereus}$	0.1326	0.5317	0.3881

Hipótesis planteadas para comparar la adaptación de *B. Megaterium* en el medio de sales formulado con diferentes concentraciones fuente de carbono

Tabla 13.

Hipótesis nula y alternativa establecidas para la comparación de medias del aumento de biomasa, consumo de glicerina y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las condiciones carbono nitrógeno evaluadas en el medio de sales (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L).

Hipótesis nula (H_0)	Hipótesis alternativa (H_0)
$M_{15g/L} = M_{20g/L} = M_{30g/L}$	$M_{15g/L} \neq M_{20g/L} \neq M_{30g/L}$

Valor p obtenido del análisis de medias emparejadas del aumento de biomasa, rendimiento de crecimiento y consumo de sustrato para *B. megaterium* en medio de sales con diferentes concentraciones fuente de carbono.

Tabla 14.

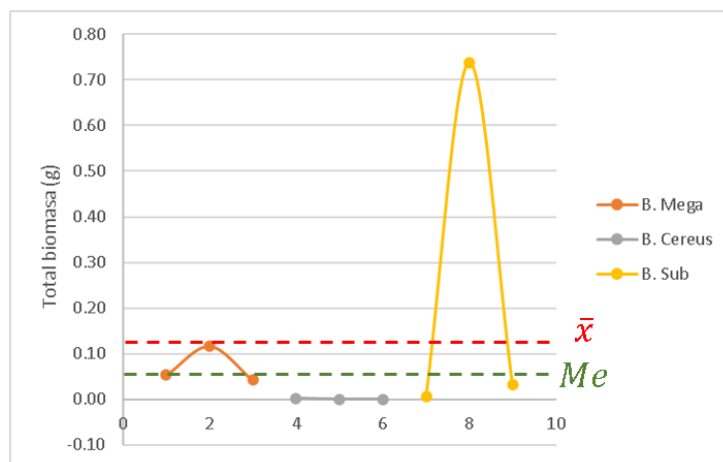
Valor P de la comparación de medias del aumento de biomasa, consumo de glicerina y los rendimientos específicos de crecimiento vs consumo de sustrato para cada una de las condiciones carbono nitrógeno evaluadas en el medio de sales (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L) con una significancia de 0.05 y dos colas.

Hipótesis de comparación entre medias	Valor P del crecimiento	Valor P del consumo de glicerina	Valor P del rendimiento específico YX/S
$M_{15g/L} = M_{20g/L}$	0.2322	0.0002	0.7903
$M_{15g/L} = M_{30g/L}$	0.3754	0.9041	0.4924
$M_{20g/L} = M_{30g/L}$	0.1699	0.0110	0.3767

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina.

Figura 30.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

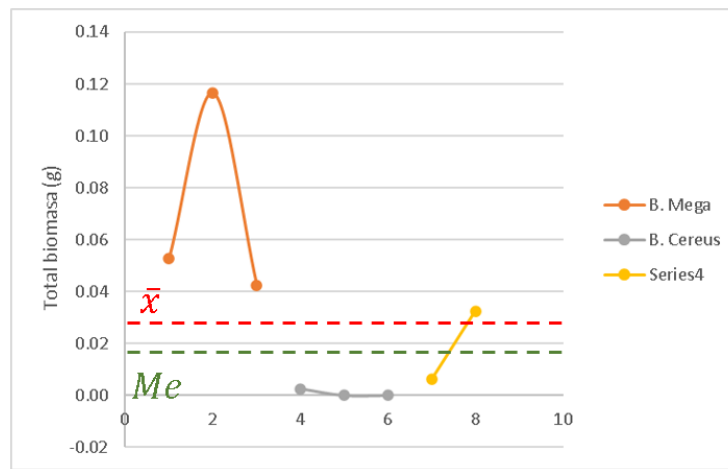


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 15 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de biomasa generada para cada cepa bacteriana evaluada por triplicado en el medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina excluyendo el dato atípico.

Figura 31.

Comparación del peso final de biomasa obtenido de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 15 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales utilizada en el análisis de diferencia de medias.

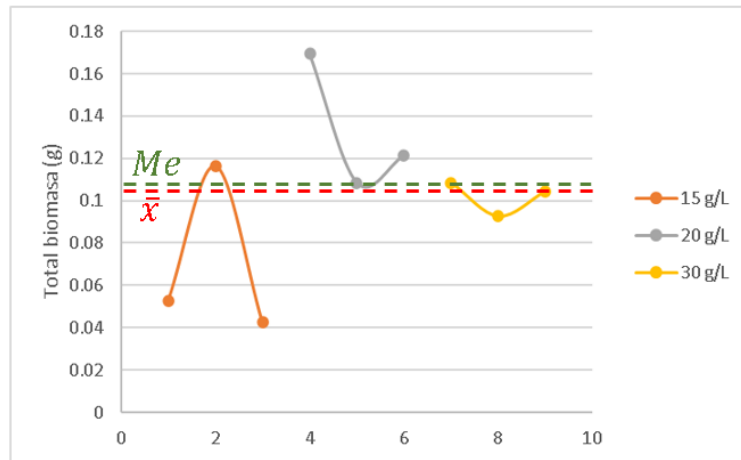


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 15 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C con la omisión del dato atípico de *B. subtilis* ATCC 6051.

Representación gráfica del total de biomasa generada por *B. megaterium* por triplicado en las diferentes concentraciones fuente de carbono.

Figura 32.

Comparación del peso final obtenido de *B. megaterium* ATCC 14581 en la adaptación de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.

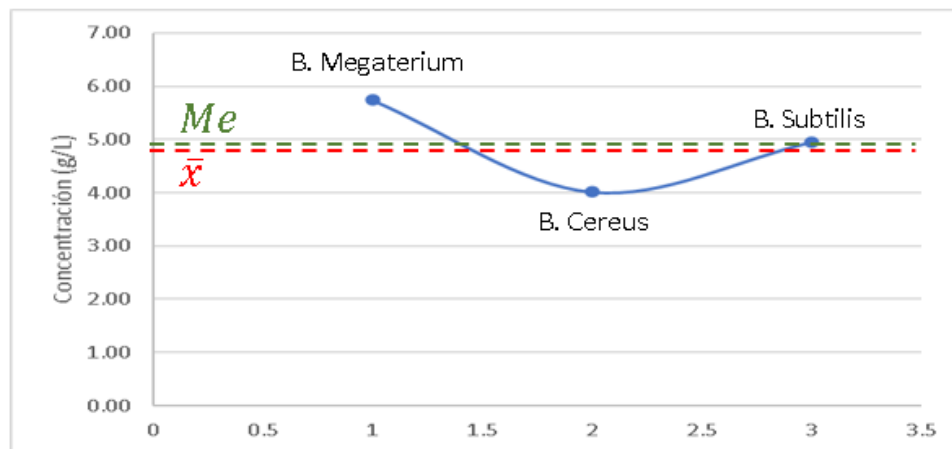


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, en la adaptación de 125 mL con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de glicerina consumida por las cepas bacterianas en el caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina.

Figura 33.

Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 20 g/L en caldo nutritivo.

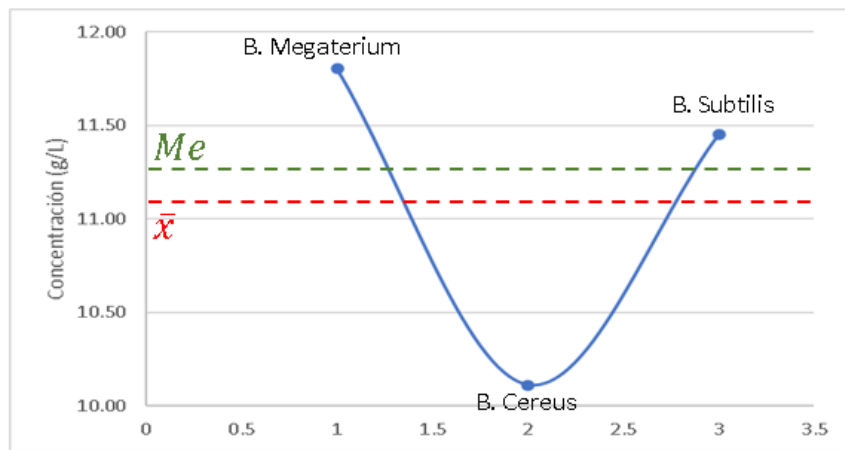


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 20 g/L de glicerina con 180 rpm y 35 °C

Representación gráfica del total de glicerina consumida por las cepas bacterianas en el caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina

Figura 34.

Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 200 g/L en caldo nutritivo.

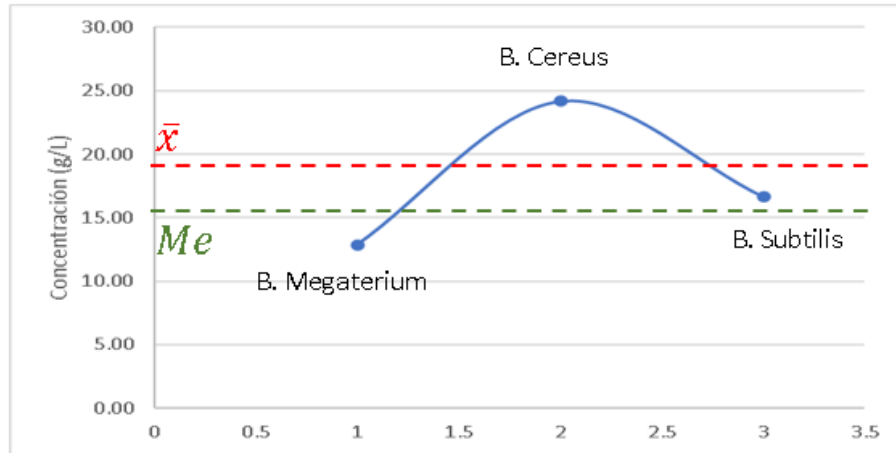


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 200 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C

Representación gráfica del total de glicerina consumida por las cepas bacterianas en el caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina.

Figura 35.

Comparación del consumo total de glicerina de las tres cepas bacterianas en la adaptación de 400 g/L en caldo nutritivo.

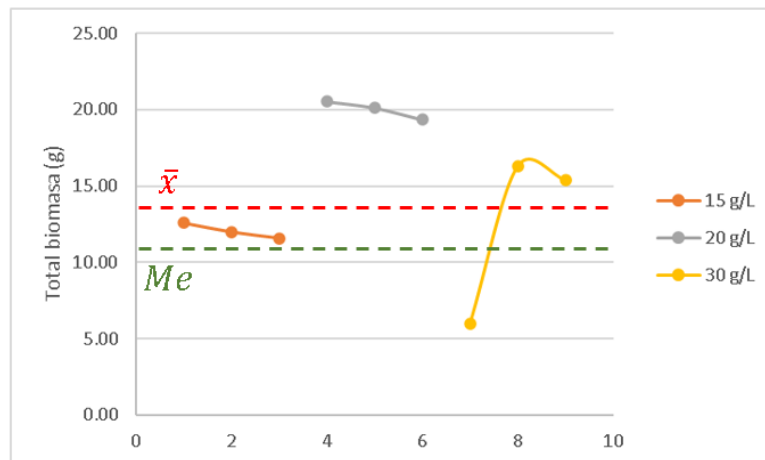


Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las cepas bacterianas, *B. megaterium* ATCC 14581, *B. cereus* ATCC 14579 y *B. subtilis* ATCC 6051 en la adaptación de 400 g/L de glicerina con 180 rpm y 35°C.

Representación gráfica del total de glicerina consumida por *B. megaterium* bacterianas en el caldo nutritivo con en las diferentes concentraciones fuente de carbono evaluadas.

Figura 36.

Comparación de la glicerina final obtenida por *B. megaterium* ATCC 14581 en la adaptación de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina de biodiesel en medio de sales.



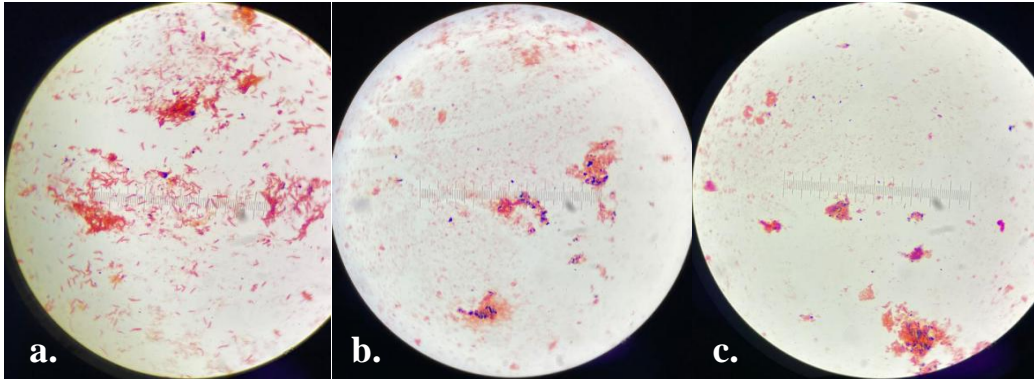
Nota. En la figura se observa la cercanía de la mediana (Me) y la media aritmética (\bar{x}) en la dispersión de los datos correspondientes a las, *B. megaterium* ATCC 14581 en la adaptación de glicerina a diferentes concentraciones con 180 rpm y 35°C

G. Tinción con Negro de Sudán de las Adaptaciones en Medio de Sales

Tinción con negro de Sudán de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación en el medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación.

Figura 37.

Tinción con negro de Sudán de la adaptación de las cepas bacterianas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina en 125 mL.

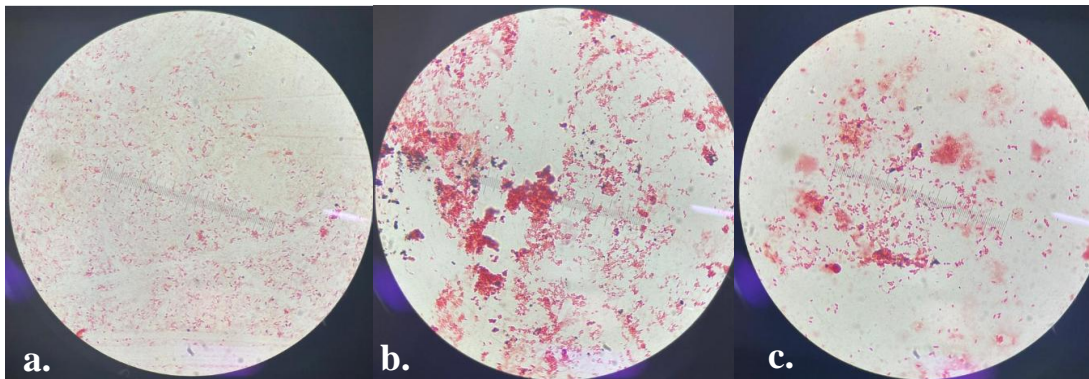


Nota. En la figura se observa la tinción con negro de Sudán de las bacterias en el medio de adaptación a 35 °C y 180 rpm a) *Bacillus megaterium* ATCC14581 (1) b) *Bacillus cereus* ATCC 14579 (1) c) *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (1), los cuales se observaron con el objetivo X100.

Tinción con negro de Sudán de *B. megaterium* en la adaptación en el medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación.

Figura 38.

Tinción con negro de Sudán de la adaptación de Bacillus megaterium ATCC 14581 a la corrida con 20 g/L de glicerina en triplicado

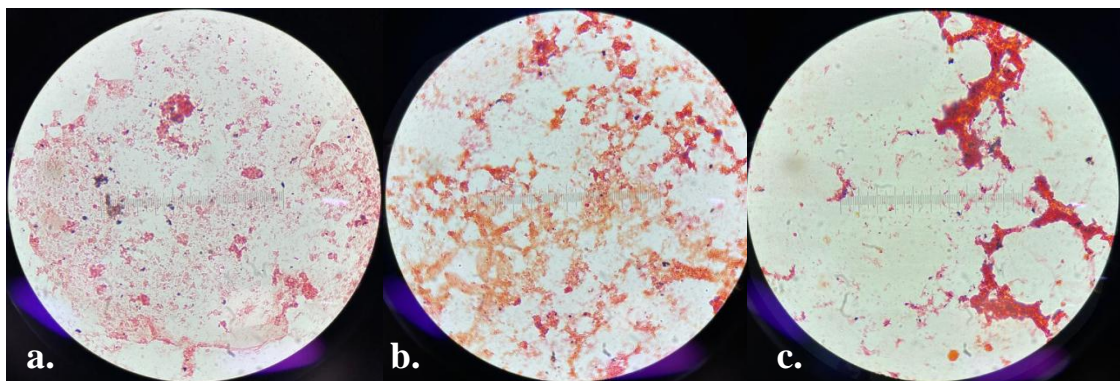


Nota. En la figura se observan la tinción con negro de Sudán de una fermentación a 35 °C y 180 rpm donde a) *B. megaterium* ATCC14581 (1) b) *B. megaterium* ATCC 14581 (2) c) *B. megaterium* ATCC 14581 (3), lo cuales se observaron con el objetivo X100.

Tinción con negro de Sudán de *B. megaterium* en la adaptación en el medio de sales formulado con 30 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación

Figura 39.

Tinción con negro de Sudán de la adaptación de Bacillus megaterium ATCC 14581 a la corrida con 30 g/L de glicerina en triplicado



Nota. En la figura se observan la tinción con negro de Sudán de una fermentación a 35 °C y 180 rpm donde a) *B. megaterium* ATCC 14581 (1) b) *B. megaterium* ATCC 14581 (2) c) *B. megaterium* ATCC 14581 (3), los cuales se observaron con el objetivo X100.

H. Fermentaciones de 1L en el Reactor Sartorius a Diferentes Concentraciones de Glicerina de Biodiesel

Producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Tabla 15.

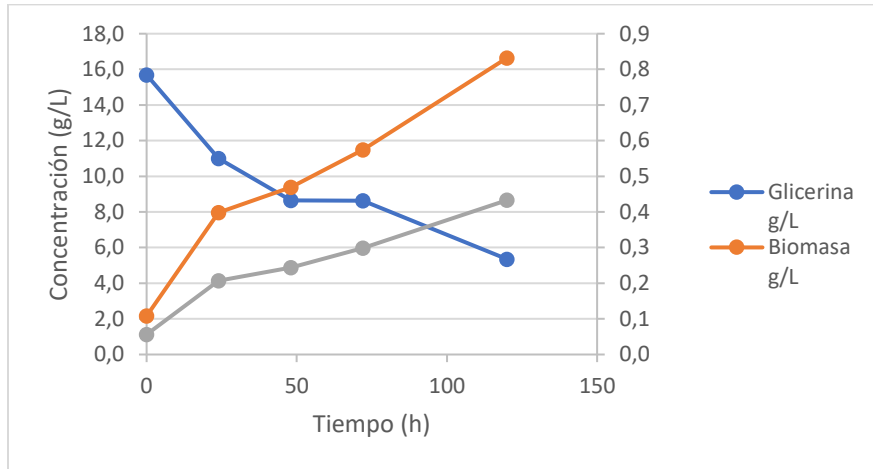
Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de B. megaterium ATCC 14581 con un medio de sales con 15 g/L.

Tiempo ± 0.00083 (h)	Glicerina ± 0.00005 (g/L)	Biomasa ± 0.00007 (g/L)
0	15.6899	0.1080
24	11.0044	0.3985
48	8.6516	0.4688
72	8.6336	0.5743
120	5.3511	0.8321

Representación gráfica de la producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Figura 40.

Consumo de glicerina conforme el crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de sales con glicerina a 15 g/L.

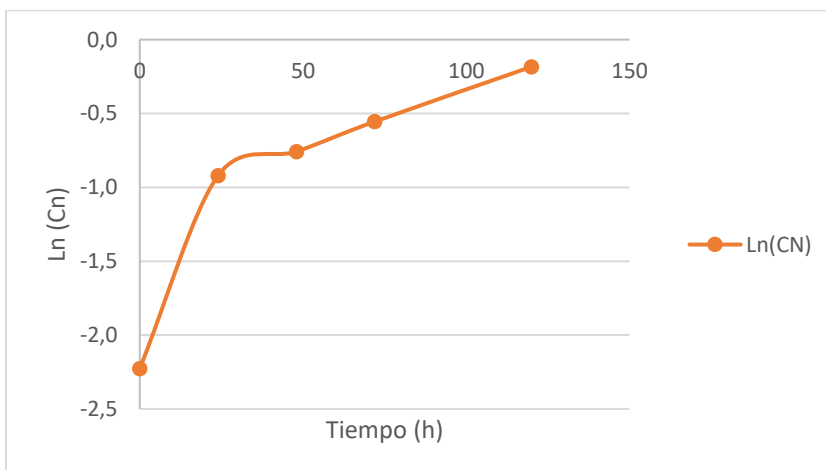


Nota. En la figura se observa el consumo de glicerina, producción de PHA y aumento de biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Tendencia de crecimiento de *B. megaterium* conforme el tiempo en un medio de sales con glicerina 15g/L

Figura 41.

Logaritmo natural del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 15 g/L.

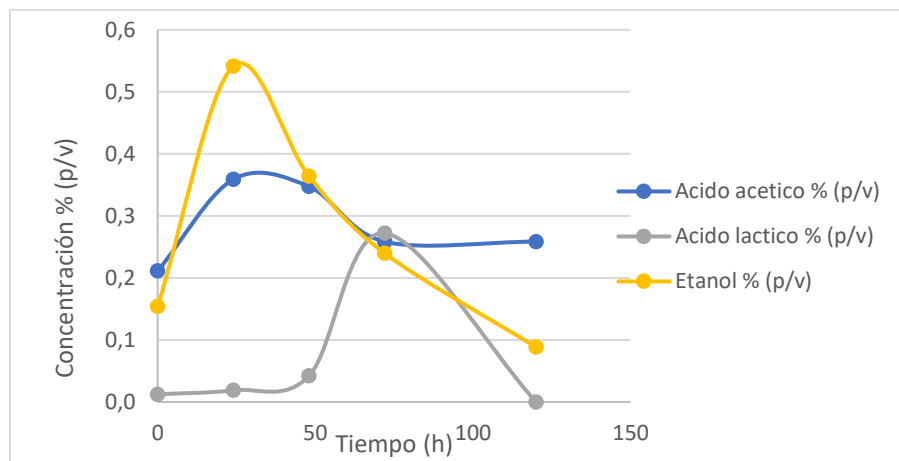


Nota. En la figura se observa la tendencia del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 conforme el transcurso del tiempo en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Generación y consumo de sub productos durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina.

Figura 42.

Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol en la fermentación con 15 g/L de glicerina.



Nota. En la figura se observa el consumo y producción de los sub productos de la fermentación en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Tabla 16.

Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de B. con un medio de sales con 20 g/L.

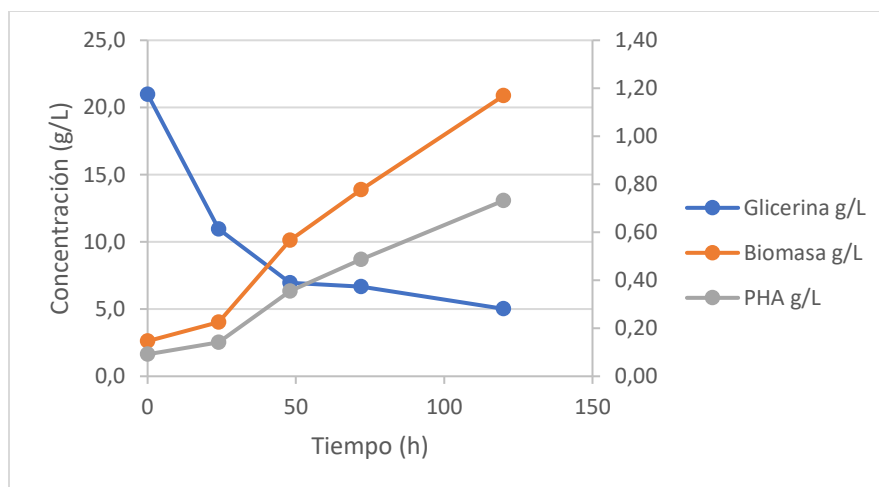
Tiempo ± 0.00083 (h)	Glicerina ± 0.00005 (g/L)	Biomasa ± 0.00007 (g/L)
0	20.9858	0.1464
24	10.9454	0.2251
48	6.9523	0.5672

Tiempo ± 0.00083 (h)	Glicerina ± 0.00005 (g/L)	Biomasa ± 0.00007 (g/L)
72	6.6650	0.7773
120	5.0192	1.1689

Representación gráfica de la producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Figura 43.

Consumo de glicerina conforme el crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de glicerina de 20 g/L.

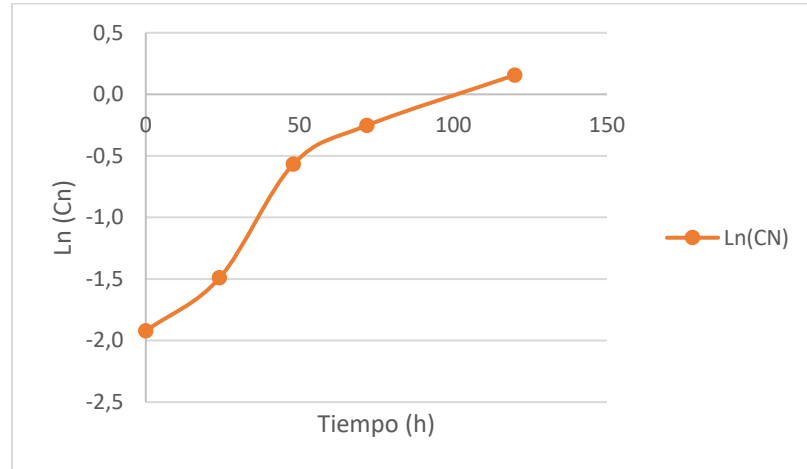


Nota. En la figura se observa el consumo de glicerina, producción de PHA y aumento de biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Tendencia de crecimiento de *B. megaterium* conforme el tiempo en un medio de sales con glicerina 20g/L.

Figura 44.

Logaritmo natural del crecimiento de B. megaterium ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 20 g/L

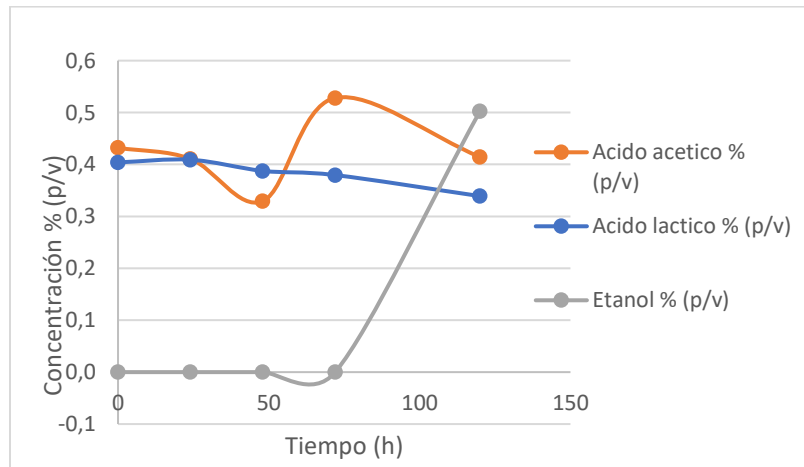


Nota. En la figura se observa la tendencia del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 conforme el transcurso del tiempo en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Generación y consumo de sub productos durante la fermentación de *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina.

Figura 45.

Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol durante la fermentación de 20 g/L de glicerina.



Nota. En la figura se observa el consumo y producción de los sub productos de la fermentación en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Tabla 17.

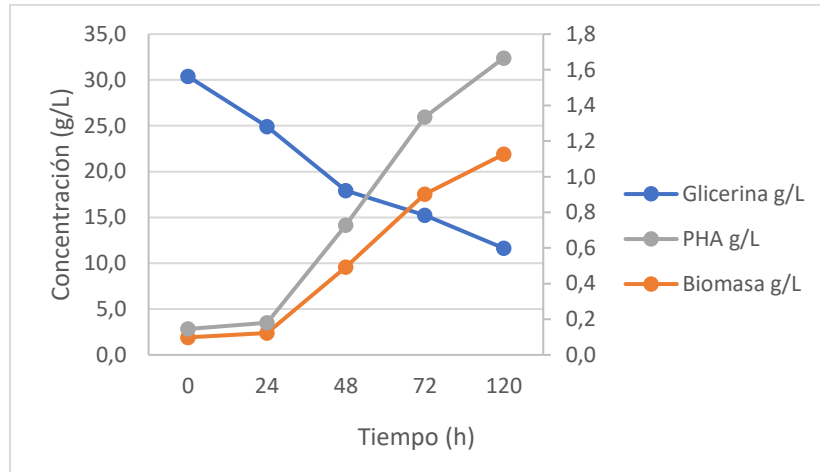
Consumo de glicerina conforme aumenta el crecimiento celular de B. megaterium ATCC 14581 con un medio de sales con 30 g/L.

Tiempo ± 0.00083 (h)	Glicerina ± 0.00005 (g/L)	Biomasa ± 0.00007 (g/L)
0	30.3826	0.0984
24	24.9225	0.1222
48	17.9348	0.4922
72	15.2447	0.9020
120	11.6348	1.1258

Representación gráfica de la producción de PHA conforme el crecimiento de *B. megaterium* y el consumo de la fuente de carbono durante la fermentación (120 h).

Figura 46.

Consumo de glicerina conforme el crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 y la producción de PHA con un medio de glicerina de 30 g/L.

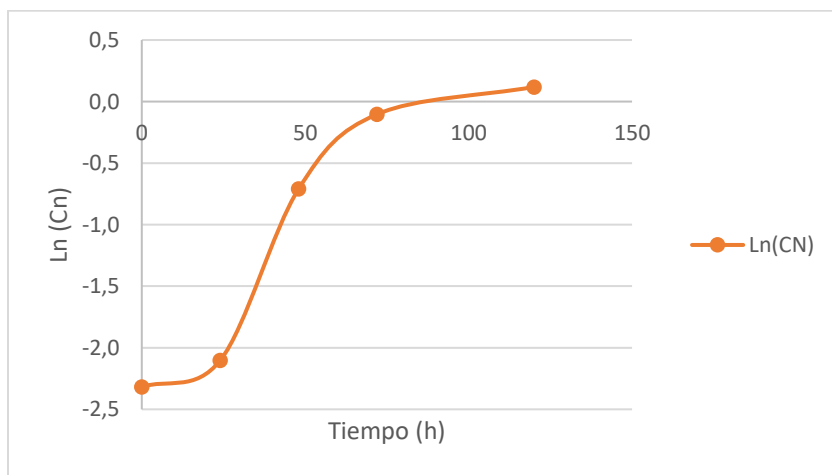


Nota. En la figura se observa el consumo de glicerina, producción de PHA y aumento de biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Tendencia de crecimiento de *B. megaterium* conforme el tiempo en un medio de sales con glicerina 30 g/L

Figura 47.

Logaritmo natural del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 vs tiempo con un medio de glicerina de 30 g/L.

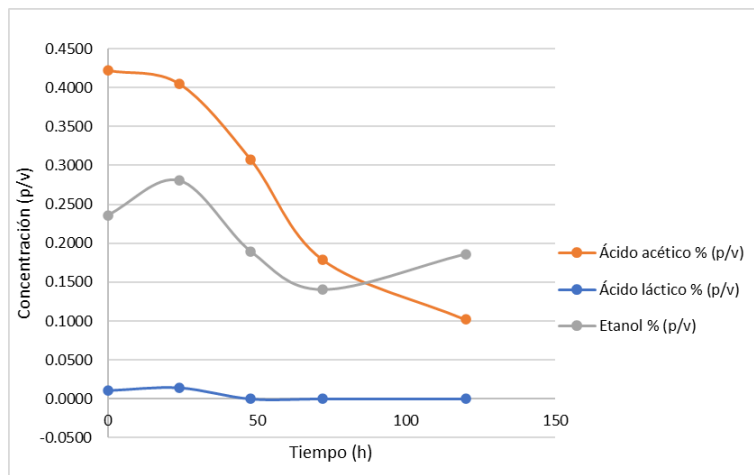


Nota. En la figura se observa la tendencia del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 conforme el transcurso del tiempo en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Generación y consumo de sub productos durante la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina.

Figura 48.

Consumo y producción de ácido acético, ácido láctico y etanol durante la fermentación de 30 g/L.



Nota. En la figura se observa el consumo y producción de los sub productos de la fermentación en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Rendimientos específicos de generación de biomasa conforme el consumo de sustrato, generación de PHA conforme el aumento de biomasa y generación de PHA conforme el consumo de sustrato.

Tabla 18.

Rendimientos específicos de las tres fermentaciones de 1 L con diferentes concentraciones de glicerina.

Glicerina ± 0.00005 (g/L)	Y X/S (g/g)	Y X/S ± (g/g)	Y P/X (g/g)	Y P/S (g/g)	Y P/S ± (g/g)
15	0.0568	0.0117	0.5203	0.0296	0.0061
20	0.1105	0.0552	0.6262	0.0692	0.0346
30	0.0891	0.0259	0.4798	0.0428	0.0124

Parámetros cinéticos utilizados para plantear el modelo de crecimiento durante la fermentación de *B. megaterium* para las 3 concentraciones evaluadas (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L).

Tabla 19.

PHA producido durante cada día de la fermentación de 1 L con diferentes concentraciones de glicerina obtenido a través del rendimiento $Y_{p/x}$ final.

Tiempo ± 0.00083 (h)	PHA (g/L) en 15 g/L	PHA \pm (g/L)	PHA (g/L) en 20 g/L	PHA \pm (g/L)	PHA (g/L) en 30 g/L	PHA \pm (g/L)
0	0.0562	0.0001	0.0917	0.0001	0.0472	0.0001
24	0.2073	0.0003	0.1410	0.0001	0.0586	0.0001
48	0.2439	0.0003	0.3552	0.0003	0.2362	0.0003
72	0.2988	0.0004	0.4868	0.0004	0.4328	0.0005
120	0.4329	0.0005	0.7320	0.0005	0.5402	0.0005

I. Modelo Cinético del Crecimiento de *B. Megaterium* ATCC 14581

La Ecuación 8, muestra la velocidad de crecimiento de Monod

$$\mu = \mu_{max} * \left(\frac{S-S_m}{(S-S_m)+K_s} \right) \quad (8)$$

Esta ecuación se utilizó para realizar el modelo cinético del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581. Donde S es la concentración del sustrato en (g/L), S_m es la concentración final del sustrato obtenida experimentalmente en (g/L). K_s es la constante de afinidad al sustrato en (g/L) y μ_{max} es la velocidad específica máxima en (h^{-1}).

En la Ecuación 9, de la velocidad de crecimiento de biomasa. Se utilizó para realizar el modelo cinético del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581, donde Cn es la concentración de biomasa en (g/L).

$$rx = Cn * \mu \quad (9)$$

Con la Ecuación 10, en la que se muestra la velocidad de consumo de sustrato Esta ecuación se utilizó para realizar el modelo cinético del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581, donde K es la constante de mantenimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 en (g/L).

$$rs = Cn * \left(\frac{\mu}{Y_{xs}+K} \right) \quad (10)$$

Referente a la Ecuación 11, diferencial del consumo de sustrato a partir de *B. megaterium* ATCC 14581. Esta ecuación se utilizó para plantear el consumo de sustrato conforme el tiempo en el modelo cinético del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581

$$\frac{d}{dt}(S) = -rs \quad (11)$$

Por su parte, Ecuación 12, diferencial del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581 en función del tiempo. Esta ecuación se utilizó para plantear el aumento de biomasa conforme el tiempo en el modelo cinético del crecimiento de *B. megaterium* ATCC 14581.

$$\frac{d}{dt}(Cn) = rx \quad (12)$$

Parámetros cinéticos obtenidos en el modelo de crecimiento durante la fermentación de *B. megaterium* para las 3 concentraciones evaluadas (15 g/L, 20 g/L y 30 g/L).

Tabla 20.

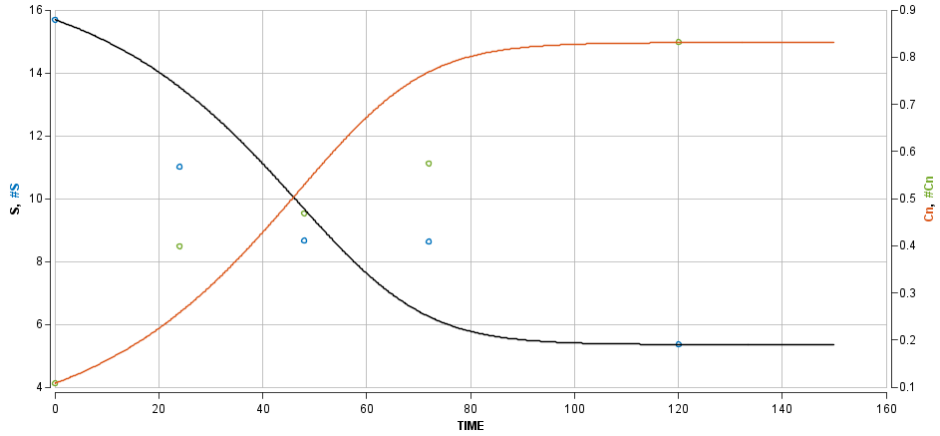
Constantes y valores utilizados para la elaboración del modelo cinético para cada una de las concentraciones de glicerina de las fermentaciones de 1 L con B. megaterium ATCC 14581.

Parámetro	15 (g/L)	20 (g/L)	30 (g/L)
μ_{max} (h^{-1})	0.031	14.815	0.003
Ks (g/L)	0.316	92.187	0.195
Yx/s (g/g)	0.057	0.111	0.089
Sm (g/L)	5.351	5.019	11.635
K (g/L)	0.123	0.123	0.123
INIT S (g/L)	15.689	20.986	30.383
INIT Cn (g/L)	0.108	0.146	0.098

Modelo cinético obtenido a partir del aumento de biomasa y consumo de sustrato durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina

Figura 49.

Modelo cinético del crecimiento de B. megaterium ATCC 14581 en el medio formulado con 15 g/L de glicerina de biodiesel.

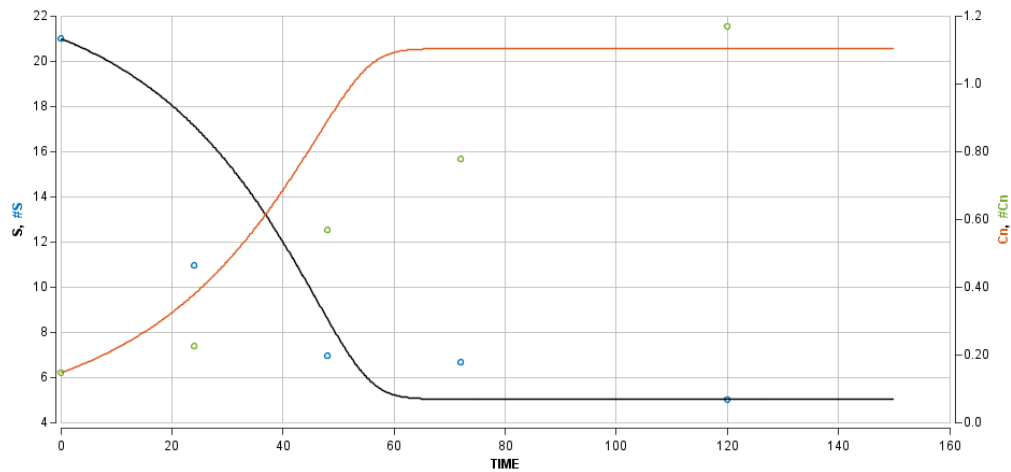


Nota. En la figura se observa el crecimiento experimental de *B. megaterium* ATCC 14581 (Cn) con los puntos verdes y el crecimiento generado por el modelo con la línea naranja. Los puntos azules representan los datos de consumo de sustrato (S) obtenidos experimentalmente y la línea negra el consumo de glicerina generado por el modelo cinético elaborado en Berkeley.

Modelo cinético obtenido a partir del aumento de biomasa y consumo de sustrato durante la fermentación de *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina.

Figura 50.

Modelo cinético del crecimiento de B. megaterium ATCC 14581 en el medio formulado con 20 g/L de glicerina de biodiesel.

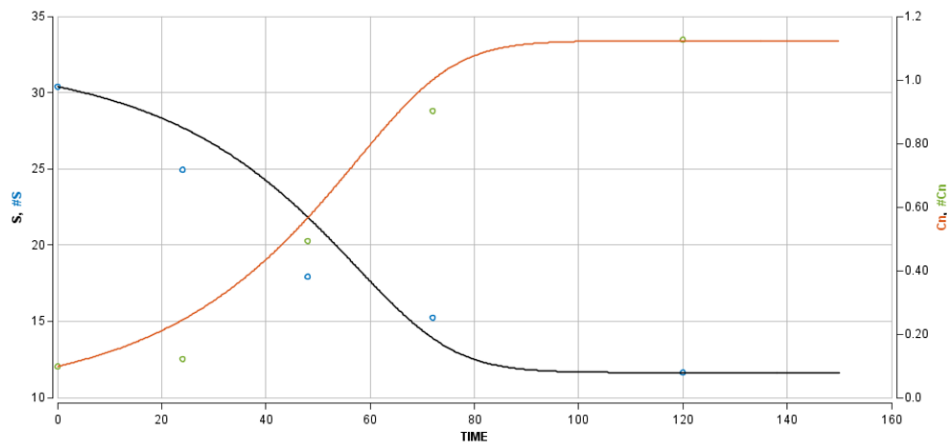


Nota. En la figura se observa el crecimiento experimental de *B. megaterium* ATCC 14581 (Cn) con los puntos verdes y el crecimiento generado por el modelo con la línea naranja. Los puntos azules representan los datos de consumo de sustrato (S) obtenidos experimentalmente y la línea negra el consumo de glicerina generado por el modelo cinético elaborado en Berkeley.

Modelo cinético obtenido a partir del aumento de biomasa y consumo de sustrato durante la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina

Figura 51.

Modelo cinético del crecimiento de B. megaterium ATCC 14581 en el medio formulado con 30 g/L de glicerina de biodiesel.



Nota. En la figura se observa el crecimiento experimental de *B. megaterium* ATCC 14581 (Cn) con los puntos verdes y el crecimiento generado por el modelo con la línea naranja. Los puntos azules representan los datos de consumo de sustrato (S) obtenidos experimentalmente y la línea negra el consumo de glicerina generado por el modelo cinético elaborado en Berkeley.

Tabla 21.

Valores obtenidos del modelo cinético elaborado en Berkeley de los parámetros cinéticos para cada una de las concentraciones de glicerina de las fermentaciones de 1 L con B. megaterium ATCC 14581.

Parámetro	15 (g/L)	20 (g/L)	30 (g/L)
μ_{max} (h^{-1})	0.0633	0.0450	0.0532
Ks (g/L)	6.9894	1.9759	6.9907
Yx/s (g/g)	0.0439	0.0500	0.0364

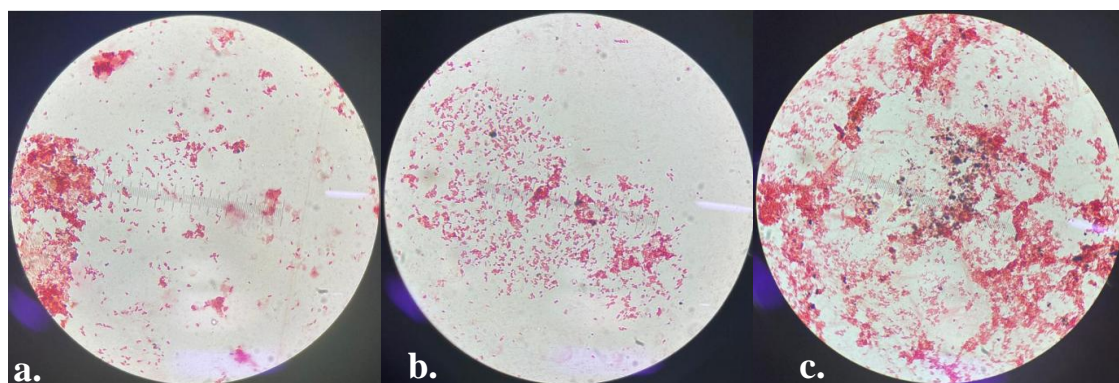
Parámetro	15 (g/L)	20 (g/L)	30 (g/L)
K (g/L)	0.026	0.0099	0.0183

J. Tinción con Negro de Sudán Corridas 1 L

Tinción con negro de Sudán de *B. megaterium* para la fermentación en el medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación.

Figura 52.

Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de Bacillus megaterium ATCC 14581 con 15 g/L de glicerina.

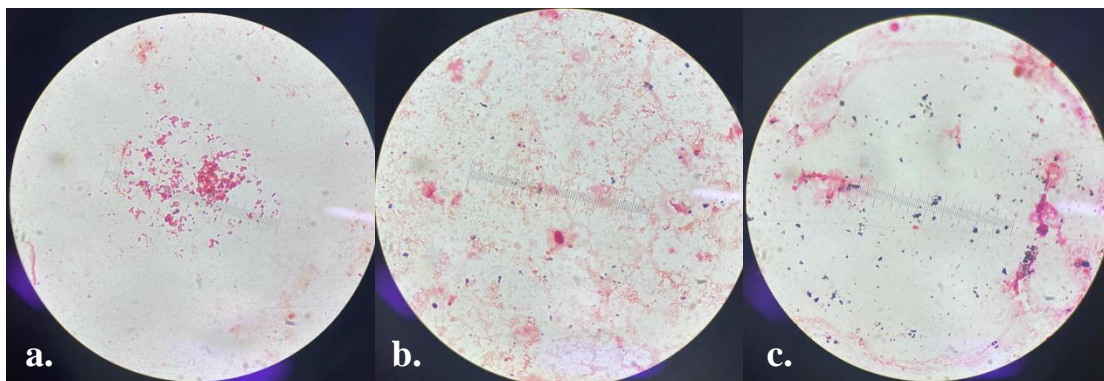


Nota. En la figura se observa la tinción con negro de Sudán de la fermentación a 35°C, 180 rpm, 0.3 L/min y un pH de 7 donde a) corresponde al primer día de la fermentación b) tercer día de la fermentación c) quinto día de fermentación.

Tinción con negro de Sudán de *B. megaterium* para la fermentación en el medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación.

Figura 53.

Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de Bacillus megaterium ATCC 14581 con 20g/L de glicerina.

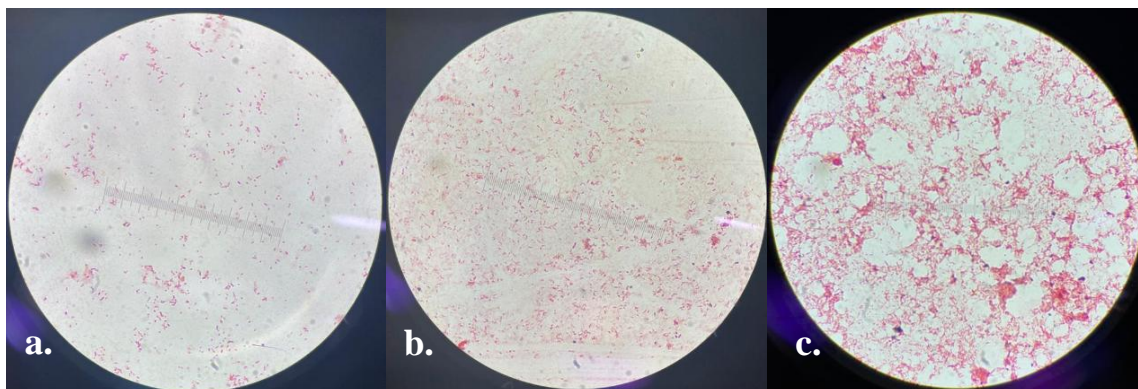


Nota. En la figura se observa la tinción con negro de Sudán de la fermentación a 35°C, 180 rpm, 0.3 L/min y un pH de 7 donde a) corresponde al primer día de la fermentación b) tercer día de la fermentación c) quinto día de fermentación.

Tinción con negro de Sudán de *B. megaterium* para la fermentación en el medio de sales formulado con 30 g/L de glicerina para evaluar la presencia de PHA en las bacterias durante la fermentación.

Figura 54.

Tinción con negro de Sudán de la fermentación 1 de Bacillus megaterium ATCC 14581 con 30 g/L de glicerina.



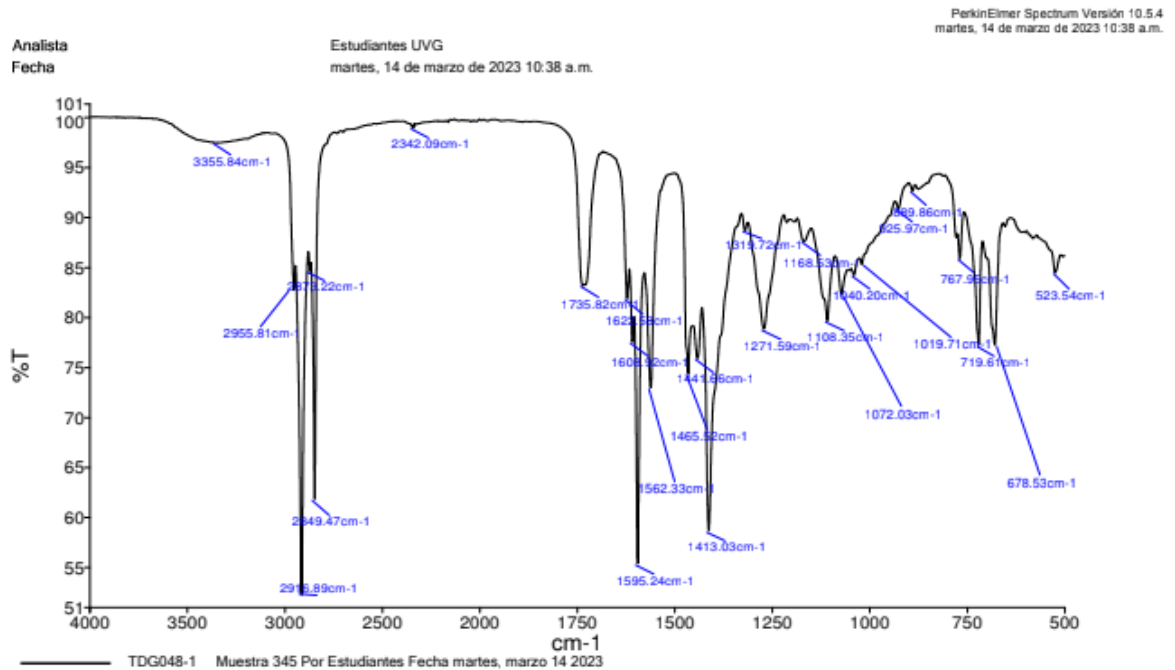
Nota. En la figura se observa la tinción con negro de Sudán de la fermentación a 35°C, 180 rpm, 0.3 L/min y un pH de 7 donde a) corresponde al primer día de la fermentación b) tercer día de la fermentación c) quinto día de fermentación.

K. Espectro IR del PHA Extraído de *B. Megaterium* ATCC 14581

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina

Figura 55.

Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de *B megaterium* ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 15 g/L.

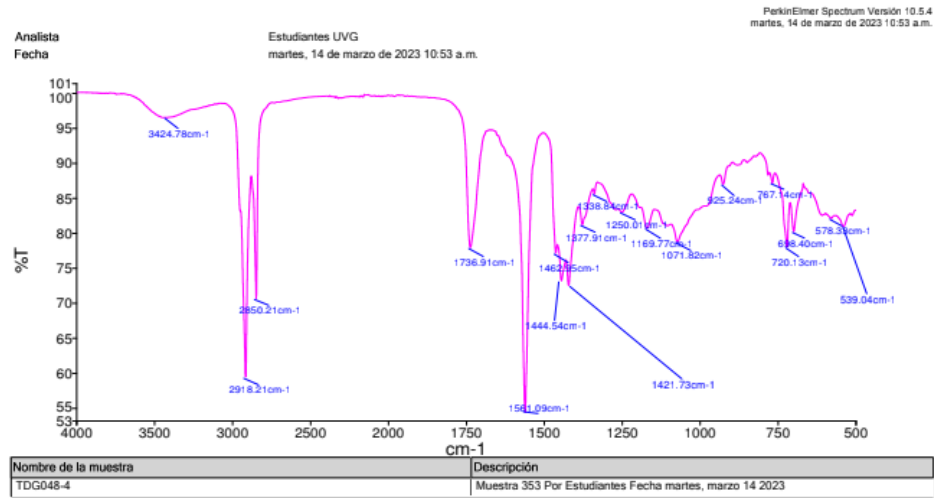


Nota. En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido en la fermentación de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina

Figura 56.

Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de *B megaterium* ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 20 g/L.

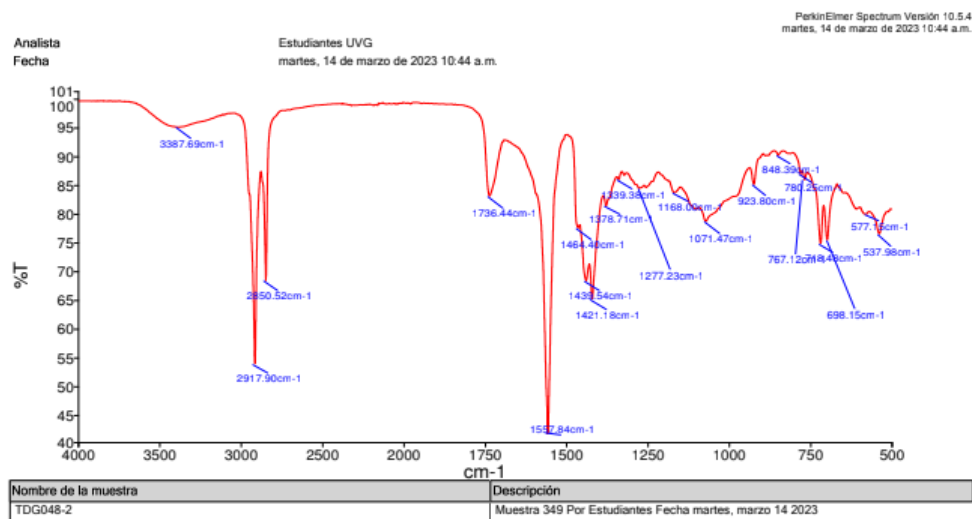


Nota. En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido en la fermentación de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina

Figura 57

Espectro IR del PHA obtenido de la fermentación de *B megaterium* ATCC 14581 en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 30 g/L.

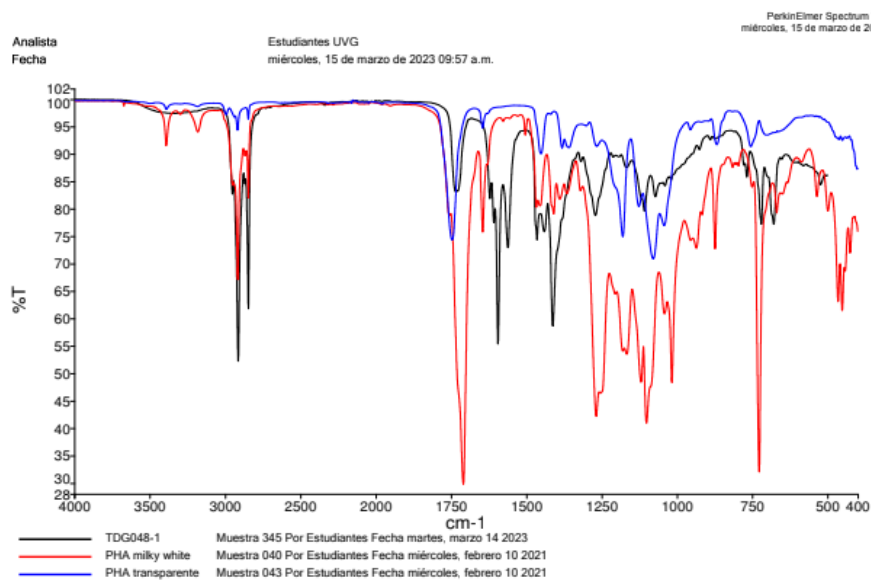


Nota. En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido en la fermentación de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7.

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina en comparación con muestras de PHA Milky white y transparente de la Universidad del Valle de Guatemala

Figura 58.

Sobreposición de PHA en Espectro IR del producto obtenido de la fermentación de *B. megaterium* en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 15 g/L.

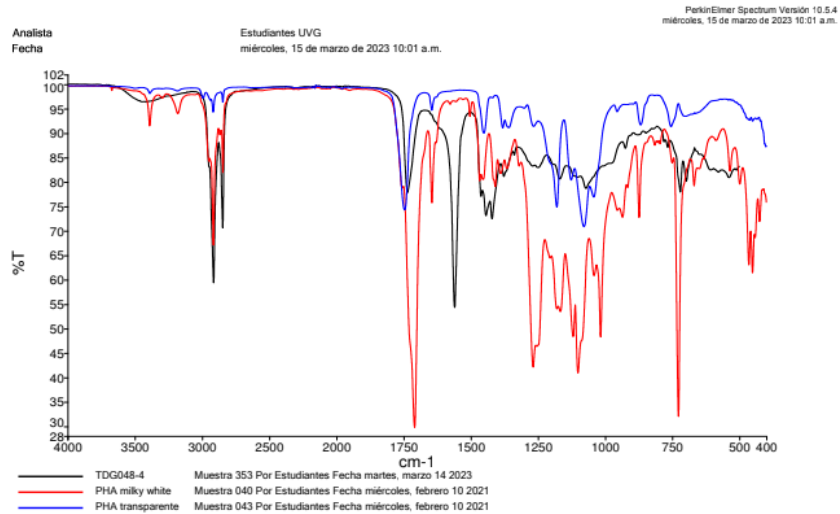


Nota. En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido de la fermentación con 15 g/L de glicerina sobrepuesto con 2 diferentes estándares de PHA proporcionados por la Universidad del Valle de Guatemala.

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina en comparación con muestras de PHA Milky white y transparente de la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 59.

Sobreposición de PHA en Espectro IR del producto obtenido de la fermentación de *B megateirum* en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 20 g/L.

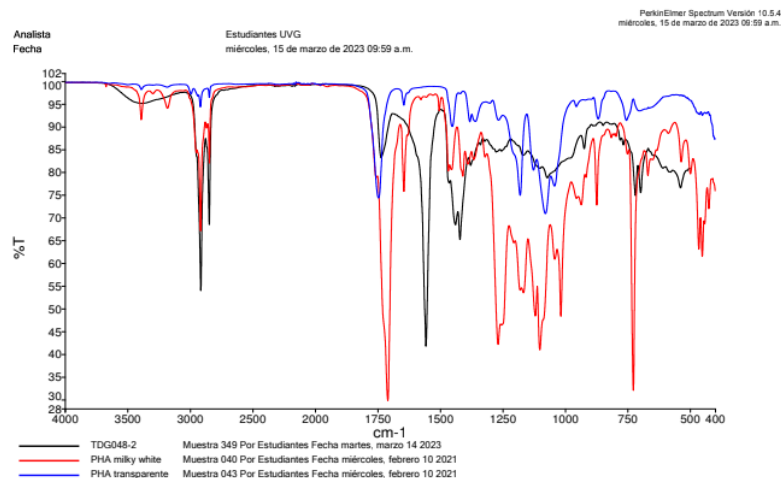


Nota. En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido de la fermentación con 20 g/L de glicerina sobrepuesto con dos diferentes estándares de PHA proporcionados por la Universidad del Valle de Guatemala.

Análisis de espectroscopia infrarroja de PHA obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina en comparación con muestras de PHA Milky white y transparente de la Universidad del Valle de Guatemala.

Figura 60.

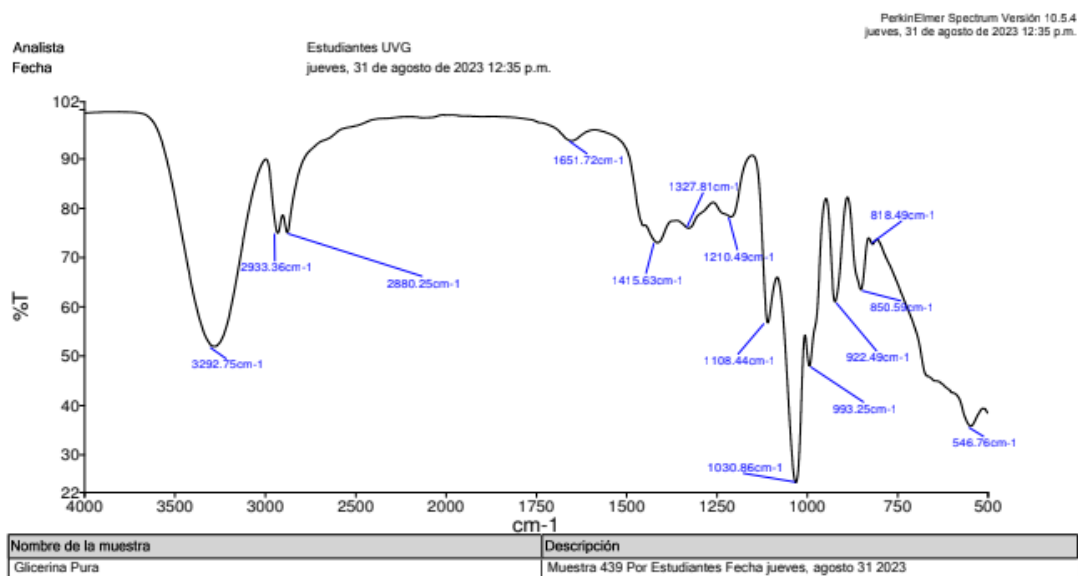
Sobreposición de PHA en espectro IR del producto obtenido de la fermentación de *B megateirum* en un medio de sales con glicerina de biodiesel a 30 g/L.



En la figura se muestra el espectro IR del producto obtenido de la fermentación con 20 g/L de glicerina sobrepuesto con 2 diferentes estándares de PHA proporcionados por la Universidad del Valle de Guatemala. Análisis de espectroscopia infrarroja de una muestra de glicerina con 98% de pureza.

Figura 61.

Espectro IR de una muestra de glicerina con 98% de pureza.

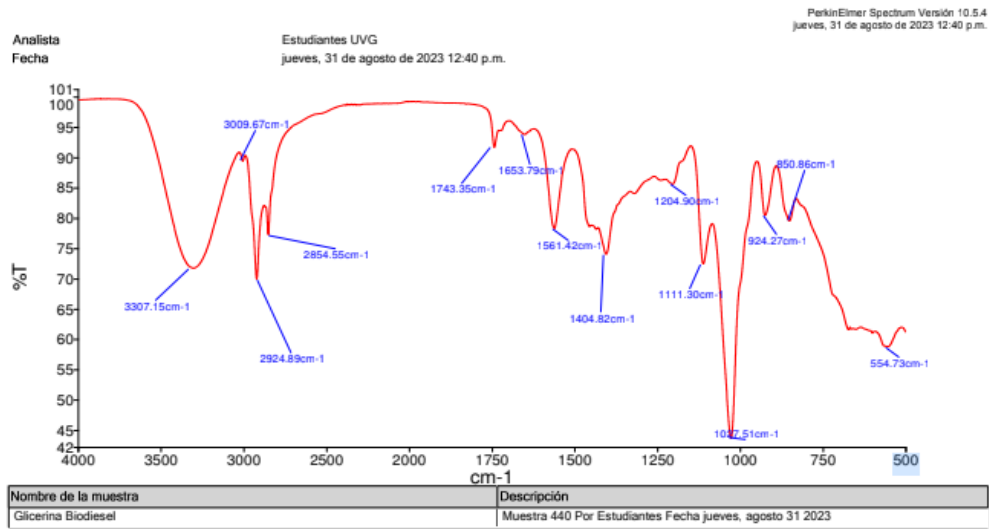


Nota. En la figura se muestra el espectro IR de glicerina refinada con un 98% de pureza. Esta glicerina no fue utilizada en ninguna fermentación.

Análisis de espectroscopia infrarroja de la muestra de glicerina residual del proceso de biodiésel utilizada durante el estudio

Figura 62.

Espectro IR de la glicerina procedente del proceso de producción de biodiesel.

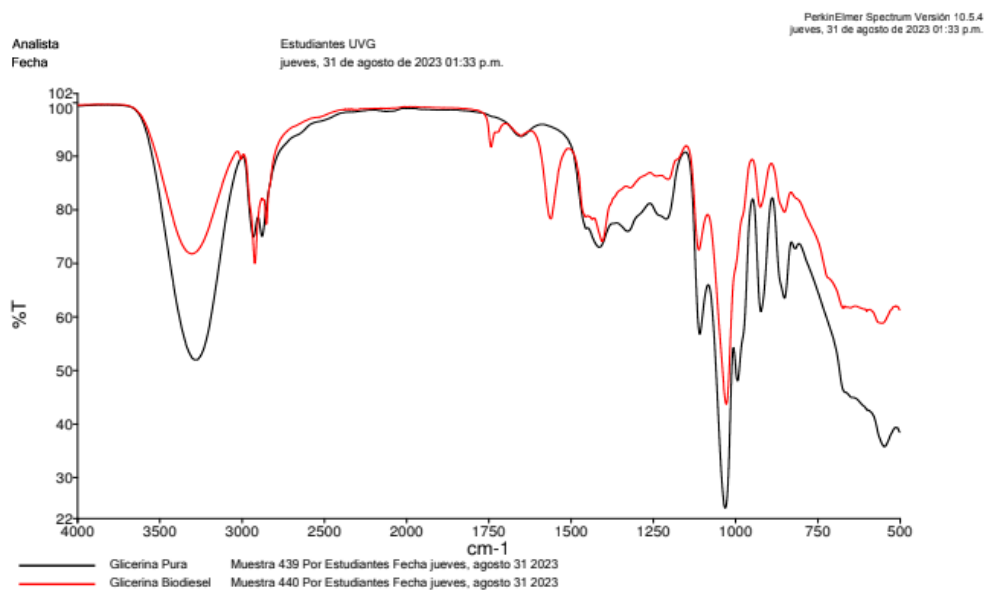


Nota. En la figura se observa el espectro IR de la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel, la cual se utilizó en las adaptaciones de glicerina y en las fermentaciones para producir PHA.

Análisis de espectroscopia infrarroja de glicerina residual del proceso de biodiesel utilizada durante la fermentación de *B. megaterium* en comparación con muestras de glicerina con 98% de pureza

Figura 63.

Sobreposición del espectro IR de la glicerina residual del biodiesel con la glicerina de 98% de concentración.

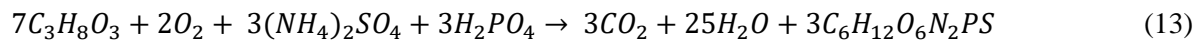


Nota. En la figura se observa la sobreposición de la glicerina refinada con 98% de pureza, la cual corresponde al color negro, con la glicerina residual del proceso de producción de la glicerina utilizada en las adaptaciones y en las fermentaciones para la producción de PHA que corresponde al color rojo.

L. Balance de Masa de la Reacción

La ecuación muestra la reacción estequiométrica aeróbica de la fermentación con glicerina como principal fuente de carbono, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y el fósforo para formar dióxido de carbono, agua y el aumento de biomasa con la fórmula elemental de *B. megaterium* ATCC 14581, la cual es una aproximación para simplificar el microorganismo *B. megaterium*, a partir de los carbohidratos esenciales de lo que se encuentran conformadas sus células, los cuales son carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. En general la fórmula elemental de un microorganismo es aproximadamente $C_4H_7O_2N$ debido a que los componentes de las células son; carbono el cual representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno un 32%, nitrógeno un 14%, fósforo en 3% y azufre en 1% (Ramírez, 2016 & Nishihara, 1980)

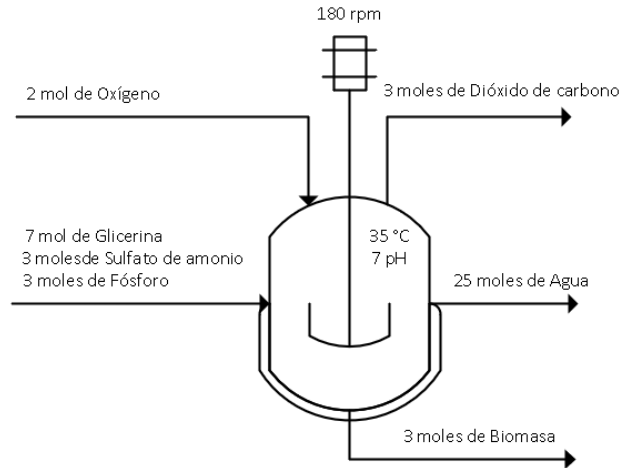
En la ecuación 13, de la Estequiometría se muestra de la reacción de producción de PHA a partir de glicerina proveniente de biodiesel, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a partir de *B. megaterium* ATCC 14581.



Balance molar de los sustratos utilizados y los productos y Sub productos obtenidos generados durante la fermentación

Figura 64.

Balance molar de la reacción estequiométrica aeróbica con *B. megaterium* ATCC 14581.

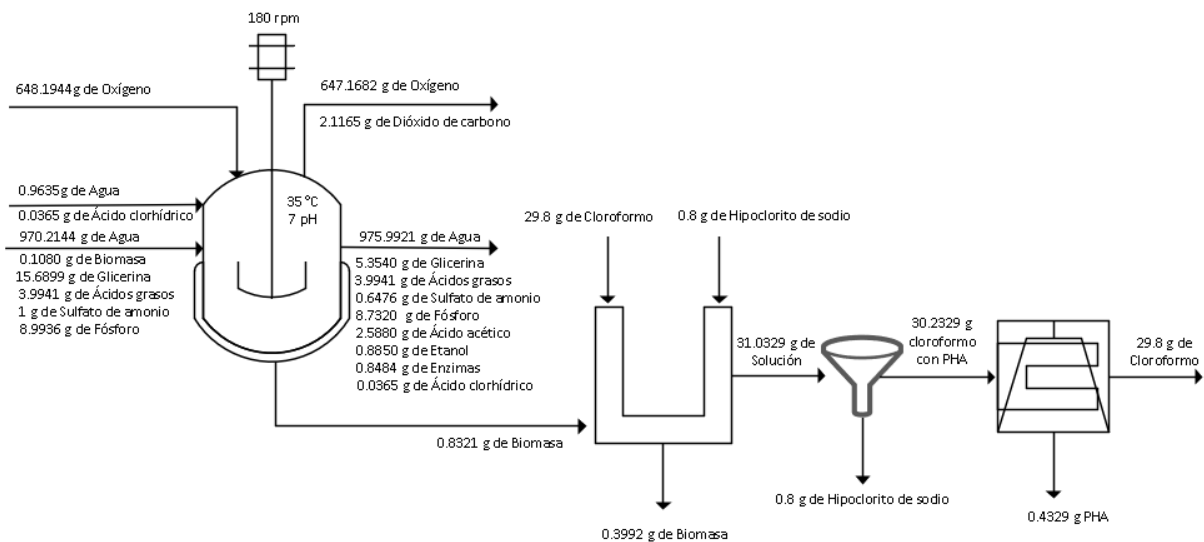


Nota. La figura muestra el balance de los moles correspondientes a los reactantes: oxígeno, glicerina, sulfato de amonio y el fósforo para tomar agua, dióxido de carbono y biomasa.

Balance de masa de los reactivos utilizados y los productos y Sub productos obtenidos generados durante la fermentación *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina.

Figura 65.

Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de *B. megaterium* ATCC 14581 con 15 g/L de glicerina.

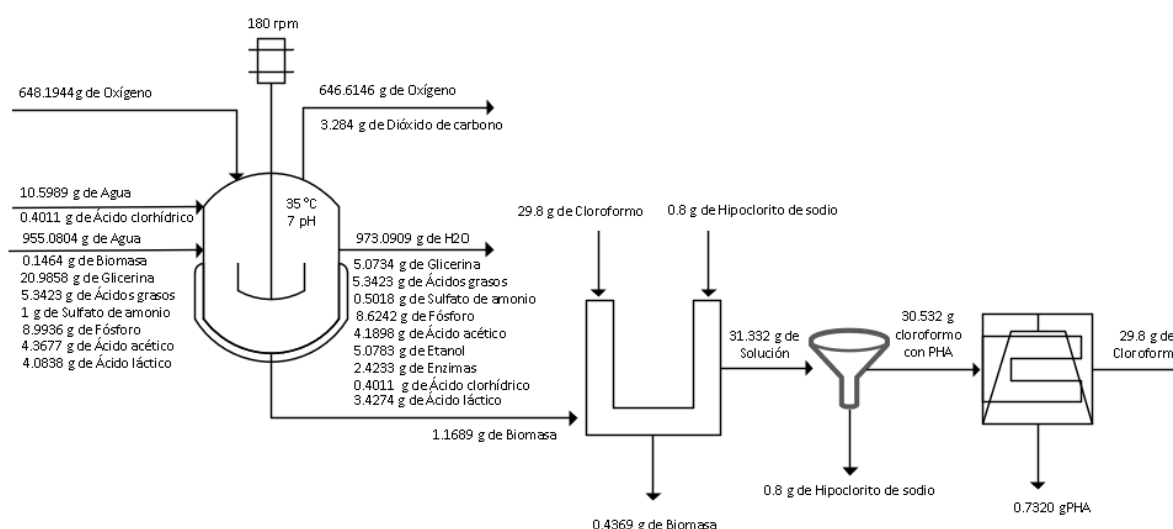


Nota. En la figura se observa el balance de masa entre los reactantes que ingresaron en la fermentación y los que salieron después de 120 h con 35°C, pH de 7, 180 rpm y 0.3 rpm.

Balance de masa de los reactivos utilizados y los productos y Sub productos obtenidos generados durante la fermentación *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina

Figura 66.

Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de *B. megaterium* ATCC 14581 con 20 g/L de glicerina.

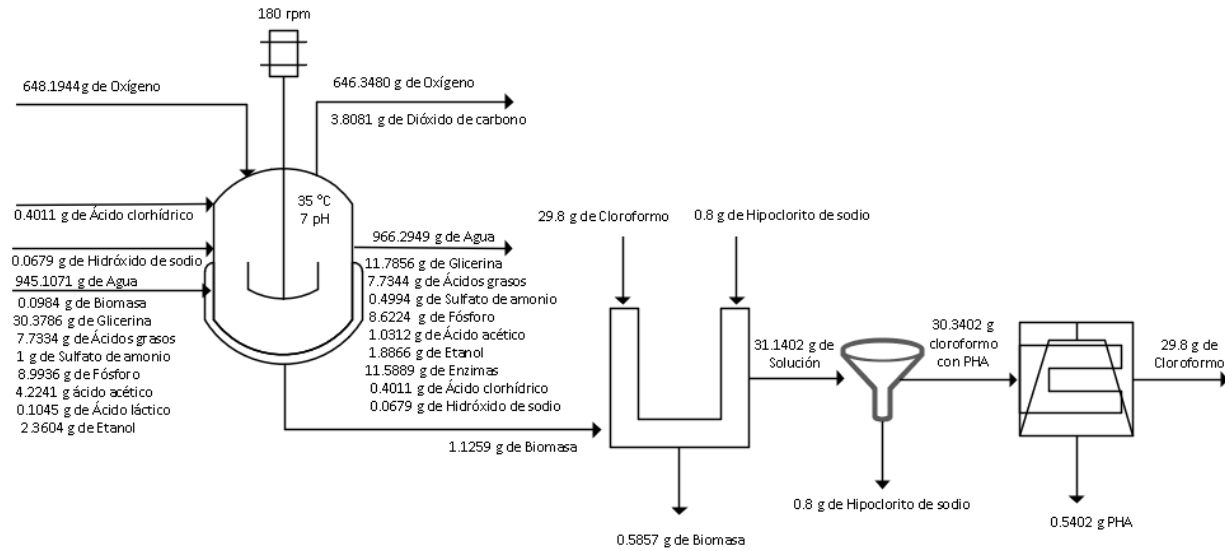


Nota. En la figura se observa el balance de masa entre los reactantes que ingresaron en la fermentación y los que salieron después de 120 h con 35°C, pH de 7, 180 rpm y 0.3 rpm.

Balance de masa de los reactivos utilizados y los productos y Sub productos obtenidos generados durante la fermentación *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina.

Figura 67.

Balance de masa del proceso de la fermentación de 1 L de *B. megaterium* ATCC 14581 con 30 g/L de glicerina.



Nota. En la figura se observa el balance de masa entre los reactantes que ingresaron en la fermentación y los que salieron después de 120 h con 35°C, pH de 7, 180 rpm y 0.3 rpm.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo de esta investigación es propagar y adaptar las cepas bacterianas *Bacillus megaterium* ATCC 14581, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 disponibles, en la Universidad del Valle de Guatemala, a consumir la glicerina procedente del proceso de biodiesel como principal fuente de carbono. Para determinar la cepa que presente los mejores rendimientos y evaluar dicha cepa bacteriana a diferentes concentraciones de glicerina para determinar la que presente mayor producción del PHA. Así mismo se buscaba utilizar pruebas de IR y tinción de negro de Sudán para evidenciar la presencia del polímero.

Se realizó la adaptación de las cepas bacterianas de *Bacillus megaterium* ATCC 14581, *ceruus* ATCC 14579 y *subtilis* ATCC 6051 a la glicerina residual del proceso de biodiesel para evaluar su consumo como principal fuente de carbono en un volumen de 125 mL. La adaptación consistía en 3 adaptaciones de las cepas a caldo nutritivo para que tuvieran todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Cada una de las adaptaciones tenía mayor proporción de glicerina que la anterior, comenzando por un 20 g/L, después 200g/L y finalmente 400 g/L, con el propósito que los microorganismos al tener cada vez más glicerina comenzaran a utilizarla como principal fuente de carbono, debido a que era lo que más se encontraba disponible en el medio para que gradualmente mejoren su tolerancia al estrés y sean capaces de utilizar diferentes mecanismos para comenzar a metabolizar sustratos que generalmente no son preferidos para crecer y sobrevivir. Por lo que se esperaba que gradualmente las cepas comenzaran a tener un mayor consumo de glicerina, con el propósito de que sean más eficientes en su aprovechamiento y crecimiento.

Como se puede observar en la Figura 13 durante la primera adaptación con glicerina *B subtilis* tuvo un crecimiento significativamente mayor en comparación de *B. cereus* y *B. megaterium*, como se ve en la Tabla 5, en la que el valor P de la comparación de las medias de *B. subtilis* con *B. megaterium* y *B. cereus* fue menor al valor de significancia de 0.05, lo que indica que existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula que indicaba que la media de los valores del crecimiento de las cepas eran iguales. En el consumo de glicerina en la Figura 14 se observó que *B. megaterium* fue el que obtuvo mejores resultados, seguido de *B. subtilis* y *B. cereus*. Sin embargo, se determinó que la cepa que obtuvo un mayor rendimiento de crecimiento bacteriano conforme el consumo de sustrato fue *B. subtilis*, con un valor de 0.4218 g/g, seguido *B. megaterium* con 0.1612 g/g y *B. cereus* con 0.1488 g/g, lo cual indica que la cepa *B. subtilis* tuvo un mayor aprovechamiento de la glicerina en el medio para su crecimiento en comparación de las otras cepas. Sin embargo, el rendimiento $Y_{x/s}$ de *B. subtilis* únicamente fue significativamente mayor al de *B. cereus* (Tan et al. 2022).

Con el fin de asegurar que las cepas que se incubaron en el agar nutritivo y en el caldo eran las correctas, crecieron adecuadamente y que no se habían contaminado, se realizó una tinción Gram, la cual es una técnica que permite determinar si la bacteria de estudio es Gram positiva o negativa de acuerdo con sus paredes celulares. Los microorganismos *B. megaterium*, *subtilis* y *cereus* son bacterias Gram positivas debido a que sus paredes celulares retienen el cristal violeta, por lo que deberían de presentar un color morado al observarla en el microscopio, lo cual se confirmó en la tinción que se observa en la Figura puesto que las tres cepas bacterianas presentaron un color morado, lo cual indica que las bacterias efectivamente son Gram positivas (Tripathi, Sapra, 2023).

En la segunda adaptación con 200 g/L de Glicerina de biodiesel se observó un aumento en el crecimiento de *B. megaterium*. Puesto que, como se puede observar en la Figura 15, se encuentra una nube de puntos correspondientes a *B. subtilis* y *B. cereus* debajo de la tendencia de *B. megaterium*. Sin embargo, este aumento no fue significativo en comparación al aumento de *B. cereus* y de *B. subtilis*, puesto que, el valor P para la comparación de medias de la Tabla 6, fue mayor para cada una de las cepas que el nivel de significancia de 0.05. Por lo que no se tiene evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula. En el análisis del consumo de glicerina en la Figura 16 se continuó observando a la cepa *B. megaterium* como la que obtuvo mejores resultados. Además, el mayor rendimiento $Y_{x/s}$ fue de *B. megaterium* con 0.0885 g/g, seguido de *B. cereus* con 0.0796 g/g y *B. subtilis* con 0.0524 g/g, por lo que *B. subtilis* comenzó a presentar menor rendimiento al aumentar la concentración de glicerina de un 20 g/L a 200 g/L, por lo que pudo presentar una inhibición a su crecimiento en lo que se adaptaba a las altas concentraciones de glicerina.

Finalmente, en la última adaptación de medio de cultivo con 400 g/L de glicerina procedente del proceso de biodiesel se observa que el crecimiento de *B. megaterium* en la Figura 17 se encuentra arriba de las tendencias de las otras cepas y tuvo un crecimiento significativamente mayor como se evidencia en la Tabla 7 por lo que comenzó a adaptarse a la glicerina, puesto que se observó un mayor consumo en el gráfico de la Figura 18. Así mismo, el rendimiento de $Y_{x/s}$ de *B. megaterium* fue mayor significativamente, con 0.7068 g/g lo que indica su capacidad de crecer y aprovechar la glicerina presente en el medio a concentraciones más altas. Sin embargo, *B. subtilis* y *B. cereus* tuvieron un rendimiento menor de 0.1746 g/g y 0.0619 g/g respectivamente. Sin embargo, el rendimiento de *B. subtilis* en 400 g/L fue mayor que el de 200 g/L, lo que indica que *B. subtilis* comenzó a aprovechar la glicerina presente en el medio a diferencia de *B. cereus* que tuvo el menor rendimiento.

Además, se realizó un análisis de comparación de medias de los resultados obtenidos por cada cepa en las diferentes concentraciones de glicerina presentes, como se muestra en la Tabla 9 se evidenció que el rendimiento específico de crecimiento vs consumo de sustrato de *B. megaterium* fue significativo al pasar de 20 g/L a 200 g/L y luego de 200 g/L a 400 g/L, lo cual también respalda la selección de la cepa de *B. megaterium*, puesto que *B. subtilis* no presentó un aumento significativo al ser trasladado del medio de 20 g/L al de 200 g/L de glicerina de biodiesel. En la Tabla 8, también se muestra la comparación de medias de los crecimientos en el medio y se observó que ambas cepas presentaron un crecimiento significativo al trasladarlas en el medio con mayor cantidad de glicerina de 200 g/L a 400 g/L. Sin embargo, cabe destacar que los rendimientos obtenidos de *Bacillus megaterium* tuvieron mayor diferencia, ya que aumentó un 0.6183 g/L de consumo de glicerina en el medio de 200 a 400 g/L, mientras que *Bacillus subtilis* aumentó 0.1222 g/L, esto era lo que se esperaba, puesto que, la ruta metabólica de *Bacillus megaterium* se adapta más fácilmente al consumo de glicerina, además cabe destacar que en el medio con 400 g/L existía menor concentración de medio de cultivo, por tanto no estaban disponibles otros nutrientes o posibles fuentes de carbono y si la adaptación estaba siendo funcional las bacterias deberían de haberse acostumbrado a consumir la glicerina como principal fuente de carbono y por ende tener mejores rendimientos.

De la misma manera, es necesario mencionar que para determinar si existía significancia entre los datos obtenidos en triplicado de las cepas bacterianas en las adaptaciones, se realizó un análisis para determinar si los datos serían representativos a partir de la dispersión entre la media y la mediana. En la Figura 19 se puede observar líneas representativas de la mediana y de la media aritmética con el propósito de evaluar la dispersión de los datos obtenidos en la experimentación y si era representativo realizar un análisis de diferencia de medias. Puesto que si los valores se hubieran encontrado muy alejados significaría que existe mucha variabilidad entre los datos e incluso que exista sesgo.

Sin embargo, como se puede observar en la Figura 19 y Figura 20 correspondientes al crecimiento de las cepas en medio de caldo nutritivo con 20 g/L, 200 g/L de glicerina de biodiesel respectivamente, la media y la mediana se encuentran muy cerca, a diferencia de la Figura 21 con 400 g/L de glicerina donde se puede apreciar más lejanía entre la media aritmética y la mediana, lo cual fue debido al considerable aumento de *B. megaterium* en el medio. Mientras que las otras cepas no llegaron ni a la media aritmética, por lo que también se realizó un análisis de diferencia de medias por la naturaleza de los datos. Así mismo, en la Figura 22 se observa la comparación entre el crecimiento de biomasa de las tres cepas en las tres concentraciones de glicerina de biodiesel 20 g/L, 200 g/L y 400 g/L en el medio con caldo nutritivo y se ve claramente el aumento de *B. megaterium* en comparación de las otras cepas.

Seguido de las adaptaciones de las cepas bacterianas a la glicerina que corresponde a paso no. 1 de la Figura 11 se realizó una segunda adaptación con diferente medio para que las cepas comenzaran no solo a adaptarse a consumir la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel, sino que también a crecer en medio de sales formulado con los nutrientes limitados, pero con los necesarios para favorecer la producción de PHA y de esta forma seleccionar la cepa que tuviera la mejor respuesta de crecimiento en el medio específico formulado y consumo de glicerina. Tomando en cuenta que para la producción de PHA se requiere condiciones donde otros sustratos como el nitrógeno se encuentren en escasez y la glicerina en mayores proporciones, se tomó como principal punto de estudio la concentración de glicerina respecto al nitrógeno, por lo que se realizaron medios formulados con las sales del Tabla 2 y con una concentración de carbono/nitrógeno de 15:1, 20:1 y 30:1 en las siguientes adaptaciones.

En la primera adaptación de las cepas bacterianas al medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina de biodiesel, se observó que *B. megaterium* continuó teniendo un mayor crecimiento en comparación de las otras dos cepas bacterianas, el cual tiene un promedio de 0.07057 ± 0.01891 g. Para este análisis se tomó en cuenta, como se observa en la Figura 30, que *B. subtilis* tiene un dato atípico. Puesto que se encontraba muy alejado de la media y la mediana, y tomando en cuenta que el medio se observó con diferente color como se puede observar en la figura 6, se tomó en cuenta que presentó una contaminación y el análisis se realizó con la Figura 31. Así mismo cuando se evaluó el consumo de glicerina se observó que *B. megaterium* comenzó a aprovechar significativamente la glicerina en el medio, en comparación de las otras cepas, como se evidencio en el Tabla 12. Por lo que está cepa fue seleccionada para evaluar las condiciones carbono nitrógeno a escala de 1 L debido principalmente a su tolerancia desarrollada por el estrés generado por el cambio de medio con caldo de cultivo a uno puramente de sales específicas para la producción de PHA. Lo cual era lo que se buscaba al seleccionar a la bacteria con el mayor consumo de glicerina. Esto concuerda con lo esperado, puesto que, en el metabolismo de glicerina por *Bacillus megaterium* se utilizan más enzimas que en el metabolismo de *B. subtilis* y *B. cereus*.

Siguiendo la Figura 4 se puede observar el metabolismo de glicerina por *Bacillus megaterium*, a diferencia de esta ruta metabólica, en el metabolismo de las cepas *B. subtilis* y *B. cereus*, el glicerol 3-fosfato se convierte a dihidrofosfato, luego a gliceraldehído 3 fosfato, posteriormente a 3-fosfo-D-glicerol fosfato para llegar a fosfoenolpiruvato y finalmente a piruvato, esto se puede deber a que *Bacillus megaterium* tenga diferencias genéticas significativas, por tanto sus adaptaciones metabólicas son más eficientes para utilizar la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel, puesto que, utiliza más enzimas específicas que facilitan a descomposición y utilización de glicerina de manera más eficiente que *B. cereus* y *B. subtilis*, además, es posible que *Bacillus megaterium* también sea más tolerante a las

condiciones específicas del medio de cultivo, puesto que las impurezas o compuestos derivados del biodiesel pueden influir en la eficiencia de las otras cepas al crecer en el medio con glicerina residual (Vikromvarasiri et al. 2021). Cabe destacar que por la facilidad de adaptación de *Bacillus megaterium* a la glicerina se ha comenzado a buscar formas de aumentar estos rendimientos con la ayuda de ingeniería genética, enfocándose en la enzima glicerol deshidrogenasa para que la degradación del glicerol en la ruta metabólica sea más eficiente (Gómez et al. 2019)

Tomando en cuenta que en la primera adaptación de las cepas al medio de sales formulado con 15 g/L se volvió a realizar una tinción Gram para garantizar que las cepas bacterianas continuaban creciendo en el medio y ninguna otra bacteria había contaminado el sistema. Se observó en la Figura 23 que nuevamente las bacterias *B. megaterium*, *subtilis* y *cereus* presentaron un color morado, por lo que eran Gram positivas y el medio no había sufrido contaminación por alguna bacteria Gram negativa. Sin embargo, cabe mencionar que la cepa de *B. subtilis* que se había contaminado no fue la misma que se utilizó para realizar la tinción, debido a que se encontraba de otro color; por lo que se utilizó *B. subtilis* 1 en lugar de *B. subtilis* 2 y no se tomó en cuenta los resultados de esta cepa.

En continuidad con el proceso se realizó una tinción de negro de Sudán para determinar cualitativamente si las cepas no estaban únicamente consumiendo la glicerina para su crecimiento, si no que al presentar una ausencia de nitrógeno comenzaran a almacenar el carbono en forma de PHA. El negro de Sudán se utiliza para identificar la presencia de PHA, puesto que tiñe compuestos lipídicos y los gránulos de PHA. Se encuentran recubiertos de fosfolípidos y proteínas, lo cual los permite observar inclusiones intracelulares de un color negro azulado. En la Figura 37, se observó que en las tres cepas bacterianas presentaron gránulos de color negro azulado, lo cual indicaba la presencia de los fosfolípidos correspondientes al PHA en los bacilos (Samrot et al. 2021).

De la adaptación de *B. megaterium* en medio de sales con 15 g/L de glicerina en triplicado se tomó la muestra que presentó un mayor crecimiento y se agregaron 100 mL del medio al reactor Sartorius con 900 mL de medio de sales formulado. El reactor se mantuvo con un flujo de aire constante de 0.3 L/min, a una temperatura de 35°C, una agitación de 180 rpm y un pH de 7; el cual fue regulado con soluciones de HCL y NaOH 1 M. La fermentación se llevó a cabo durante 6 días y se monitorearon diariamente las concentraciones de glicerina, ácido acético, etanol, metanol, ácido láctico y biomasa. Se encontró después de transcurridos 6 días que el consumo de glicerina fue de 10.3359 ± 0.00007 g/L y el crecimiento de la biomasa fue de 0.7241 ± 0.0001 g. Así mismo, se realizó una gráfica del logaritmo natural del crecimiento de *B. megaterium* vs el tiempo para poder apreciar las fases de crecimiento de la bacteria.

En la Figura 41 se puede apreciar que en las primeras 24 h se presenta la fase exponencial donde la velocidad de crecimiento aumenta constantemente. En los siguientes días se puede observar cómo es que la velocidad de crecimiento va disminuyendo. Sin embargo, la pendiente sigue siendo positiva. Por lo que aún se encontraba en la etapa de crecimiento. En el gráfico no se logró identificar la etapa de latencia principalmente porque es donde las células se adaptan al medio; y anteriormente ya se habían realizado diversas adaptaciones para garantizar que al realizar la fermentación de 1 L las bacterias ya pudieran utilizar la glicerina como fuente principal de carbono.

Además, otra etapa que no se logró identificar correctamente fue la fase estacionaria, lo cual indica que es probable que el microorganismo no haya alcanzado el punto máximo de crecimiento. Finalmente, tampoco se observó la etapa de declinación. Principalmente porque los días de la fermentación se determinaron con el objetivo que en el último día se tuviera la mayor cantidad de biomasa, puesto que en la biomasa se encontraba el producto de interés y no era algo que se buscaba apreciar.

Del mismo modo, para la fermentación a escala de 1 L también se realizaron tinciones con negro de Sudán durante el primer día, el tercero y el último de la fermentación, para evidenciar la presencia de PHA en *B. megaterium* en el medio formulado con 15 g/L de glicerina. Como se puede observar en la Figura 52, el primer día de la fermentación se observaron muy pocos gránulos de color negro, lo que indica que algunos bacilos ya habían comenzado a almacenar el PHA, lo cual pudo haberse llevado a cabo durante la etapa de adaptación. En el tercer día se observaron algunos gránulos de color negro, sin embargo, al igual que el primer día, no se encontró una gran cantidad, sino que fueron pocas bacterias. Finalmente, en la tinción del sexto día de la fermentación se puede observar claramente la presencia de un mayor número de gránulos color negro, lo cual fortalece la evidencia de la presencia de PHA en las células.

Con la segunda adaptación de *B. megaterium* en el medio de sales, el crecimiento promedio de la cepa *B. megaterium* fue de 0.1332 ± 0.0151 g. El cual fue un crecimiento mayor en comparación del crecimiento de la primera corrida, lo cual coincide con lo esperado, puesto que en otros estudios se ha encontrado que la relación carbono nitrógeno de 20:1 es la que más favorece el crecimiento y producción de PHA (Rojas et al. 2016). Además, se demostró que el consumo de glicerina fue significativamente mayor en la concentración de 20 g/L en comparación a la adaptación de 15 g/L y 30 g/L, como se puede observar en el Tabla 14, puesto que el nivel de significancia fue menor a 0.05, por lo que se rechazó la hipótesis nula.

Con la finalidad de determinar la presencia de PHA en el medio se realizó la tinción de negro de Sudán. En la Figura 38 se puede observar cómo es que se distinguen gránulos de color negro en las muestras

de *B. megaterium* 1 y *B. megaterium* 3. Sin embargo, en la muestra de *B. megaterium* 2 no se logró distinguir la formación de PHA, por lo que se seleccionó la muestra *B. megaterium* 1, la cual contaba con el mayor crecimiento de celular y así mismo también presentó gránulos de PHA durante la fermentación.

Respecto a la segunda fermentación de 1 L se utilizaron las mismas condiciones de pH de 7, temperatura de 35°C, flujo de aire de 0.3 L/min y velocidad de agitación 180 rpm. Sin embargo, la glicerina inicial fue de 20.9858 ± 0.00005 g g/L y después de transcurridos los 6 días se encontró que el consumo de glicerina fue de 15.9124 ± 0.00007 g/L y que el crecimiento de biomasa fue de 1.0225 ± 0.0001 g. En el gráfico del logaritmo natural de la Figura 44 también se pudo observar el crecimiento de *B. megaterium*, en el cual durante las primeras 48 horas se puede apreciar la fase exponencial, en la cual la velocidad de crecimiento aumentó constantemente. Sin embargo, al igual que en la fermentación de 15 g/L de glicerina, no se logró detectar la fase estacionaria y de declinación.

Sobre la tinción con negro de Sudán de la fermentación de 20 g/L de glicerina se observó en la Figura 53 que en el primer día no había ningún granulo color negro, por lo que en el primer día las bacterias aún no habían comenzado a almacenar PHA. Mientras que en el tercer día se observó un aumento de gránulos negros al igual que en el último día, pero también cabe mencionar que los gránulos eran más grandes. Por lo que los bacilos se estaban hinchando por el PHA almacenado, lo que no solo confirma la presencia de PHA, sino que también que en este punto se observó más PHA en las células.

Durante la adaptación de la tercera corrida con 30 g/L de glicerina, se obtuvo un crecimiento promedio de 0.1018 ± 0.0038 g, un valor menor al de la segunda adaptación. Lo cual sugiere que, al cambiar las cepas a un medio con mayor concentración, necesitaron una mayor cantidad de tiempo para crecer. Así mismo en la tinción de negro de Sudán de la adaptación que se puede apreciar en la Figura 39 se observaron gránulos de PHA. Por esta razón, al igual que en las otras adaptaciones se confirmó su capacidad para producir el polímero.

De esta manera, en la adaptación de la cepa *B. megaterium* al medio de sales con 20 g/L se observó un consumo alto, puesto que para 15 g/L el consumo de glicerina fue de 12.0405 ± 0.2403 , para 20 g/L de 19.9806 ± 0.2821 g/L, y para 30 g/L de 12.5256 ± 3.6923 g/L; la cual tuvo una mayor incertidumbre debido a que presentó un dato atípico entre los valores. Sin esta variación, el valor del consumo de glicerina sería de 15.8126 ± 0.3210 g/L, tomando la muestra en duplicado, lo que infiere que, respecto al consumo de glicerina, en comparación con la concentración de 15 g/L y 30 g/L, la fermentación con 20 g/L fue la que presentó los mayores resultados significativamente, como se comprobó en el Tabla 14.

Así también, para las adaptaciones en medio de sales también se determinó si existía significancia entre los datos obtenidos en triplicado de las cepas bacterianas en la adaptación de 15 g/L y entre las adaptaciones de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L. Se analizó si los datos eran representativos a partir de la dispersión entre la media y la mediana. Como se puede observar en la Figura 31 correspondiente al crecimiento de las cepas en el medio de 15 g/L, se puede apreciar que la media y la mediana se encuentran alejadas. Esto fue debido a que el aumento de *B. megaterium* se encontró arriba de la media, mientras que las otras cepas se ubicaron debajo o en la media. Además, también se realizó el análisis de la Figura 32 donde se comparó el crecimiento de *B. megaterium* entre las concentraciones de 15g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina en las adaptaciones, y se logró observar que la media y la mediana se encontraban cercanas. Lo cual indica que es representativo el análisis de diferencia de medias. Además, en la figura se puede observar cómo es que los valores de crecimiento son mayores para la concentración de 20 g/L, lo cual era lo que se esperaba.

Finalmente, en la última fermentación de 1 L con 30 g/L de glicerina de biodiesel y con las mismas condiciones controladas, se encontró que el consumo de glicerina fue de 18.5951 ± 0.00007 g/L, con un crecimiento de biomasa de 1.0275 ± 0.0001 g. A diferencia de las primeras dos fermentaciones el en gráfico de logaritmo natural del crecimiento de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina en la Figura 47, se lograron apreciar las tres fases de crecimiento bacteriano, donde en las primeras 24 h se detectó la fase de latencia, lo que indica que al estar los microorganismos en un medio con mayor concentración de glicerina les tomó una mayor cantidad de tiempo acostumbrarse y comenzar a aprovechar correctamente la glicerina en el medio. En las siguientes 72 h se logró apreciar la etapa exponencial, donde se observa un aumento significativo en la velocidad de crecimiento. Además, se logró apreciar la etapa estacionaria en las últimas 120 h, donde se observa como la velocidad de crecimiento disminuye significativamente hasta llegar a ser casi nula.

El comportamiento observado coincide con el esperado, debido a que las altas concentraciones de sustrato llega a inhibir el crecimiento de las bacterianas, puesto que no son capaces de procesarlo metabólicamente en cantidades excesivas, así mismo, cabe destacar que debido a las altas concentraciones de glicerina residual del proceso de producción de biodiesel la disponibilidad de otros compuesto pudo presentar un efecto toxico sobre las bacterias, lo cual haya impedido no solo el crecimiento de *Bacillus megaterium* sino que también la producción de PHA por las bacterias. Otro factor que pudo tener un impacto en los rendimientos obtenidos de fermentación con 30 g/L de glicerina fue el estrés osmótico de las bacterias al aumentar la concentración de glicerina y con ello la osmolaridad externa, por tanto, afectar el crecimiento de las bacterias y con ello los rendimientos de PHA obtenidos durante la fermentación (Ruzal, 1994).

Otros parámetros que se calcularon para comparar los parámetros cinéticos del crecimiento y consumo de glicerina como principal fuente de carbono fue la velocidad específica máxima, la constante de afinidad al sustrato y la constante de mantenimiento de *B. megaterium* para la concentración de 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L en un medio de 1 L de sales. En la tabla 20, se puede observar que la constante de afinidad al sustrato de la fermentación de 15 g/L y de 30 g/L corresponde a 6.99 g/L y 6.99 g/L respectivamente, los cuales son valores más grandes en comparación con la constante de afinidad al sustrato obtenida en la fermentación con 20 g/L de glicerina de biodiesel 1.98 g/L.

Esto concuerda con lo esperado, puesto que los valores grandes de K_s indican una baja afinidad al sustrato, mientras que los valores pequeños indican una mayor afinidad al sustrato. Por lo que, tomando en cuenta que, en altas concentraciones de sustrato las bacterias presentan una inhibición metabólica por esto mismo, existe una baja afinidad por el sustrato al encontrarse en cantidades altas que no son capaces de procesar. Así mismo, para la fermentación con 15 g/L, al tener bajas concentraciones de sustrato, las bacterias no pueden aprovecharla eficazmente, lo que lleva a una K_s más grande y a la necesidad de concentraciones más altas de sustrato, por lo que la concentración ideal para su crecimiento es con 20 g/L de glicerina de biodiesel (Robinson, 2015).

Además, como se observa en la Tabla 19, la velocidad específica máxima de cada una de las fermentaciones corresponde a 0.0633 h^{-1} para 15 g/L, 0.0450 h^{-1} para 20 g/L y 0.0532 h^{-1} para 30 g/L. Se puede observar que para la concentración con 20 g/L la velocidad de crecimiento específica máxima fue la menor entre las fermentaciones. Esto también era algo que se esperaba observar en el comportamiento, puesto que para producir PHA es importante tener una constante de afinidad al sustrato alta para que el microorganismo aproveche la fuente de carbono para acumular PHA.

Mientras que, si la velocidad de crecimiento es mayor podría inducir a que el sustrato sea utilizado principalmente para su crecimiento y bajar el rendimiento de acumulación de PHA. Por lo que lo ideal es encontrar un equilibrio entre estos dos parámetros, puesto que se desea que los microorganismos crezcan para acumular PHA. Pero, no solo que crezcan acumulando pocas cantidades del polímero o que crezcan muy poco, sino que acumulen bastante PHA. A pesar de que, con la fermentación de 20 g/L se obtuvo una mayor afinidad al sustrato, la velocidad específica de crecimiento es menor en comparación con las otras fermentaciones. Lo que indica que, al utilizar eficientemente el sustrato, la tasa de crecimiento debe ser menor para poder acumular mayores cantidades de PHA (Kovárová, Egli, 1998).

De la misma manera, se determinó la constante de mantenimiento de cada una de las fermentaciones y se encontró que para la fermentación de 20 g/L se obtuvo una menor constante de mantenimiento en comparación con las otras fermentaciones, la cual fue de 0.01 g/L. Lo cual indica que los requerimientos energéticos y metabólicos son menores. Esto se debe a que al contar con mayor afinidad al sustrato para la bacteria es más fácil metabolizar el sustrato. Mientras que, al tener altas concentraciones de glicerina, a la bacteria se le hace difícil procesarlo y llega a inhibir su consumo. Lo cual requiere un mayor consumo de energía. Así mismo cuando no hay suficiente sustrato, la bacteria requiere más energía para su eficiente crecimiento.

En cuanto a la tinción con negro de Sudán de la fermentación de 30 g/L de glicerina se observó en la Figura 54 que en el primer día no había ningún gránulo color negro, al igual que la segunda fermentación. En el tercer día no se observó un aumento significativo de gránulos negros debido a que la bacteria tardó un mayor periodo de tiempo en adaptarse al medio; mientras que en el último día se observaron algunos gránulos de color negro, pero en una menor proporción de las primeras dos fermentaciones. Lo cual también se evidencia en los rendimientos específicos de reacción.

Además de observar el comportamiento cinético del microorganismo, también se realizaron pruebas de HPLC con el objetivo de poder apreciar la cantidad de los sub productos que se generaron en la fermentación con 15 g/L de glicerina. En la figura 42, se puede observar cómo en las primeras 24 horas de la fermentación se produjo etanol y ácido acético, sin embargo, en las siguientes 96 horas estos sub productos se fueron consumiendo. Este mismo comportamiento también se observó en la curva de ácido láctico, a diferencia que este se produce hasta las 48 horas y disminuye hasta agotarse por completo en las siguientes horas.

Así como, en la curva de ácido acético también se observó un comportamiento similar, con la diferencia que al final de la fermentación tuvo una mayor concentración, puesto que no se llegó a consumir por completo. Lo cual lo convierte en el sub producto con mayor concentración al final de la reacción. Estos subproductos se generan y se metabolizan por *B. megaterium* cuando se encuentra en condiciones anaeróbicas, lo que va de la mano con un menor crecimiento. Este comportamiento no coincide con las condiciones aeróbicas que se mantuvieron en la fermentación por el flujo del aire de 0.3 L/min. Sin embargo, durante la fermentación, el compresor presentó diversos apagones, por lo que todos los días era necesario encenderlo de nuevo e incluso dos veces por día. En estos periodos de tiempo las condiciones aeróbicas cambiaban a anaeróbicas, lo cual dio lugar a la generación de estos subproductos, lo que indica que en las primeras 24 horas las condiciones que favorecieron fueron anaeróbicas por los repetitivos

apagones del compresor, dando lugar a que se produjeran etanol y ácido acético, mientras que el ácido láctico se generó a las 72 horas. En las últimas 48 horas de la fermentación se logró mantener las condiciones aeróbicas. (Bai, Yan, Li, 2017).

El gráfico de la Figura 45 de los subproductos de la fermentación de 1 L con 20 g/L de glicerina tuvo un comportamiento distinto, puesto que a diferencia de la fermentación de 15 g/L, en esta fermentación el etanol se mantuvo constante hasta el final de la reacción donde aumentó considerablemente. El ácido acético presentó un consumo y luego volvió a aumentar, lo que indica que *B. megaterium* lo volvía a utilizar y después a producir. Finalmente, la curva de ácido láctico disminuyó levemente a lo largo de la fermentación. Este mismo comportamiento, donde los subproductos se consumían y luego se volvían a generar, concuerda con este cambio repentino de condiciones del aire, puesto que se generaban subproductos bajo condiciones anaeróbicas y luego, al cambiar a condiciones aeróbicas, se consumían. Lo cual indica que durante las primeras 48 horas las condiciones fueron aeróbicas, pero en las siguientes horas las condiciones que favorecieron fueron anaeróbicas.

Para la fermentación de 1 L con 30 g/L, el gráfico de la Figura 48 de producción de los subproductos de la reacción presentó un consumo de ácido acético considerable, puesto que la cantidad fue disminuyendo durante cada uno de los 6 días. Así mismo, se observó un aumento de etanol, un consumo y luego otro aumento. Lo que indica que se utilizó y luego volvió a producirse por el metabolismo del microorganismo y así como la fermentación de 20 g/L de glicerina, fue el sub producto con mayor concentración al final de la fermentación. El ácido láctico se mantuvo constante cerca de cero y no presentó producción al igual que en la fermentación de 20 g/L. Lo cual indica que las condiciones en las primeras 24 horas fueron anaeróbicas, mientras que en las siguientes 94 h se mantuvieron aeróbicas debido a que no se observó la producción de subproductos en el medio y por el contrario se observó un consumo de ácido acético y ácido láctico.

Cabe mencionar que al inicio de las tres fermentaciones se observaron altas concentraciones de algunos subproductos, esto se debe a que en las adaptaciones de *B. megaterium* en el medio formulado, se buscaba adaptar a los microorganismos a consumir la glicerina y a crecer en el medio formulado, por lo que no se controló ningún flujo constante de aire al medio y por ende las condiciones en las que las bacterias estuvieron creciendo eran anaeróbicas, por esta razón la concentración de los subproductos en el medio era alta, mientras que en las fermentaciones de 1 L las condiciones se mantuvieron en su mayoría aeróbicamente para favorecer el crecimiento y producción de PHA.

Al finalizar las fermentaciones y las centrifugaciones del medio de 1 L se realizó la cuantificación de PHA utilizando cloroformo e hipoclorito de sodio 4% p/v con el propósito de inducir la lisis celular, que el cloroformo solubilizara el PHA, y con esto, lograra atrapar todas las moléculas de PHA presentes en la muestra. Después de atrapar el PHA mediante una centrifugación, se procedió a separar las fases de hipoclorito de sodio mediante gravedad. Por lo que el cloroformo, por ser más denso, se concentró en la parte inferior de la ampolla de decantación. Esta solución se extrajo y se centrifugo para que el PHA pudiera precipitar en el medio y, al ingresarlo al evaporador se pudiera eliminar la presencia de cloroformo y obtener únicamente el polímero de PHA. El PHA obtenido en cada una de las fermentaciones se pesó y se realizó un IR con el propósito de identificar los grupos funcionales presentes en el producto y determinar si coincidían con los principales grupos funcionales del PHA.

Para la primera fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina se obtuvo 0.4329 ± 0.0005 g de PHA, con un porcentaje de PHA presente en la biomasa de 52.03 ± 0.0645 %, lo cual es menor en comparación con la literatura, en la cual se indica que debería constituir entre un 80 - 90%. En la segunda fermentación con 20 g/L de glicerina se obtuvo $0.7320 \text{ g} \pm 0.0005 \text{ g}$ y el porcentaje de PHA presente en la biomasa de PHA de $71.59 \text{ } 4329 \pm 0.0005$ %, esto se encuentra en un porcentaje más cercano al esperado que el de la primera fermentación. En la tercera fermentación con 30 g/L de glicerina se obtuvo 0.5402 ± 0.0005 g de PHA con un porcentaje de PHA de $47.98 \pm 0.0005\%$, indicando que, de todas las fermentaciones, la que obtuvo menor producción de PHA y proporción de PHA en la biomasa fue la final, la cual contaba con una mayor cantidad de glicerina inicial.

De tal manera, para evaluar los rendimientos de la reacción se determinaron los valores de los rendimientos específicos del producto respecto al crecimiento de *B. megaterium*, el rendimiento de la producción de PHA, conforme el consumo de glicerina y el rendimiento del aumento de biomasa respecto al consumo de sustrato. Se encontró, como se observa en la Tabla 18, que la fermentación que obtuvo el rendimiento $Y_{p/x}$ más alto en comparación con las otras fermentaciones fue la que se trabajó a 20 g/L, el cual fue de 0.6262 g/g, lo cual indica que el punto óptimo para el crecimiento de *B. megaterium* utilizado el respectivo medio formulado bajo las condiciones previamente indicadas se encuentra con 20 g/L de glicerina de biodiesel, seguido de la segunda fermentación donde se trabajó con 15 g/L de glicerina con un valor de 0.5203 g/g y, finalmente, la tercera fermentación de 30 g/L de glicerina con un rendimiento de 0.4798 g/g, lo cual indica que las condiciones fueron las menos óptimas para la producción de PHA.

Para el rendimiento específico de reacción $Y_{x/s}$ que indica la cantidad de biomasa por unidad de sustrato consumida, el valor de $Y_{x/s}$ más alto fue el de la segunda fermentación con 20 g/L de glicerina de

0.1105 ± 0.0552 g/g. Lo que indica que bajo esta concentración de glicerina la bacteria utilizó eficientemente el sustrato para crecer. Lo que concuerda con que se obtuvo un mayor crecimiento de biomasa y con lo esperado teóricamente. En la fermentación con 15 g/L de glicerina se obtuvo el menor rendimiento de 0.0568 ± 0.0117 g/g y finalmente el rendimiento de la tercera fermentación con 30 g/L de glicerina fue de 0.0891 ± 0.0259 g/g. Por esto no utilizó correctamente el sustrato para crecer, debido a que cuando una bacteria tiene demasiados nutrientes y sustrato, llega a inhibir el crecimiento y la producción de los productos y no es capaz de utilizarlos. Por lo que, con 30 g/L *B. megaterium*, ya no utilizó eficientemente la glicerina (Liu, 2017).

El último rendimiento específico que se calculó fue el del producto en función del sustrato Yp/s, el mayor valor encontrado fue para la segunda fermentación con 20 g/L de glicerina, el cual fue de 0.0692 ± 0.0346 g/g. Lo que indica que la bacteria utilizó eficientemente el sustrato para producir PHA bajo las condiciones evaluadas. La tercera fermentación con 30 g/L de glicerina obtuvo un rendimiento de 0.0428 ± 0.0124 g/g, por lo que a pesar que en esta fermentación la bacteria no aprovechó la glicerina para crecer, sí aprovechó la glicerina para almacenar energía en forma de PHA. Finalmente, el menor rendimiento obtenido fue el de la primera fermentación con 15 g/L, el cual fue de 0.0296 ± 0.0061 , por lo que aprovecho el sustrato para crecer más de lo que lo aprovechó para producir PHA, a diferencia de la segunda fermentación que aprovecho la glicerina para crecer y además para producir PHA. Esto indica que obtuvo los mejores rendimientos específicos.

Por tanto, con la fermentación de 20 g/L de glicerina se obtuvo los mejores rendimientos de crecimiento, consumo de glicerina y producción de PHA a 180 rpm, 37 °C, 0.3 L/min de aire, con un pH de 7 en medio de sales formulado de 1 L durante 120 horas. Con el propósito de obtener mejores rendimientos y de realizar un escalamiento de este proceso a largo plazo para la producción de PHA utilizando las condiciones evaluadas se recomienda utilizar la técnica de lotes alimentados, puesto que implementando un flujo constante de medio de cultivo se puede aumentar los rendimientos en la producción de biomasa y PHA y al mismo tiempo reducir los costos asociados al proceso. Además, cabe destacar que tomando en cuenta que el medio de cultivo residual de las fermentaciones tiene parte de las enzimas producidas durante la fermentación de las bacterias para consumir el glicerol, se puede reutilizar parte del medio para que las bacterias aprovechen las enzimas previamente generadas para utilizar su energía principalmente en producir PHA, de esta forma aumentando el rendimiento y disminuyendo los costos de producción (Gómez, 2020)

Con el propósito de determinar que el producto obtenido de las fermentaciones de 1 L era PHA o algún derivado, se realizaron espectros IR de las muestras evaporadas y secadas del cloroformo. Para la primera fermentación de 15 g/L de glicerina se observó en el espectro de la figura 55 que inicialmente se encontraba un pico en 2918.89 cm^{-1} . Por lo que, esto puede ser indicio de un grupo alcano por los enlaces CH_2 , el cual es un grupo funcional correspondiente al PHA y se encuentra en un rango de $2,800$ a $3,000\text{ cm}^{-1}$. Así mismo como se puede observar en la superposición de estándares de PHA presentes en la Universidad del Valle de Guatemala, el PHA (milky White) cuenta con una vibración que se encuentra en el mismo lugar que el producto obtenido. Por lo que da indicios que el resultado podría ser PHA, puesto que en la Figura 58 se observa la estructura del PHA y se observa un grupo CH_2 .

De la misma forma, en el espectro se puede observar un pico en 1735.82 cm^{-1} el cual es uno de los más característicos del PHA, puesto que corresponde al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y se puede apreciar en un rango de $1,650$ a $1,750\text{ cm}^{-1}$; y al superponer los estándares de PHA se encuentran los picos en el mismo lugar y se asemeja al presente en el PHA transparente. No se buscaba que los picos fueran del mismo tamaño exactamente en el mismo lugar y que se presentaran todos los grupos funcionales, debido a que cada PHA sintetizado por diferente microorganismo puede tener diferencias representativas. Sin embargo, los grupos funcionales principales se encuentran en puntos cercanos. Así mismo, en $3,424.78\text{ cm}^{-1}$ se observa una leve curva, lo cual es característico de un alcohol, puesto que su rango se encuentra entre $3,550$ - $3,450\text{ cm}^{-1}$ para compuestos de puente simple, lo cual también se observa en la estructura del PHA. Esta curva generalmente es intensa, sin embargo, en el espectro se observa leve. Esto es principalmente porque en la estructura del PHA, este se encuentra en el final de la cadena, pues se repite el carbonilo y el alcano en la cadena. Sin embargo, en el extremo se encuentra el OH, por lo que se encuentran en menor proporción, ya que no se repite en toda la cadena (Pitsevich, Kozlovskaya, Doroshenko, 2016 & Wade, 2017).

Tomando en cuenta que los picos principales, se encuentran presentes en el espectro IR y son capaces de visualizarse y en general el espectro tiene diversos picos en las mismas zonas que los estándares. Lo que da a entender que la concentración presente en la muestra de PHA era alta. Sin embargo, cabe mencionar que en el espectro se observa otro pico que no corresponde a los comunes del PHA o bien es poco visto, el cual se encuentra en $1,595\text{ cm}^{-1}$ el cual puede corresponder a un enlace (N-H), puesto que este pico se encuentra en un rango de $1,650$ - $1,550\text{ cm}^{-1}$ para vibraciones de torsión secundarias. Este pico no proviene de la glicerina utilizada, puesto que se realizó un espectro IR para determinar si el pico correspondía a esta fuente. Sin embargo, el pico no estuvo presente en el espectro. Por lo que tuvo que ser uno de los productos del metabolismo de *B. megaterium*.

Considerando que uno de los productos de la fermentación son las enzimas que se generaron para que la bacteria sea capaz de consumir y metabolizar la glicerina, como Glicerol quinasa, Glicerol deshidrogenasa, Acil-coA y poli (3-hidroxi butirato) polimerasa, es posible que este pico provenga de las enzimas presentes en el medio fermentativo, puesto que las enzimas se encuentran principalmente formadas por aminoácidos que son compuestos nitrogenados. Por lo que los enlaces N-H se encuentran presentes en su estructura, los cuales son picos fuertes. Así mismo, por la naturaleza de la muestra, si las enzimas se encontraban en la estructura del PHA, al realizar el IR y reflejar lo que se encuentra en la estructura, al estar las enzimas adheridas a la pared obtendríamos un pico grande, a pesar que la concentración no sea alta.

Para la segunda fermentación de 20 g/L de glicerina se observó en el espectro de la Figura 45 que inicialmente se encontraba un pico en $2,918.21\text{ cm}^{-1}$, el cual corresponde al grupo alcano por los enlaces CH_2 , que al igual que en la primera fermentación se encuentra exactamente en la misma posición que el de PHA (milky White) en la Figura 59. Así mismo, en el espectro se puede observar un pico en $1,736.91\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), y al sobreponer los estándares de PHA tienen una vibración similar, lo cual indica que la muestra también es de PHA, debido a la semejanza con los estándares y la ubicación de los picos característicos en el espectro.

Sin embargo, también se puede apreciar la presencia de un pico en $1,561.09\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los compuestos nitrogenados (N-H) de las enzimas presentes en el medio. Otro pico característico que se encontró en la muestra fue el del alcohol, presente en $3,424.78\text{ cm}^{-1}$ el cual a diferencia de la primera fermentación se encuentra fuera del rango de los de puente simple y dentro de asociación polimérica que se encuentran en un rango de $3,400\text{-}3,200\text{ cm}^{-1}$. Lo que indica que, a pesar de ser un polímero generado por la misma cepa bacteriana, cuenta con diferencias en la estructura. Debido que, los alcoholes de asociación polimérica son capaces de formar cadenas entre la misma molécula como en diferentes moléculas de PHA (Wide, 2017).

En atención a la tercera fermentación con 30 g/L de glicerina, también se observó en el espectro de la Figura 57 un pico en $2,917.90\text{ cm}^{-1}$ el cual corresponde al grupo alcano por los enlaces CH_2 , similar al que presentan las otras dos fermentaciones y en la misma posición que el de PHA (milky White) en la Figura 60. Así mismo, se observa un pico en $1,736.44\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y tiene una vibración similar a los estándares, también se observó la estructura de alcohol (OH) presente en $3,387.69\text{ cm}^{-1}$ al igual que en la segunda fermentación de asociación polimérica. Sin embargo, también se puede apreciar la presencia de un pico en $1,561.09\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los compuestos nitrogenados (N-H) de las enzimas. Por lo que al igual que en las otras fermentaciones, se puede distinguir los picos

principales correspondientes a los grupos funcionales más comunes al PHA. Esto, ligándolo a las tinciones de negro de Sudán a *B. megaterium* a cada una de las adaptaciones y fermentaciones, que permite confirmar que la muestra del producto era PHA.

Los ácidos grasos presentes en la glicerina del biodiesel constituían un índice del 16.22 % en la glicerina, lo que pudo haber formado parte de la reacción y otra posible fuente de carbono para *B. megaterium*. Sin embargo, el 79.71% constituían a la glicerina, por lo que para plantear la reacción estequiométrica y el balance de masa se asumió que los ácidos grasos no formaron parte de la reacción. Además, en las fermentaciones realizadas, en el medio final se observó la presencia de los ácidos grasos en el medio, como se puede apreciar en la figura 10. Por lo que, si en dado caso *B. megaterium* consumió parte de los ácidos grasos, esto no fue significativo, ya que, cualitativamente se observó la presencia de ácidos grasos, los cuales se encuentran principalmente en la parte superior y eran de un color café oscuro.

Además, los rendimientos específicos de consumo de glicerina, conforme el crecimiento de biomasa, no fueron arriba de 100%. Lo cual indica que la cepa no consumió más de la glicerina, ya que el más alto fue de 0.1104 g/g correspondiente a la fermentación de 20 g/L. Tomando en cuenta que la fuente de carbono principal y con mayor concentración disponible era la glicerina y, que las adaptaciones se enfocaron en este sustrato y que además se observó un consumo en todas las fermentaciones, se estableció que los ácidos grasos no fueron consumidos durante la fermentación y que la cantidad que ingreso fue la misma que la que salió del reactor.

También, en el espectro IR de la glicerina en la Figura 62 se identificaron los picos principales característicos de la glicerina, los cuales fueron principalmente el (OH) el cual se encuentra en 3,307.15 cm^{-1} como se puede observar en la figura el pico es pronunciado y se encuentra en el rango de 3,400-3,200 cm^{-1} , lo cual es lo esperado para una asociación polimérica, puesto que generalmente son amplios. Además, que al tener tres (OH) en la estructura de la glicerina, también se esperaba que el pico fuera pronunciado. Junto con esto, la vibración de torsión del grupo OH se observó en 1,027.51 cm^{-1} que se encuentra alrededor de 1050 cm^{-1} , lo cual infiere que se trata de un alcohol primario, puesto que es un pico fuerte. También, se observa en la región de 1,404.82 cm^{-1} la torsión del enlace (CO) de la glicerina que va acompañado de la vibración OH, el cual se encuentra en un rango de 1,410-1,310 cm^{-1} para alcoholes terciarios, por lo que la glicerina presenta otros tipos de alcoholes.

Con la misma forma, otro pico que se identificó que forma parte de la estructura de la glicerina fue el que se encuentra en 2,924.89 cm^{-1} que corresponde a los alcanos (CH) de los enlaces asimétricos y así

mismo hay un doble pico en $2,854.55 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde al mismo grupo. Pero, en este caso la cadena es simétrica, es decir que vibra en la misma dirección. Finalmente, para demostrar que la muestra de glicerina de biodiesel corresponde a glicerina, se realizó un espectro de glicerina con 98% de pureza y se compararon en la Figura 63 y se puede observar cómo es que la glicerina procedente del biodiesel tiene los picos de los grupos funcionales en el mismo rango cm^{-1} que la de la glicerina con 98% de pureza. Cabe notar que, los picos como el (OH) no eran tan amplios como el de la glicerina pura, esto es debido a que la concentración de la glicerina del biodiesel era de $79.7088 \pm 6.5524\%$, por lo que los picos eran de menor proporción.

IX. CONCLUSIONES

1. Con las adaptaciones de las tres cepas bacterianas se demostró que *B. megaterium* es la que presentó mayor formación de biomasa y consumo de glicerina en comparación con las otras cepas, con un rendimiento ($Y_{x/s}$) de crecimiento conforme el consumo de sustrato de 0.0469 g/g, 0.0023 g/g para *B. cereus* y 0.0314 g/g para *B. subtilis*. Además, también presentó un consumo de glicerina significativo en comparación con *B. cereus* y *B. subtilis* con un valor P de 0.013 en comparación con *B. subtilis* y de 0.012 en comparación con *B. cereus* en el medio de sales formulado para su adaptación y propagación con 15 g/L de glicerina de biodiesel y 1 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.
2. A partir de las tres fermentaciones de *B. megaterium* en 1 L de medio formulado se determinó que la condición carbono nitrógeno que favorece el crecimiento fue con 20 g/L de glicerina residual del proceso de producción de biodiesel como fuente de carbono y, con 1 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a 0.3 L/min, pH de 7, 180 rpm y 35°C. Con 20 g/L de glicerina se obtuvo un rendimiento de crecimiento ($Y_{x/s}$) de 0.11048 g/g, seguido de 0.05681 g/g para 15 g/L y finalmente 0.0891 g/g para 30 g/L.
3. A partir de la extracción del PHA producido por *B. megaterium* en las fermentaciones con 15 g/L, 20 g/L y 30 g/L de glicerina residual del proceso de biodiesel, se encontró que la relación carbono/nitrógeno que favoreció el rendimiento de producción de PHA y el crecimiento de la bacteria fue con 20 g/L de glicerina como fuente de carbono y con 1 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Donde se obtuvo un rendimiento específico de producto conforme el sustrato ($Y_{p/s}$) de 0.06919 g/g y un rendimiento específico de producción de PHA conforme el crecimiento de biomasa ($Y_{p/x}$) de 0.62623 g/g, llegando a obtener 0.7320 ± 0.0005 g de polihidroxialcanoato, para 15 g/L se obtuvo un ($Y_{p/s}$) de 0.0296 g/g y un ($Y_{p/x}$) de 0.5203 g/g obteniendo 0.4329 g de PHA y para 30 g/L se obtuvo un ($Y_{p/s}$) de 0.0124 g/g y un ($Y_{p/x}$) de 0.4798 g/g obteniendo 0.5402 g de PHA, en una fermentación de 1 L a 0.3 L/min, pH de 7, 180 rpm y 35°C durante 120 horas.
4. A partir de la tinción de negro de Sudán se evaluó la producción de PHA en cada una de las fermentaciones de *B. megaterium*, con relación carbono/ nitrógeno de 15:1, 20:1 y 30:1 de 1 L y en cada fermentación se observó la presencia de gránulos negro-azulados dentro de los bacilos. A partir de los espectros IR del producto obtenido por cada fermentación se identificaron los grupos funcionales; carbonilo, alcanos y alcoholes, los cuales son picos característicos de la estructura del PHA. Esta evidencia confirma la presencia del PHA en el producto obtenido.

X. RECOMENDACIONES

1. Establecida la concentración de carbono: nitrógeno que optimiza la producción de PHA a partir de *B. megaterium* y el consumo de la glicerina residual del proceso de producción de biodiesel, se recomienda establecer un estudio donde se evalué la influencia del flujo de aire, acidez del medio, concentración de nutrientes secundarios, temperatura y velocidad de agitación respecto a la producción de PHA, para poder generar posteriormente un modelo que incluya todas las variables que influyen en la reacción.
2. Evaluar la producción de PHA a partir de *B. megaterium* en una mayor escala, para generar un modelo del escalamiento que permita llevar el proceso a un nivel industrial.
3. Se recomienda estudiar las condiciones que maximicen el rendimiento de la producción de PHA a partir de las cepas bacterianas *B. subtilis* y *B. cereus*, puesto que se observó, mediante la tinción de negro de Sudán, que son capaces de producir el biopolímero a partir de la glicerina residual del proceso de biodiesel, a 180 rpm y 35°C durante 120 horas.
4. Se recomienda estudiar la influencia del tipo de filtración sobre los ácidos grasos presentes en la glicerina residual del proceso de biodiesel para evitar contaminación en el polihidroxialcanoato obtenido.
5. Realizar un estudio genómico de la cepa *B. megaterium* ATCC 14581, para evaluar la factibilidad de realizar una modificación genética de manera que se optimice la acumulación de polihidroxialcanoatos intracelularmente.
6. Se recomienda utilizar la técnica de lotes alimentados para evaluar si con un flujo constante de medio de cultivo se puede aumentar los rendimientos de crecimiento de *Bacillus megaterium* y producción de polihidroxialcanoatos.

XI. REFERENCIAS

- Alvarado, E., Pereira, R., Vega, J. y Esquivel, M. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus megaterium* DSM 32 from residual glycerol of the bioenergy industry. [Producción de polihidroxibutirato (PHB) por *Bacillus megaterium* DSM 32 a partir de glicerol residual de la industria bioenergética]. *Revista de Materiales Renovables*. Vol.5, No.3-4, pp. 323-331: Estados Unidos.
- Asociación Internacional de Productores de Plásticos (IAPC). (2020). *Análisis del rendimiento del sector del plástico europeo en 2019*. Plásticos: los hechos 2020: Bélgica.
- Attarbach, T., Kingsley, M. y Spallina, V. (2023). *New trends on crude glycerol purification: A review*. *Fuel*, 340 Article 127485 [Nuevas tendencias en la purificación de glicerol crudo: una revisión]
- Bai, B., Yan, C. y Li, G. (2017). *Study on the Characteristics of Straw Fermentation by Bacillus megaterium MYB3*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Institute of Physics Publishing, China.
- Banacore, A. (2014). *Estudio de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por Bacillus sp. utilizando glicerol como fuente de carbono*. UR. FC: Uruguay
- Benintende, S., Sanchez, C. y Sterren, M. (2002). *Crecimiento bacteriano*. Universidad Nacional de Entre Ríos: Argentina.
- Blanco, K. (2010). *Detección de gránulos de polihidroxialcanoatos en la cepa USBA 355 Tistlia consotensis*. Pontificia Universidad Javeriana: Colombia.
- Böll, H., & Plastic, B. F. F. (2019). *Atlas del plástico. Datos y cifras sobre el mundo de los polímeros sintéticos*. Fundación Heinrich Böll: El Salvador.
- Centro de Desarrollo Tecnológico LEIA. (2007). *Bioplásticos*. Federación Española de Centros Tecnológicos: España.

- Carr, L. (2020). *Reducir la contaminación por plásticos de un solo uso: un enfoque unificado*. Organización de las Naciones Unidas.
- Castañeda, M. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. Universidad Tecnológica Nacional de la Plata: Argentina.
- Chen, G., Chen, X., Wu, F. y Chen, J. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality [Polihidroxicanoatos (PHA) hacia la competitividad en costos y la funcionalidad]. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.001>
- Chilakamarry, C., Sakinah, A., Zularisam, A. y Pandey, A. (2021). Glycerol waste to value added products and its potential applications [Residuos de glicerol para productos de valor añadido y sus potenciales aplicaciones]. *Syst Microbiol and Biomanuf*; 1(4), 378–396.
- Delgado, A. y Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico*. 79(1), 93-101 <http://dx.doi.org/10.23850/22565035.139>
- Dhabhai, R., Ahmadifeijani, E., Dalai, A. y Reaney, M. (2016). Purification of crude glycerol using a sequential physico-chemical treatment, membrane filtration, and activated charcoal adsorption [Purificación de glicerol crudo mediante tratamiento físico-químico secuencial, filtración por membrana y adsorción con carbón activado]. *Separation and Purification Technology*, 168, 101-106.
- Esquivel, O., Ceballos, R. y Valenzuela, A. (2021). *Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación*. Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala.
- Geyer, R., Jambeck, J., y Law, K. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made [Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados]. *Science advances*, 3(7).
- Gómez, J., Velasco, R., Del Cerro, C., De La Mata, I. y Mora, A. (2019). Engineering of *Bacillus megaterium* for improving PHA production from glycerol [Ingeniería de *Bacillus megaterium* para

- mejorar la producción de PHA a partir de glycerol]. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 27(3), 64-72
- Gómez, J., Velasco, R., Marín, N., Ruíz, O., Correa, G. y Mora, A. (2020). Fed-batch production and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium* LVN01 from residual glycerol [Producción en lotes alimentados y caracterización de polihidroxibutirato por *Bacillus megaterium* LVN01 a partir de glicerol residual]. *Dyna*, 87(214), 111-120.
- Gómez Serreto, J. G. (2016). *Diagnóstico del impacto del plástico - botellas sobre el medio ambiente: un estado del arte* [Tesis de pregrado, Universidad Santo Tomás]. Repositorio Universidad Santo Tomás de Colombia.
- González, V. (2018). *Estudio, caracterización y diseño de biorreactor para su incorporación en planta de abatimiento de arsénico y antimonio de ecometales.*[Tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio Académico Universidad de Chile.
- González, Y., Meza, J. C., González, O., y Córdova, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115.
- Gutiérrez, M. (2008). *Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género Bacillus de origen marino.* [Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.] Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Hernández, J., Acevedo, J., Valdés, C., y Posso, F. (2015). Evaluación de rutas alternativas de aprovechamiento de la glicerina obtenida en la producción de biodiésel: una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 33(1), 126-148. <http://dx.doi.org/10.14482/inde.33.1.5573>
- Hipkiss, A., Cartwright, S., Brom Ley, C., Gross, S. y Bill, R. (2013). Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? [Carnosina: ¿puede el conocimiento de sus acciones sobre el metabolismo energético y la homeostasis de las proteínas contribuir a su potencial terapéutico?] *Chemistry Central Journal*, 7, 1-9.

- Koller, M. y Obruča, S. (2022). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates. Recuperado de: glycerol: A review [Producción biotecnológica de polihidroxicanoatos. Recuperado de glicerol: Una revisión.]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102333.
- Kovárová, K. y Egli, T. (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics [Cinética de crecimiento de células microbianas suspendidas: del crecimiento controlado por un solo sustrato a la cinética de sustrato mixto]. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 646-666
- PlasticsEurope. (2022). *Plastics – the facts 2022*. Retrieved March 14, 2023.
- Levenspiel, O. (1987). *Ingeniería de lets Reacciones Químicas*. Edición Editorial Reverté.
- Liu, S. (2017). *Bioprocess engieneering; kinetics, sustainability, and reactor design* [Ingeniería de bioprocesos; cinética, sostenibilidad y diseño de reactores]. Second edition. Chapter 11. How cells growth.
- López, M. (2017). Bacterias productoras de polímeros para su utilización como plásticos biodegradables. In Forum calidad (Vol. 28, No. 283, pp. 46-51). *Forum Calidad*.
- Mejía, S. (2016). *Optimización del medio de cultivo para Metarhizium anisopliae*. México. Instituto politecnico nacional.
- Méndez, J. (2017). *Impacto de los residuos plásticos en ecosistemas de Guatemala: Diagnóstico y perspectivas*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Mussengue, C. (2016). *Biocombustible y sostenibilidad: La transición energética hacia fuentes renovables*. Eco Press.
- Nishihara, T., Ichikawa, T. y Kondo, M. (1980). Location of elements in ashed spores of *Bacillus megaterium* [Ubicación de elementos en esporas de *Bacillus megaterium* en cenizas] *Microbiology and Immunology*, 24(6), 495-506

- Oliveira Schmidt, V., Santos, E., Oliveira, D., Ayub, M., Cesca, K., Cortivo, P. y Hickert, L. (2022). Production of Polyhydroxyalkanoates by *Bacillus megaterium*: Prospecting on Rice Hull and Residual Glycerol Potential [Producción de polihidroxialcanoatos por *Bacillus megaterium*: prospección sobre cáscara de arroz y potencial de glicerol residual.]. *Biomass*, 2(4), 412-425. Universidad Autónoma de Barcelona.
- de Oliveira, V. K., Santos, E., de Oliveira, D., Ayub, M., Cesca, K., Cortivo, P. y Hickert, L. R. (2022). Production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus megaterium*: prospecting on rice hull and residual glycerol potential [Producción de polihidroxialcanoatos por *Bacillus megaterium*: prospección del potencial de cascarilla de arroz y glicerol residual]. *Biomass*, 2(4), 412-425.
- Oliveira, V., Santos, E., Oliveira, D., Ayub, M., Cesca, K., Cortivo, P. y Hickert, L. (2022). Production of Polyhydroxyalkanoates by *Bacillus megaterium*: Prospecting on Rice Hull and Residual Glycerol Potential [Producción de polihidroxialcanoatos por *Bacillus megaterium*: prospección del potencial de cascarilla de arroz y glicerol residual]. *Biomass*, 2(4), 412-425.
- Pitsevich, A. Kozlovskaya, E. y Doroshenko, I. (2016). Vibrational spectra and structure of polyhydroxyalkanoates: Theoretical and experimental study. [Espectros vibracionales y estructura de polihidroxialcanoatos] *Journal of Applied Spectroscopy* Estudio teórico y experimental.
- Pitsevich, G., Kozlovskaya, E., y Doroshenko, I. (2003). Analysis of the carbonyl group stretching vibrations in some structural fragments of poly-3-hydroxybutyrate [Análisis de las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo en algunos fragmentos estructurales de poli-3-hidroxibutirato. Belarusian State University, Minsk, Belarus
- Polich, N. (2019). *Glicerol, residuo de la producción de biodiesel: posibles alternativas como materia prima para productos de mayor valor agregado.*
- Ramos, F., Estrada, V., Diaz, M. y Villar, M. (2014). *Optimización de la Producción de Poli (β -hidroxibutirato) a partir de Glicerol.*
- Robinson, P. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692135/>

- Rojas, E., Concha, J. y Sánchez, S. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*: BSAA, 14(1), 19-26.
- Rojas, E., Hoyos, J., y Mosquera, S. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 14(1), 19-26.
- Rolon, H., Acevedo, C. y Villamizar, Y. (2019). Thermal analysis, mathematical modeling and simulation of a discontinuous agitation reactor for specific volume [Análisis térmico, modelado matemático y simulación de un reactor de agitación discontinua para volumen específico]. *UIS INGENIERIAS*, 18(1), 39-48.
- Ruzal, S. (1994). *Caracterización fisiológica y genética de la respuesta a estrés osmótico en Bacillus Subtilis*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Samrot, A., Samanvitha, S., Shobana, N., Renitta, E., Senthilkumar, P., Kumar, S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M. y Prakash, P. (2021). The Synthesis, Characterization and Applications of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and PHA-Based Nanoparticles. *Polymers* 13, 3302. <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- Sánchez, B. (2020). Plásticos, microplásticos, artes de pesca...: La acción de la Unión Europea contra la basura marina. *Construcción jurídica de un espacio marítimo común europeo*, 947-978.
- Secretaría de Economía. (2013). *Industria del plástico (Anteproyecto de norma mexicana)*. Comisión Nacional de Normalización y Certificación de Productos (CNCPP). México.
- Tan, Y., Zhang, R., Liu, Z., Li, B. y Yuan, Y. (2022). Microbial adaptation to enhance stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 13, 888746.
- Tripathi, N. y Sapra, A. (2023). Gram Staining. *Statperls Publishing*.
- Trujillo, M. y Valdez, N. (2009). El uso de biorreactores desechables en la industria biofarmacéutica y sus implicaciones en la ingeniería. *Dyna*, 76(158), 275-283.

- Uscanga, B., Pacheco, J. y Ibarra, J. (2016). *Microbiología industrial: manual de prácticas de laboratorio*. Universidad de Guadalajara. Editorial EUNED.
- Vikromvarasiri, N., Shirai, T., y Kondo, A. (2021). Metabolic engineering design to enhance (R, R)-2, 3-butanediol production from glycerol in *Bacillus subtilis* based on flux balance analysis. *Microbial cell factories*, 20(1), 1-11.
- Wade, L. (2017). *Química Orgánica* (Vol. 2). Editorial Pearson Educación.
- Wei, Y., Chen, W., Huang, C., Wu, H., Sun, Y., Lo, C. y Janarthanan, O. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 252-265.
- Zambrano-Sánchez, C. C., Latorre-Castro, G. B., & Carrillo-Anchundia, B. J. (2020). Materiales poliméricos y el impacto ambiental: Una revisión. *Polo del Conocimiento*, 5(8), 518–539.

XII. ANEXOS

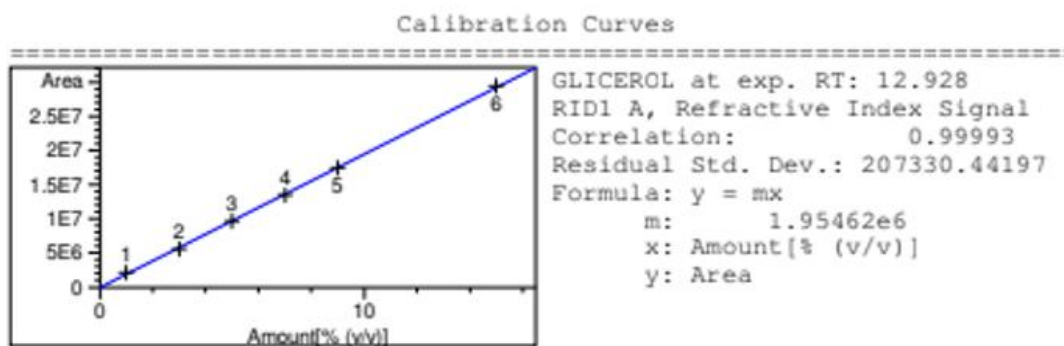
A. Datos Originales de la Experimentación

En la figura 68 se muestra la curva de calibración obtenida con glicerina pura al 98%, utilizada para la determinación de la concentración en muestras desconocidas

Figura 68.

Curva de calibración de glicerina

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (v/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
12.928	1	1.00000	2.15134e6	4.64826e-7	GLICEROL
	2	3.00000	5.56143e6	5.39429e-7	
	3	5.00000	9.68763e6	5.16122e-7	
	4	7.00000	1.35190e7	5.17788e-7	
	5	9.00000	1.75011e7	5.14252e-7	
	6	15.00000	2.95257e7	5.08031e-7	



Nota. En la figura se muestra la curva de calibración de glicerina realizada a partir de HPLC con soluciones de 1,2,3,4,5 y 6% de glicerina al 98%.

En la Tabla 22 se muestran los otros componentes presentes en la glicerina residual del proceso de biodiesel utilizada en el ensayo.

Tabla 22.

Concentración de ácido acético, ácido láctico, metanol y etanol presente en la glicerina cruda proveniente del proceso de biodiesel determinada por HPLC.

No. muestra	Glicerina (%v/v)	Ác. acético (% p/v)	Ác. láctico (% p/v)	Etanol (% p/v)	Metanol (% p/v)
1	1.69040	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
2	1.60550	0.00000	0.00000	0.00000	0.19319
3	1.48663	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

En la Tabla 23 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación a caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 23.

Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.003	0.041	0.135
<i>B. Megaterium 2</i>	0.004	0.070	0.145
<i>B. Megaterium 3</i>	0.001	0.042	0.075
<i>B. Cereus 1</i>	0.055	0.093	0.140
<i>B. Cereus 2</i>	0.007	0.035	0.080
<i>B. Cereus 3</i>	0.004	0.024	0.070
<i>B. Subtilis 1</i>	0.027	0.133	0.195
<i>B. Subtilis 2</i>	0.011	0.170	0.260
<i>B. Subtilis 3</i>	0.5632	0.125	0.230

En la Tabla 24 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación a caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 24.

Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.011	0.071	0.130
<i>B. Megaterium 2</i>	0.012	0.094	0.185
<i>B. Megaterium 3</i>	0.006	0.044	0.105
<i>B. Cereus 1</i>	0.011	0.083	0.145
<i>B. Cereus 2</i>	0.006	0.052	0.110
<i>B. Cereus 3</i>	0.006	0.032	0.070
<i>B. Subtilis 1</i>	0.016	0.075	0.105
<i>B. Subtilis 2</i>	0.021	0.020	0.055
<i>B. Subtilis 3</i>	0.018	0.080	0.120

En la Tabla 25 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación a caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 25.

Peso de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.010	0.831	1.450
<i>B. Megaterium 2</i>	0.015	0.432	0.888
<i>B. Megaterium 3</i>	0.008	0.644	1.110
<i>B. Cereus 1</i>	0.012	0.083	0.125
<i>B. Cereus 2</i>	0.009	0.187	0.300
<i>B. Cereus 3</i>	0.006	0.092	0.162
<i>B. Subtilis 1</i>	0.008	0.254	0.438
<i>B. Subtilis 2</i>	0.004	0.150	0.300
<i>B. Subtilis 3</i>	0.010	0.210	0.375

En la Tabla 26 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación en medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 26.

Peso de las cepas bacterianas en la adaptación en el medio de sales formulado 15 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.116	0.132	0.168
<i>B. Megaterium 2</i>	0.071	0.122	0.187
<i>B. Megaterium 3</i>	0.088	0.112	0.131
<i>B. Cereus 1</i>	0.010	0.011	0.012
<i>B. Cereus 2</i>	0.024	0.009	0.006
<i>B. Cereus 3</i>	0.013	0.008	0.006
<i>B. Subtilis 1</i>	0.035	0.070	0.041
<i>B. Subtilis 2</i>	0.024	0.400	0.762
<i>B. Subtilis 3</i>	0.030	0.045	0.062

En la Tabla 27 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para *B. megaterium* en la adaptación en medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 27.

Peso de *B. megaterium* en la adaptación en el medio de sales formulado 20 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.014	0.100	0.132
<i>B. Megaterium 2</i>	0.015	0.070	0.123
<i>B. Megaterium 3</i>	0.010	0.050	0.183

En la Tabla 28 se muestra la biomasa obtenida por triplicado para *B. megaterium* en la adaptación en medio de sales formulado con 30 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 28.

Peso de *B. megaterium* en la adaptación en el medio de sales formulado 30 g/L.

Cepa bacteriana	<i>Peso (g ± 0.0007)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.015	0.080	0.123
<i>B. Megaterium 2</i>	0.010	0.050	0.103
<i>B. Megaterium 3</i>	0.011	0.055	0.115

En la Tabla 29 se muestra el consumo de glicerina para cada cepa bacteriana durante la adaptación a caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina, evaluado a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 29.

Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	<i>Concentración de glicerina (g/L)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium</i>	20.343	16.013	14.602
<i>B. Cereus</i>	20.343	16.489	16.328
<i>B. Subtilis</i>	20.343	16.501	15.395

En la Tabla 30 se muestra el consumo de glicerina para cada cepa bacteriana durante la adaptación a caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina, evaluado a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 30.

Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	<i>Concentración de glicerina (g/L)</i>		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium</i>	198.783	190.024	186.980
<i>B. Cereus</i>	198.783	192.205	188.671
<i>B. Subtilis</i>	198.783	189.112	187.332

En la Tabla 31 se muestra el consumo de glicerina para cada cepa bacteriana durante la adaptación a caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina, evaluado a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 31.

Concentración de glicerina en la adaptación de las cepas bacterianas al medio de caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Concentración de glicerina (g/L)		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium</i>	402.102	389.312	389.221
<i>B. Cereus</i>	402.102	380.011	377.923
<i>B. Subtilis</i>	402.102	390.390	385.453

En la Tabla 32 se muestra el consumo de glicerina por triplicado para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en la adaptación en medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 32.

Concentración de glicerina en la adaptación de *B. megaterium* al medio de sales con 15 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Concentración de glicerina (g/L)		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	15.690	7.123	2.542
<i>B. Megaterium 2</i>	15.690	8.223	3.141
<i>B. Megaterium 3</i>	15.690	5.487	3.556
<i>B. Cereus 1</i>	15.690	9.098	9.435
<i>B. Cereus 2</i>	15.690	11.436	10.449
<i>B. Cereus 3</i>	15.690	11.874	13.244
<i>B. Subtilis 1</i>	15.690	12.253	10.988
<i>B. Subtilis 2</i>	15.690	9.470	8.999
<i>B. Subtilis 3</i>	15.690	10.142	9.987

En la Tabla 33 se muestra el consumo de glicerina por triplicado para *B. megaterium* en la adaptación en medio de sales formulado con 20 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 33.

Concentración de glicerina en la adaptación de *B. megaterium* al medio de caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Concentración de glicerina (g/L)		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	20.986	5.425	0.477
<i>B. Megaterium 2</i>	20.986	8.346	0.884
<i>B. Megaterium 3</i>	20.986	6.483	1.655

En la Tabla 34 se muestra el consumo de glicerina por triplicado para *B. megaterium* en la adaptación en medio de sales formulado con 30 g/L de glicerina, evaluada a las 0, 72 y 120 horas.

Tabla 34.

Concentración de glicerina en la adaptación de *B. megaterium* al medio de caldo nutritivo con 30 g/L de glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Concentración de glicerina (g/L)		
	0 (h)	72 (h)	120 (h)
<i>B. Megaterium 1</i>	30.379	25.345	24.427
<i>B. Megaterium 2</i>	30.379	17.651	14.113
<i>B. Megaterium 3</i>	30.379	19.021	15.019

En la Tabla 35 se muestran las concentraciones de los compuestos generados y consumidos durante la fermentación de 1 L con 15 g/L de glicerina, evaluadas a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas

Tabla 35.

Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 15 g/L de glicerina.

Tiempo (± 0.08 h)	Ác. acético (% p/v)	Ác. láctico (% p/v)	Etanol (% p/v)	Metanol (% p/v)
0.00	0.2112	0.0123	0.1543	0.0000
24.00	0.3589	0.0189	0.5415	0.0000
48.00	0.3473	0.0420	0.3641	0.0000
72.00	0.2585	0.2721	0.0884	0.7293
120.00	0.2585	0.0000	0.0884	0.0000

En la Tabla 36 se muestran las concentraciones de los compuestos generados y consumidos durante la fermentación de 1 L con 20 g/L de glicerina, evaluadas a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas

Tabla 36.

Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 20 g/L de glicerina.

Tiempo (± 0.08 h)	Ác. acético (% p/v)	Ác. láctico (% p/v)	Etanol (% p/v)	Metanol (% p/v)
0.00	0.0000	0.0000	0.0000	3.0777
24.00	0.4108	0.4091	0.0000	2.1630
48.00	0.3294	0.3876	0.0000	2.1544
72.00	0.5282	0.3796	0.0000	2.1250
120.00	0.4145	0.3391	0.5024	2.8707

En la Tabla 37 se muestran las concentraciones de los compuestos generados y consumidos durante la fermentación de 1 L con 30 g/L de glicerina, evaluadas a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas

Tabla 37.

Concentraciones de HPLC obtenidas de los subproductos generados en la fermentación de 30 g/L de glicerina.

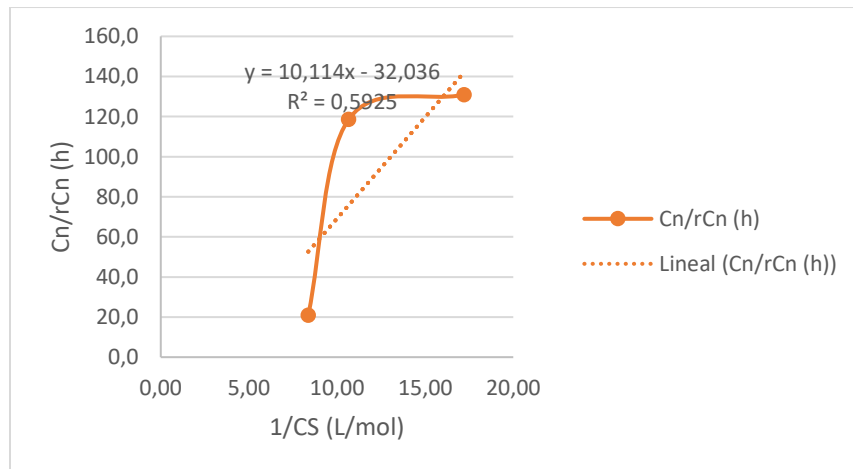
Tiempo (± 0.08 h)	Ác. acético (% p/v)	Ác. láctico (% p/v)	Etanol (% p/v)	Metanol (% p/v)
0.00	0.4224	0.0104	0.2360	0.0000
24.00	0.4052	0.0138	0.2806	0.0000
48.00	0.3076	0.0000	0.1897	0.0000
72.00	0.1789	0.0000	0.1405	0.0000
120.00	0.1018	0.0000	0.1863	0.0000

B. Datos Calculados

En la figura se observa el gráfico de Monod del crecimiento elaborado en Microsoft Excel para evaluar como la velocidad de crecimiento cambia conforme la biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7. Los valores se utilizaron para plantear el modelo cinético en Berkeley

Figura 69.

Crecimiento de *B. megaterium* y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 15 g/L.

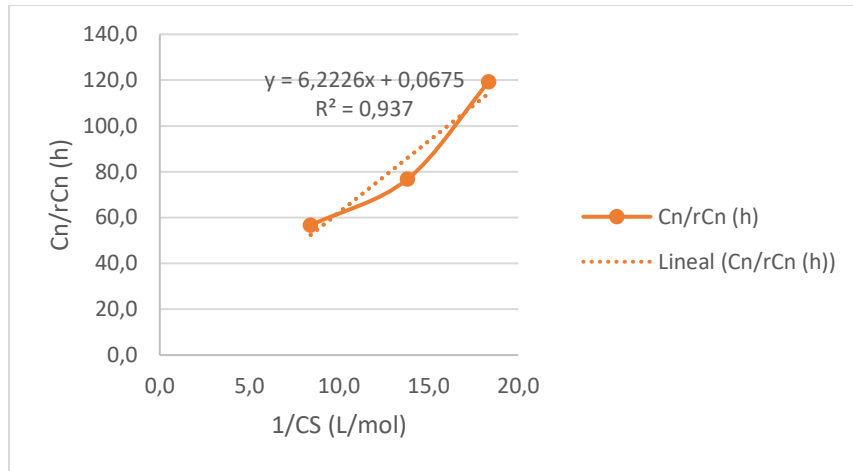


En la figura se observa el gráfico de Monod del crecimiento elaborado en Excel para evaluar como la velocidad de crecimiento cambia conforme la biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C,

180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7. Los valores se utilizaron para plantear el modelo cinético en Berkeley.

Figura 70.

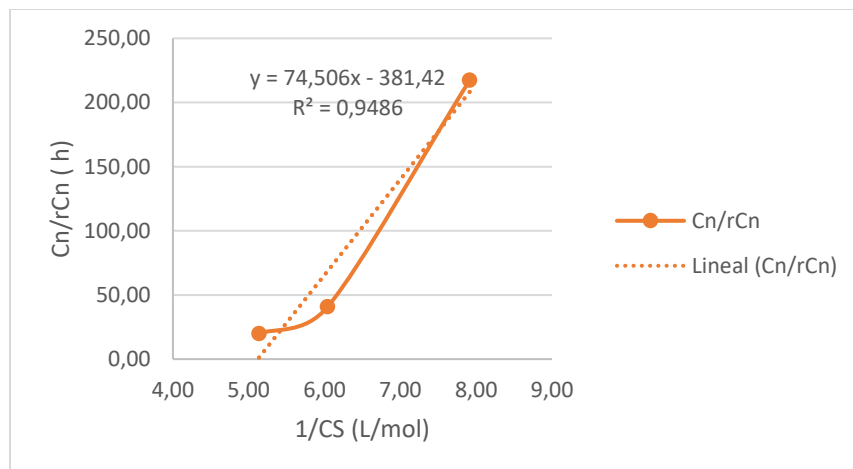
Crecimiento de *B. megaterium* y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 20 g/L.



En la figura se observa el gráfico de Monod del crecimiento elaborado en Microsoft Excel para evaluar como la velocidad de crecimiento cambia conforme la biomasa en un medio de sales de volumen de 1 L a 35°C, 180 rpm, flujo de aire de 0.3 L/min y pH de 7. Los valores se utilizaron para plantear el modelo cinético en Berkeley.

Figura 71.

Crecimiento de *B. megaterium* y consumo de glicerina en un medio de glicerina con 30 g/L.



La Tabla 38 presenta los valores estadísticos obtenidos del crecimiento de las diferentes cepas bacterianas durante su adaptación en caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina

Tabla 38.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.11567	0.01714	0.13200	0.00088	0.00015	0.02969	0.01212
<i>B. Cereus</i>	0.07467	0.00453	0.07300	0.00006	0.00001	0.00785	0.00320
<i>B. Subtilis</i>	0.21167	0.01927	0.21800	0.00111	0.00019	0.03337	0.01362

La Tabla 39 muestra los rendimientos específicos de crecimiento de biomasa en relación con el consumo de sustrato para cada una de las cepas bacterianas evaluadas por triplicado en caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina.

Tabla 39.

Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S \pm (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.1840	0.0056
<i>B. Megaterium 2</i>	0.1965	0.0054
<i>B. Megaterium 3</i>	0.1031	0.0074
<i>B. Cereus 1</i>	0.1694	0.0069
<i>B. Cereus 2</i>	0.1455	0.0074
<i>B. Cereus 3</i>	0.1315	0.0078
<i>B. Subtilis 1</i>	0.3348	0.0049
<i>B. Subtilis 2</i>	0.4962	0.0041
<i>B. Subtilis 3</i>	0.4344	0.0043

En la Tabla 40 se muestran los valores estadísticos de los rendimientos específicos de crecimiento obtenidos a partir del consumo de sustrato por las cepas bacterianas evaluadas en caldo nutritivo con 20 g/L de glicerina.

Tabla 40.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 20 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.16120	0.02389	0.18397	0.00171	0.00029	0.04138	0.01689
<i>B. Cereus</i>	0.14879	0.00903	0.14547	0.00024	0.00004	0.01563	0.00638
<i>B. Subtilis</i>	0.42179	0.03839	0.43441	0.00442	0.00074	0.06650	0.02715

En la Tabla 41 muestra los valores estadísticos obtenidos del crecimiento de las diferentes cepas bacterianas durante su adaptación en caldo nutritivo con 200 g/L de glicerina

Tabla 41.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.1305	0.0181	0.1192	0.0010	0.0002	0.0314	0.0128
<i>B. Cereus</i>	0.1006	0.0164	0.1036	0.0008	0.0001	0.0284	0.0116
<i>B. Subtilis</i>	0.0751	0.0169	0.0894	0.0009	0.0001	0.0293	0.0120

En la Tabla 42 se muestran los rendimientos específicos de crecimiento de biomasa con respecto al consumo de sustrato para cada una de las cepas bacterianas, calculados durante la adaptación a caldo nutritivo con 200 g/L.

Tabla 42.

Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S \pm (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.0808	0.0058
<i>B. Megaterium 2</i>	0.1175	0.0049
<i>B. Megaterium 3</i>	0.0671	0.0064
<i>B. Cereus 1</i>	0.1059	0.0055
<i>B. Cereus 2</i>	0.0820	0.0063
<i>B. Cereus 3</i>	0.0509	0.0079
<i>B. Subtilis 1</i>	0.0625	0.0067
<i>B. Subtilis 2</i>	0.0239	0.0108
<i>B. Subtilis 3</i>	0.0710	0.0063

En la Tabla 43 se muestran los valores estadísticos correspondientes a los rendimientos específicos de las cepas bacterianas cultivadas con 200 g/L de glicerina.

Tabla 43.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 200 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.0885	0.0123	0.0808	0.0005	0.0001	0.0213	0.0087
<i>B. Cereus</i>	0.0796	0.0130	0.0820	0.0005	0.0001	0.0225	0.0092
<i>B. Subtilis</i>	0.0524	0.0118	0.0625	0.0004	0.0001	0.0206	0.0084

En la Tabla 44 se presentan los valores estadísticos relacionados con el crecimiento de las cepas bacterianas adaptadas a caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina.

Tabla 44.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	1.1380	0.1344	1.1016	0.0542	0.0090	0.2329	0.0951
<i>B. Cereus</i>	0.1872	0.0437	0.1569	0.0057	0.0010	0.0757	0.0309
<i>B. Subtilis</i>	0.3634	0.0315	0.3654	0.0030	0.0005	0.0545	0.0223

En la Tabla 45 se muestran los rendimientos específicos obtenidos por cada cepa bacteriana en función del consumo de sustrato en caldo nutritivo con 400 g/L de glicerina.

Tabla 45.

Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S \pm (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.8941	0.0018
<i>B. Megaterium 2</i>	0.5420	0.0023
<i>B. Megaterium 3</i>	0.6842	0.0020
<i>B. Cereus 1</i>	0.0375	0.0060
<i>B. Cereus 2</i>	0.0963	0.0038
<i>B. Cereus 3</i>	0.0519	0.0051
<i>B. Subtilis 1</i>	0.2062	0.0031
<i>B. Subtilis 2</i>	0.1420	0.0037
<i>B. Subtilis 3</i>	0.1756	0.0034

En la Tabla 46 se presentan los valores estadísticos de los rendimientos específicos registrados para las cepas bacterianas cultivadas con 400 g/L de glicerina.

Tabla 46.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación de caldo nutritivo con 400 g/L.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.7068	0.0835	0.6842	0.0209	0.0035	0.1446	0.0590
<i>B. Cereus</i>	0.0619	0.0145	0.0519	0.0006	0.0001	0.0250	0.0102
<i>B. Subtilis</i>	0.1746	0.0151	0.1756	0.0007	0.0001	0.0262	0.0107

En la Tabla 47 se presentan los valores estadísticos del crecimiento de las cepas bacterianas adaptadas a un medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina.

Tabla 47.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de las cepas bacterianas en la adaptación en el medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.07057	0.01891	0.04575	0.00107	0.00018	0.03275	0.01891
<i>B. Cereus</i>	0.00250	0.00742	0.00250	0.00017	0.00003	0.01285	0.00525
<i>B. Subtilis</i>	0.01937	0.00758	0.03250	0.00017	0.00003	0.01312	0.00536

En la Tabla 48 se presentan los valores estadísticos del consumo de glicerina por parte de las cepas bacterianas durante su adaptación a medio de sales con 15 g/L de glicerina.

Tabla 48.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del consumo de glicerina en la adaptación de las cepas en el medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	12.0405	0.2403	11.9792	0.1732	0.0289	0.4161	0.1699
<i>B. Cereus</i>	4.0775	0.9300	4.6714	2.5945	0.4324	1.6107	0.6576
<i>B. Subtilis</i>	5.1287	0.4687	5.1328	0.6592	0.1099	0.8119	0.3315

En la Tabla 49 se muestran los rendimientos específicos obtenidos por las diferentes cepas bacterianas en relación con el consumo de glicerina en medio de sales con 15 g/L.

Tabla 49.

Rendimientos específicos de crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 15 g/L con glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S \pm (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.0336	0.0087
<i>B. Megaterium 2</i>	0.0778	0.0059
<i>B. Megaterium 3</i>	0.0294	0.0097
<i>B. Cereus 1</i>	0.0023	0.0400
<i>B. Cereus 2</i>	-	-
<i>B. Cereus 3</i>	-	-
<i>B. Subtilis 1</i>	0.0121	0.0253
<i>B. Subtilis 2</i>	0.9652	0.0024
<i>B. Subtilis 3</i>	0.0507	0.0111

En la Tabla 50 se presentan los valores estadísticos del consumo de sustrato por parte de las cepas bacterianas durante su adaptación en medio de sales formulado con 15 g/L de glicerina.

Tabla 50.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de biomasa conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 15 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Cepa bacteriana	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
<i>B. Mega</i>	0.0469	0.0127	0.0336	0.0005	0.0001	0.0219	0.0089
<i>B. Cereus</i>	0.0023	0.0203	0.0023	0.0004	0.0001	0.0203	0.0083
<i>B. Subtilis</i>	0.0314	0.0136	0.0507	0.0004	0.0001	0.0193	0.0084

En la Tabla 51 se presentan los valores estadísticos del crecimiento de *B. megaterium* en medio de sales formulado con 20 y 30 g/L de glicerina.

Tabla 51.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del crecimiento de *B. megaterium* con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Concentración de glicerina (g/L)	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
20	0.13317	0.01515	0.12150	0.00069	0.00011	0.02623	0.01071
30	0.10181	0.00386	0.10444	0.00004	0.00001	0.00669	0.00273

En la Tabla 52 se presentan los valores estadísticos del consumo de glicerina por parte de *B. megaterium* cultivado en medio de sales con 20 y 30 g/L de glicerina.

Tabla 52.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana del consumo de glicerina del crecimiento de *B. megaterium* conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Concentración de glicerina (g/L)	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
20	19.98065	0.28210	20.10199	0.23875	0.03979	0.48862	0.19948
30	12.52564	2.69232	15.35993	21.74579	3.62430	4.66324	1.90376

En la Tabla 53 se presentan los valores estadísticos de los rendimientos específicos de *B. megaterium* en función del consumo de glicerina en medio de sales con 20 y 30 g/L.

Tabla 53.

Medidas de centro, medidas de variabilidad y mediana de los rendimientos específicos del crecimiento de *B. megaterium* conforme el consumo de sustrato de las cepas bacterianas en la adaptación en medio de sales con 20 y 30 g/L de glicerina del proceso de biodiesel.

Concentración de glicerina (g/L)	Media (g)	Media \pm (g)	Mediana (g)	Varianza (g^2)	Varianza \pm (g^2)	Desviación estándar (g)	Desviación \pm (g)
20	0.05319	0.00554	0.05028	0.00009	0.00002	0.00959	0.00391
30	0.08187	0.02612	0.05440	0.00205	0.0001	0.04525	0.01847

En la Tabla 54 se muestran los rendimientos específicos obtenidos por *B. megaterium* en medio de sales con 20 g/L de glicerina, evaluando su eficiencia de crecimiento.

Tabla 54.

Rendimientos específicos de crecimiento de *B. megaterium* conforme el consumo de sustrato en la adaptación en medio de sales con 20 g/L con glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S ± (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.0661	0.0049
<i>B. Megaterium 2</i>	0.0432	0.0061
<i>B. Megaterium 3</i>	0.0503	0.0058

En la Tabla 55 se presentan los rendimientos específicos de crecimiento y consumo de sustrato registrados para *B. megaterium* en medio con 30 g/L de glicerina.

Tabla 55.

Rendimientos específicos de crecimiento de *B. megaterium* conforme el consumo de sustrato en la adaptación en medio de sales con 30 g/L con glicerina de biodiesel.

Cepa bacteriana	Y X/S (g/g)	Y X/S ± (g/g)
<i>B. Megaterium 1</i>	0.1457	0.0061
<i>B. Megaterium 2</i>	0.0456	0.0066
<i>B. Megaterium 3</i>	0.0544	0.0062

En la Tabla 56 se muestra el balance de masa obtenido durante la fermentación de *B. megaterium* en condiciones con 15 g/L de glicerina.

Tabla 56.

Balance de masa de la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina.

Componente	Entrada (g)	Salida (g)
O_2	648.1944	647.1682
CO_2	0.0000	2.1165
HCl	0.0365	0.0365

Componente	Entrada (g)	Salida (g)
Agua <i>HCl</i>	0.9635	0.9635
Agua	970.2144	975.0286
Biomasa	0.1080	0.8321
Glicerina	15.6899	5.3540
Ácidos grasos	3.9941	3.9941
Sulfato de amonio	1.0000	0.6476
Fosforo	8.9936	8.7320
Ácido acético	0.0000	2.5880
Ácido láctico	0.0000	0.0000
Etanol	0.0000	0.8850
Metanol	0.0000	0.0000
Enzimas	0.0000	0.8484
Total	1649.1944	1649.1944

En la Tabla 57 se presenta el balance general de entrada y salida de componentes durante la fermentación de *B. megaterium* utilizando 20 g/L de glicerina.

Tabla 57.

Balance de masa de la fermentación de *B. megaterium* con 20 g/L de glicerina.

Componente	Entrada (g)	Salida (g)
O_2	648.1944	646.6146
CO_2	0.0000	3.2584
<i>HCl</i>	0.4011	0.4011
Agua <i>HCl</i>	10.5989	10.5989
Agua	955.0804	962.4919
Biomasa	0.1464	1.1689
Glicerina	20.9858	5.0734
Ácidos grasos	5.3423	5.3423
Sulfato de amonio	1.0000	0.5018
Fósforo	8.9936	8.6242
Ácido acético	4.3677	4.1898

Componente	Entrada (g)	Salida (g)
Ácido láctico	4.0838	3.4274
Etanol	0.0000	5.0783
Metanol	0.0000	0.0000
Enzimas	0.0000	2.4233
Total	1659.1944	1659.1944

En la Tabla 58 se muestran los datos obtenidos del balance de masa correspondiente a la fermentación de *B. megaterium* en condiciones con 30 g/L de glicerina.

Tabla 58.

Balance de masa de la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina.

Componente	Entrada (g)	Salida (g)
O_2	648.1944	646.3480
CO_2	0.0000	3.8081
HCl	0.4011	0.4011
Agua HCl	10.5989	10.5989
$NaOH$	0.067994	0.067994
Agua $NaOH$	1.932006	1.932006
Agua del medio	945.1071	953.7640
Biomasa	0.0984	1.1259
Glicerina	30.3786	11.7856
Ácidos grasos	7.7334	7.7344
Sulfato de amonio	1.0000	0.4994
Fósforo	8.9936	8.6224
Ácido acético	4.2241	1.0312
Ácido láctico	0.1045	0.0000
Etanol	2.3604	1.8866
Metanol	0.0000	0.0000
Enzimas	0.0000	11.5889
Total	1661.1944	1661.1944

En la Tabla 59 se presentan los valores estadísticos del crecimiento celular de *B. megaterium* cultivado con 15 g/L de glicerina, incluyendo el tiempo de duplicación y tasa de crecimiento.

Tabla 59.

Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de *B. megaterium* conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 15 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Ln (Cn)	Incertidumbre ± Ln (Cn)	μ (h ⁻¹)	Incertidumbre μ (± h ⁻¹)	Td (h)	Incertidumbre Td (± h)
0.00	-2.22562	0.00065	-	-	-	-
24.00	-0.92012	0.00018	0.05440	0.00062	12.74263	0.01141
48.00	-0.75760	0.00015	0.00677	0.00151	102.36058	0.22371
72.00	-0.55466	0.00012	0.00846	0.00108	81.97232	0.12746
120.00	-0.18380	0.00008	0.00773	0.00047	89.71338	0.06112

En la Tabla 60 se muestran los valores estadísticos de la velocidad específica de crecimiento y consumo de sustrato durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina.

Tabla 60.

Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de *B. megaterium* conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 15 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	1/CS (L/mol)	rCn (g/Lh)	rCn (±g/Lh)	Cn/rCn (h)	Cn/rCn (± h)
0.00	5.86963	-	-	-	-
24.00	8.36885	0.01210	0.00060	20.92346	0.04955
48.00	10.64468	0.00293	0.00150	148.00000	0.51349
72.00	10.66685	0.00439	0.00107	118.66667	0.24294
120.00	17.21040	0.00537	0.00046	130.90909	0.08546

En la Tabla 61 se presentan los rendimientos específicos obtenidos durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina, en relación con el uso del sustrato, producción de biomasa y PHA.

Tabla 61.

Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de *B. megaterium* y producción de PHA en la fermentación de 15 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Y _{x/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{x/s} (± g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/x} (± g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/s} (± g/g)
0.00	-	-	-	-	-	-
24.00	0.0620	0.0003	0.5203	0.0015	0.0323	0.0014
48.00	0.0299	0.0014	0.5203	0.0020	0.0156	0.0014
72.00	5.8663	0.0009	0.5203	0.0017	3.0521	0.0014
120.00	0.0785	0.0004	0.5203	0.0012	0.0409	0.0012

En la Tabla 62 se muestran los valores estadísticos relacionados con el crecimiento de *B. megaterium* cultivado con 20 g/L de glicerina, evaluando su comportamiento celular a lo largo del tiempo.

Tabla 62.

Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de *B. megaterium* conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 20 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Ln (C _n)	Incertidumbre ± Ln (C _n)	μ (h ⁻¹)	Incertidumbre μ (± h ⁻¹)	Td (h)	Incertidumbre Td (± h)
0.00	-1.92141	0.00048	-	-	-	-
24.00	-1.49121	0.00031	0.01793	0.00143	38.66911	0.07958
48.00	-0.56704	0.00012	0.03851	0.00061	18.00057	0.01590
72.00	-0.25193	0.00009	0.01313	0.00069	52.79204	0.05282
120.00	0.15606	0.00006	0.00850	0.00036	81.54832	0.04274

En la Tabla 63 se presentan los valores estadísticos correspondientes a la respuesta de *B. megaterium* durante la fermentación con 20 g/L de glicerina, considerando la relación entre concentración de sustrato y tasa de crecimiento.

Tabla 63.

Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de *B. megaterium* conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 20 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	1/CS (L/mol)	rCn (g/Lh)	rCn (±g/Lh)	Cn/rCn (h)	Cn/rCn (± h)
0.00	4.38839	-	-	-	-
24.00	8.41390	0.00328	0.00136	56.64549	0.41542
48.00	13.24647	0.01425	0.00057	27.79187	0.04009
72.00	13.81753	0.00875	0.00068	76.79200	0.07812
120.00	18.34832	0.00816	0.00035	119.27681	0.04342

En la Tabla 64 se muestran los rendimientos específicos de *B. megaterium* en función del consumo de sustrato, producción de biomasa y acumulación de PHA durante la fermentación con 20 g/L de glicerina.

Tabla 64.

Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de *B. megaterium* y producción de PHA en la fermentación de 20 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Yx/s (g/g)	Incertidumbre Yx/s (± g/g)	Yp/x (g/g)	Incertidumbre Yp/x (± g/g)	Yp/s (g/g)	Incertidumbre Yp/s (± g/g)
0.00	-	-	-	-	-	-
24.00	0.0078	0.0009	0.6262	0.0017	0.0049	0.0008
48.00	0.0857	0.0002	0.6262	0.0010	0.0537	0.0008
72.00	0.7312	0.0003	0.6262	0.0011	0.4579	0.0008
120.00	0.2379	0.0002	0.6262	0.0009	0.1490	0.0007

En la Tabla 65 se presentan los valores estadísticos sobre el crecimiento celular de *B. megaterium* cultivado en medio con 30 g/L de glicerina, analizados a lo largo del tiempo.

Tabla 65.

Logaritmo natural del crecimiento celular, aumento de *B. megaterium* conforme el tiempo y tiempo de duplicación de la fermentación de 1 L de 30 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Ln(Cn)	Incertidumbre ± Ln(Cn)	μ (h ⁻¹)	Incertidumbre μ (± h ⁻¹)	Td (h)	Incertidumbre Td (± h)
0.00	-2.31871	0.00072	-	-	-	-
24.00	-2.10210	0.00058	0.00903	0.00429	76.79654	0.47502
48.00	-0.70887	0.00014	0.05805	0.00065	11.94030	0.01122
72.00	-0.10314	0.00008	0.02524	0.00056	27.46364	0.02221
120.00	0.11856	0.00006	0.00462	0.00052	150.06860	0.11157

En la Tabla 66 se presentan los valores estadísticos sobre la velocidad de crecimiento de *B. megaterium*, junto con la relación entre el sustrato y su aprovechamiento durante la fermentación con 30 g/L de glicerina

Tabla 66.

Inverso de la concentración de sustrato, velocidad de crecimiento y el aumento de *B. megaterium* conforme la velocidad de crecimiento de la fermentación de 1 L de 30 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	1/CS (L/mol)	rCn (g/Lh)	rCn (±g/Lh)	Cn/rCn (h)	Cn/rCn (± h)
0.00	3.03113	-	-	-	-
24.00	3.69520	0.00099	0.00423	111.22689	4.26583
48.00	5.13491	0.01542	0.00056	19.92649	0.03636
72.00	6.04104	0.01708	0.00055	40.82577	0.03211
120.00	7.91535	0.00466	0.00051	217.38932	0.10928

En la Tabla 67 se muestran los rendimientos específicos obtenidos durante la fermentación de *B. megaterium* con 30 g/L de glicerina, enfocados en el uso del sustrato, crecimiento y formación de PHA.

Tabla 67.

Rendimientos específicos de consumo de sustrato, crecimiento de *B. megaterium* y producción de PHA en la fermentación de 30 g/L.

Tiempo (± 0.008 h)	Y _{x/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{x/s} (± g/g)	Y _{p/x} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/x} (± g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Incertidumbre Y _{p/s} (± g/g)
0.00	-	-	-	-	-	-
24.00	0.0044	0.0042	0.4798	0.0044	0.0021	0.0011
48.00	0.0509	0.0003	0.4798	0.0011	0.0244	0.0011
72.00	0.1552	0.0002	0.4798	0.0011	0.0745	0.0011
120.00	0.0612	0.0004	0.4798	0.0010	0.0294	0.0009

En la Tabla 68 se presentan los valores estadísticos de concentración de PHA durante la fermentación de *B. megaterium* con 15 g/L de glicerina, evaluados a lo largo del proceso

Tabla 68.

Concentración de PHA durante la fermentación de 15 g/L de glicerina de biodiesel.

Tiempo (± 0.008 h)	PHA (g/L)	PHA (± g/L)
0.00	0.05619	0.00011
24.00	0.20732	0.00029
48.00	0.24390	0.00034
72.00	0.29878	0.00041
120.00	0.43293	0.00050

En la Tabla 69 se presentan los valores estadísticos de producción de PHA en medio con 20 g/L de glicerina, destacando la acumulación por parte de *B. megaterium* en distintos puntos de evaluación.

Tabla 69.

Concentración de PHA durante la fermentación de 20 g/L de glicerina de biodiesel.

Tiempo (± 0.008 h)	PHA (g/L)	PHA (± g/L)
0.00	0.09168	0.00010
24.00	0.14096	0.00012
48.00	0.35520	0.00030
72.00	0.48677	0.00039
120.00	0.73200	0.00050

En la Tabla 70 se reportan los valores estadísticos de concentración de PHA obtenidos durante la fermentación con 30 g/L de glicerina, evaluando su comportamiento a lo largo del proceso.

Tabla 70.

Concentración de PHA durante la fermentación de 30 g/L de glicerina de biodiesel.

Tiempo (± 0.008 h)	PHA (g/L)	PHA (± g/L)
0.00	0.04721	0.00007
24.00	0.05863	0.00007
48.00	0.23617	0.00025
72.00	0.43280	0.00045
120.00	0.54022	0.00050

C. Datos de equipos y reactivos

a. Datos de Reactivos

Durante el proceso de investigación, se utilizaron diversos equipos y reactivos, con el objetivo de realizar las preparaciones correspondientes en cada uno de los procedimientos, por ello, a continuación se añaden los datos de los reactivos.

Tabla 71.

Datos de sulfato de zinc heptahidratado

Marca	Merk
Fórmula química	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
CAS	7446-20-0
Peso molecular	287.54 g/mol

Tabla 72.

Datos de Sulfato de amonio

Marca	Merk
Fórmula química	$(NH_4)_2SO_4$
CAS	7783-20-2
Peso molecular	132.14 g/mol

Tabla 73.

Datos de Fosfato monobásico

Marca	Merk
Fórmula química	KH_2PO_4
CAS	7778-77-0
Peso molecular	2.338 g/mol

Tabla 74.

Datos de Fosfato de disódico

Marca	Merk
Fórmula química	Na_2HPO_4
CAS	7558-79-4
Peso molecular	141.96 g/mol

Tabla 75.

Datos de Cloruro de calcio dihidratado

Marca	Merk
Fórmula química	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
CAS	10035-04-8
Peso molecular	147.02 g/mol

Tabla 76.

Datos de Sulfato de magnesio heptahidratado

Marca	Merk
Fórmula química	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
CAS	10034-99-8
Peso molecular	246.48 g/mol

Tabla 77.

Datos de Ácido bórico

Marca	Merk
Fórmula química	H_3BO_3
CAS	10043-35-3
Peso molecular	61.83 g/mol

Tabla 78.

Datos de Ácido clorhídrico

Marca	Merk
Fórmula química	HCl
Pureza	32%
Peso molecular	36.46 g/mol

Tabla 79.

Datos Hidróxido de sodio

Marca	Merk
Fórmula química	$NaOH$
CAS	215-185-5
Peso molecular	40 g/mol

Tabla 80.

Datos de Ácido bórico

Marca	Merk
Fórmula química	H_3BO_3
CAS	10043-35-3

Peso molecular	61.83 g/mol
----------------	-------------

Tabla 81.

Datos de Molibdato de sodio dihidratado

Marca	Merk
Fórmula química	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$
Peso molecular	241.95 g/mol

Tabla 82.

Datos de Xyleno

Marca	Merk
Fórmula química	$C_6H_4(CH_3)_2$
Index no.	601-022-00-9
Peso molecular	106.17 g/mol

Tabla 83.

Datos de negro de Sudán B

Marca	Sigmaaldrich
Fórmula química	$C_{16}H_{16}N_2$
CAS	4197-25-5
Peso molecular	380.4 g/mol

Tabla 84.

Datos de Hipoclorito de sodio

Marca	Magia Blanca
Fórmula química	$NaClO$ y $NaOH$
Concentración hipoclorito de sodio	3.00-4.725%

Tabla 85.

Datos de Cloroformo

Marca	Merk
Fórmula química	$CHCl_3$

CAS	67-66-3
Peso molecular	119.38 g/mol

Tabla 86.

Datos de *B. megaterium*

Cepa	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581
Marca	KWIK STIK
Número de referencia	0201P
Presentación	2 hisopos

Tabla 87.

Datos de *B. subtilis*

Cepa	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051
Marca	KWIK STIK
Número de referencia	0120U
Presentación	2 hisopos

Tabla 88.

Datos de *B. cereus*

Cepa	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
Marca	KWIK STIK
Número de referencia	0200K
Presentación	2 hisopos

Tabla 89.

Datos del caldo nutritivo

Marca	Merk
pH	7±0.2 a 25 °C
Proporción	8 g/L
Concentración peptona de carne	5 g/L
Concentración peptona de viande	5 g/L

Tabla 90.

Agar nutritivo

Marca	Merk
pH	7±0.2 a 25 °C
Proporción	20 g/L
Concentración peptona de carne	3 g/L
Concentración peptona de viande	3 g/L

b. Datos de equipos**Tabla 91.**

Datos de placa de centrifugadora de 1L

Marca	Solval
Capacidad	4 balas de 250 mL
Serie	RT7
Revoluciones máximas	4000 rpm
0.0846	0.9393

Tabla 92.

Datos de placa de centrifugadora de 400 mL

Marca	Eppendorf
Capacidad	8 tubos de 50 mL
Serie	5804 R
Revoluciones máximas	4000 rpm
Tipo	15 amp versión
Hertz	60
Voltaje	115

Tabla 93.

Datos de placa de centrifugadora de 90 mL

Marca	Fisher Scientific
Capacidad	6 tubos de 15 mL
Serie	50300311
Revoluciones máximas	3400 rpm
Hertz	60
Voltaje	115

Tabla 94.

Datos de placa de centrifugadora de 48 mL

Marca	Eppendorf
Serie	5415 D
Capacidad	24 tubos de 2 mL
Capacidad máxima	90 g
Rango de temperatura	2-35 °C
Revoluciones máximas	13200 rpm
Watts	180 W
Hertz	50/60
Voltaje	120 V

Tabla 95.

Datos de placa del Autoclave

Marca	TUTTNAUER
Modelo	ELVC
Serie	3870
Tipo	Esterilizador vertical
Rango de temperatura	110 – 135 °C
Ciclo de desinfección	40 – 105 °C
Hertz	60
Voltaje	220 V

Tabla 96.

Datos de placa de la Incubadora orbital

Marca	Bt Barnstead Lab-line
Serie	0599-0437
Modelo	Max Q mini 4450
Revoluciones máximas	400 rpm
Hertz	50/60
Clase	1
Watts	500
Voltaje	120 V

Tabla 97.

Datos de placa del horno secador

Marca	TUTTNAUER
Serie	ELVG
Rango	110-135°C
Hertz	60
Voltaje	220 V

Tabla 98.

Datos de placa de la balanza analítica

Marca	OHAUS
Modelo	TS4KD
Serie	G175296
Tipo	Estándar de precisión
Capacidad	4000 g
Amperaje	230
Legibilidad	0.1 g

Tabla 99.

Datos de placa del reactor BIOSTAT Sartorius

Marca	Sartorius
Modelo	A plus 1 L

Temperatura máxima	80°C
Flujo de aire	15 L/min
Capacidad	1.5 L
Volteos	120 V
Hertz	60
Amperaje	15
Watts del motor	140

Tabla 100.

Datos de placa del microscopio

Marca	Fisher Scientific
Modelo	Micromaster
Hertz	50/60
Volteos	110

Tabla 101.

Datos de placa de la estufa con agitación magnética

Marca	Thermo Scientific
Modelo	Cimarec +
Temperatura máxima	540°C
Velocidad máxima	12 STIR
Volteos	120 V
Hertz	50/60

D. Cálculos de Muestra

a. Cálculos a partir de los datos experimentales por peso seco y cuantificación de los subproductos del HPLC:

Cálculo 1. Determinación de glicerina peso volumen (g/L) a partir de porcentaje volumen-volumen (% v/v)

$$\frac{p}{V} = \frac{(1.2452 \frac{v}{v}\%)}{100\%} * 1260 \frac{g}{L} = 15.69 \frac{g}{L} \quad (14)$$

Se determinó el peso volumen (g/L) de cada una de las fermentaciones a partir del porcentaje v/v% obtenido del HPLC.

Cálculo 2. Determinación del logaritmo natural del crecimiento *B. megaterium*.

$$\ln(Cn) = \ln\left(0.1080 \frac{g}{L}\right) = -2.2256 \quad (15)$$

Se determinó el logaritmo natural de la biomasa en cada punto de medición para observar su tendencia de crecimiento en cada punto en el tiempo. Se utilizaron los datos de peso seco de las concentraciones de la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio al inicio de la fermentación 0 horas del Tabla 15. Determinación de velocidad de crecimiento

$$rCn = \frac{(\Delta Cn)g/L}{(dt)h} \quad (16)$$

Donde ΔCn corresponde a la diferencia de biomasa y dt la diferencia de tiempo en horas.

Cálculo 3. Determinación de la velocidad de crecimiento de *B. megaterium*

$$rCn = \frac{(0.3985-0.1080)g/L}{(24-0)h} = 0.0121 \frac{g}{L \cdot h} \quad (17)$$

Se determinó la velocidad de crecimiento de biomasa a partir de los valores del aumento de biomasa (peso seco) conforme la diferencia de tiempo en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio a las 24 horas del inicio de la fermentación del Tabla 15 utilizando la ecuación 13.

Cálculo 4. Ecuación de crecimiento microbiano de Monod

$$\frac{Cn}{rCn} = \frac{(Cn_{inicial}(0h) + Cn_{final}(24h))/2}{rCn}$$

(18)

Donde Cn corresponde a la diferencia de biomasa y rCn corresponde a la diferencia de biomasa dividido la diferencia de tiempo.

Cálculo 5. Determinación del aumento de *B. megaterium* conforme el aumento de biomasa conforme el tiempo

$$\frac{Cn}{rCn} = \frac{(0.1080 \frac{g}{L} + 0.3985 \frac{g}{L})/2}{0.0121 \text{ g/Lh}} = 20.9234 \text{ h}$$

(19)

Se determinó el aumento de biomasa conforme la velocidad de formación de biomasa a partir de los valores de peso seco obtenidos en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio a las 24 horas del inicio de la fermentación de los Tablas 15 y 60 utilizando la ecuación 14.

Cálculo 6. Velocidad específica de crecimiento de *B. megaterium*

$$\mu = \frac{(-0.9201 - (-2.2256))}{(24-0)h} = 0.054 \text{ h}^{-1}$$

(20)

Se determinó la velocidad específica de crecimiento a partir del logaritmo natural del crecimiento de *B. megaterium* (peso seco) y de los valores obtenidos en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio a las 24 horas del inicio de la fermentación del Tabla 59 utilizando la ecuación 2. Tiempo de duplicación microbiano

$$td = \frac{\ln(2)}{\frac{d \ln(Cn)}{dt}}$$

(21)

Donde $d \ln(Cn)$ corresponde a la diferencia del logaritmo natural de Cn.

Cálculo 7. Tiempo de duplicación de *B. megaterium*

$$td = \frac{\ln(2)}{0.054 \text{ h}^{-1}} = 12.74 \text{ h}$$

(22)

Se determinó el tiempo de duplicación de *B. megaterium* a partir de los valores de la velocidad específica de crecimiento y de los valores obtenidos de peso seco en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio a las 24 horas del inicio de la fermentación del Tabla 59 utilizando la ecuación 15.

Cálculo 8. Rendimiento específico del aumento de biomasa conforme el sustrato consumido.

$$Y_{x/s} = \frac{(0.3985-0.1080) \text{ g/L}}{(15.6899-11.0043) \text{ g/L}} = 0.0620 \frac{\text{g}}{\text{g}} \quad (23)$$

Se determinó el rendimiento específico $Y_{x/s}$ a partir de los valores de la diferencia de biomasa y la diferencia de glicerina a las 24 horas con 0 horas en el medio en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio del Tabla 15 utilizando la ecuación 3.

Cálculo 9. Rendimiento específico de la producción de PHA conforme el aumento de la biomasa.

$$Y_{p/x} = \frac{(0.2073-0.0562) \text{ g/L}}{(0.3985-0.1080) \text{ g/L}} = 0.5203 \frac{\text{g}}{\text{g}} \quad (24)$$

Se determinó el rendimiento específico $Y_{p/x}$ a partir de los valores de la diferencia del producto PHA y la diferencia de la biomasa a las 24 horas con 0 horas en el medio en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio del Tabla 15 y 19 utilizando la ecuación 5.

Cálculo 10. Rendimiento específico de la producción de PHA conforme el consumo del sustrato.

$$Y_{p/s} = \frac{(0.2073-0.0562) \text{ g/L}}{(15.6899-11.0043) \text{ g/L}} = 0.0323 \text{ g/g} \quad (25)$$

Se determinó el rendimiento específico $Y_{p/s}$ a partir de los valores de la diferencia del producto PHA y la diferencia de glicerina a las 24 horas con 0 horas en el medio en la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio utilizando los valores del Tabla 15 y 19 y la ecuación 4.

Cálculo 11. Porcentaje de PHA en la biomasa

$$PHA\% = \frac{PHA \text{ (g)}}{Biomasa \text{ (g)}} * 100 = \frac{0.4329 \text{ (g)}}{0.8321 \text{ (g)}} * 100 = 52.0283\% \quad (26)$$

Se determinó el porcentaje del PHA en la biomasa en el medio utilizando los valores de la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio al finalizar de la fermentación a las 120 horas del Tabla 15 y 19 y utilizando la ecuación 6.

c. Cálculos a partir de la estequiometría de la reacción de producción de PHA.

Cálculo 12. Determinación de los moles de glicerina que reaccionaron

$$\text{Glicerina (mol)} = \frac{(\text{Glicerina inicial} - \text{Glicerina final})(\text{g})}{\text{Peso molecular glicerina} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} = \frac{(30.3786 - 11.4868)(\text{g})}{92.02 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)} = 0.2051 \text{ mol Gli} \quad (27)$$

Se determinó la cantidad de moles de glicerina que reaccionaron en el medio en la fermentación de 30 g/L en 1 L de medio a partir de la diferencia de los Gramos de glicerina al inicio de la fermentación y al final de transcurridas las 120 horas y con el peso molecular de la glicerina del Tabla 58.

Cálculo 13. Determinación de Gramos de CO_2 que se produjeron en la fermentación.

$$\begin{aligned} CO_2 (g) &= \text{Glicerina (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } CO_2}{7 \text{ moles de glicerina}} * \frac{44 \text{ g de glicerina}}{1 \text{ mol de glicerina}} \\ &= 0.2051 \text{ Gli (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } CO_2}{7 \text{ moles de glicerina}} * \frac{44 \text{ g de glicerina}}{1 \text{ mol de glicerina}} = 3.8684 \text{ g de } CO_2 \quad (28) \end{aligned}$$

Se determinaron los Gramos de CO_2 a partir de la reacción estequiométrica de la reacción y los moles de glicerina que reaccionaron en el medio en la fermentación de 30 g/L en 1 L.

Cálculo 14. Determinación de Gramos de Oxígeno que se consumieron en la fermentación.

$$\begin{aligned} O_2 (g) &= CO_2(\text{mol}) * \frac{2 \text{ moles de } O_2}{3 \text{ moles de } CO_2} * \frac{32 \text{ g de } O_2}{1 \text{ mol de } O_2} \\ &= 3.8684 \text{ } CO_2(\text{mol}) * \frac{2 \text{ moles de } O_2}{3 \text{ moles de } CO_2} * \frac{32 \text{ g de } O_2}{1 \text{ mol de } O_2} = 1.8756 \text{ g de } O_2 \quad (29) \end{aligned}$$

Se determinaron los Gramos de O_2 a partir de la reacción estequiométrica de la reacción y los moles de CO_2 que reaccionaron en el medio en la fermentación de 30 g/L en 1 L.

Cálculo 15. Determinación del aumento de biomasa molar.

$$\begin{aligned} \text{Aumento BIO(mol)} &= (\text{BIO final} - \text{inoculo})g * \frac{1 \text{ mol de BIO}}{271.2048 \text{ g de BIO}} = (1.1259 - 0.0984)g * \\ &\frac{1 \text{ mol de BIO}}{271.2048 \text{ g de BIO}} = 0.0038 \text{ moles de Biomasa} \end{aligned} \quad (30)$$

Se determinó el aumento molar de la biomasa en el medio a partir de la diferencia de los Gramos al inicio y al final de la fermentación de biomasa y el peso molecular de la fórmula elemental del *B. megaterium* de la fermentación de 30 g/L en 1 L del Tabla 58.

Cálculo 16. Determinación de Gramos de sulfato de amonio que reaccionaron en la fermentación.

$$\begin{aligned} (NH_4)_2SO_4 (g) &= \text{BIO (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } (NH_4)_2SO_4}{3 \text{ moles de BIO}} * \frac{132.14 \text{ g de } (NH_4)_2SO_4}{1 \text{ mol de } (NH_4)_2SO_4} \\ &= 0.0038 \text{ BIO (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } (NH_4)_2SO_4}{3 \text{ moles de BIO}} * \frac{132.14 \text{ g de } (NH_4)_2SO_4}{1 \text{ mol de } (NH_4)_2SO_4} \\ &= 0.5006 \text{ g de } (NH_4)_2SO_4 \end{aligned} \quad (31)$$

Se determinó la cantidad de Gramos de sulfato de amonio que se consumieron en la fermentación a partir de la cantidad de moles de Biomasa que se generaron y de la estequiometria de la reacción de la fermentación de 30 g/L en 1 L de medio.

Cálculo 17. Determinación de Gramos de sulfato de amonio que no reaccionaron en la fermentación.

$$\begin{aligned} (NH_4)_2SO_4 (g) &= ((NH_4)_2SO_4 \text{ inicial} - (NH_4)_2SO_4 \text{ reaccionante})(g) \\ &= (1 - 0.5006)(g) = 0.4994 \text{ g de } (NH_4)_2SO_4 \end{aligned} \quad (32)$$

Se determinó la cantidad de sulfato de amonio que no reaccionó en la fermentación a partir de la diferencia de los Gramos que se pesaron para la formulación del medio y de los Gramos que reaccionaron en la fermentación de 30 g/L en 1 L de medio.

Cálculo 18. Determinación de Gramos de fósforo que reaccionaron en la fermentación.

$$\begin{aligned} H_2PO_4 (g) &= \text{BIO (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } H_2PO_4}{3 \text{ moles de BIO}} * \frac{97.99 \text{ g de } H_2PO_4}{1 \text{ mol de } H_2PO_4} \\ &= 0.0038 \text{ BIO (mol)} * \frac{3 \text{ moles de } H_2PO_4}{3 \text{ moles de BIO}} * \frac{97.99 \text{ g de } H_2PO_4}{1 \text{ mol de } H_2PO_4} \end{aligned} \quad (33)$$

$$= 0.3724 \text{ g de } H_2PO_4$$

Se determinó la cantidad de Gramos de sulfato de amonio que se consumieron en la fermentación a partir de la cantidad de moles de biomasa que se generaron y de la estequiometría de la reacción de la fermentación de 30 g/L en 1 L de medio.

Cálculo 19. Determinación de Gramos de fósforo que no reaccionaron en la fermentación.

$$\begin{aligned} H_2PO_4 (g) &= (H_2PO_4 \text{ inicial} - H_2PO_4 \text{ reaccionante})(g) \\ &= (8.9936 - 0.3712)(g) = 8.6224 \text{ g de } H_2PO_4 \end{aligned} \quad (34)$$

Se determinó la cantidad de fósforo que no reaccionó en la fermentación a partir de la diferencia de los Gramos que se pesaron para la formulación del medio y de los Gramos que reaccionaron en la fermentación de 30 g/L en 1 L de medio del Tabla 58.

d. Cálculos estadísticos de los valores obtenidos.

Determinación de incertidumbre de suma o resta

$$\Delta AB = \sqrt{(\Delta B (g))^2 + (\Delta A(g))^2} \quad (35)$$

Donde ΔB corresponde a la incertidumbre de B y ΔA la incertidumbre de A en una suma de B + A o una resta de B - A.

Cálculo 20. Determinación de incertidumbre de una suma o resta para calcular el aumento de biomasa en la fermentación de 1 L de 15 g/L.

$$\Delta CN = \sqrt{(0.00007 \text{ g } (24 \text{ h}))^2 + (0.00007 \text{ g } (0 \text{ h}))^2} = \pm 0.0001 \text{ g} \quad (36)$$

Se determinó la incertidumbre de la diferencia de biomasa en dos tiempos a partir de la incertidumbre de cada valor utilizado los valores del Tabla 15.

Determinación de incertidumbre de una multiplicación y división.

$$td = \frac{\ln(2)}{\frac{d\ln(cn)}{dt}} = \frac{\Delta Z}{Z} = \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{\Delta y}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{\pm \frac{d\ln(cn)}{dt}}{\frac{d\ln(cn)}{dt}}\right)^2} \quad (37)$$

Donde $\pm \frac{d\ln(cn)}{dt}$ corresponde a la incertidumbre de la multiplicación o división y $\frac{d\ln(cn)}{dt}$ el valor de la multiplicación o división.

Cálculo 21. Determinación de incertidumbre de una multiplicación y división de la velocidad de crecimiento específica de *B. megaterium*

$$td = \sqrt{\left(\frac{\pm 0.00071}{0.05440}\right)^2} = \pm 0.01314 h \quad (38)$$

Se determinó la incertidumbre del tiempo de duplicación a partir de la velocidad de crecimiento específico de *B. megaterium* y su incertidumbre de la fermentación de 15 g/L en 1 L de medio del Tabla 59.

Determinación de media aritmética

$$\bar{x} = \left(\frac{x_1+x_2+\dots+x_n}{N}\right) \quad (39)$$

Donde x_n corresponde a los valores obtenidos en la muestra y N corresponde al total de las muestras obtenidas.

Cálculo 22. Determinación de media aritmética del crecimiento de *B. megaterium*

$$\bar{x} = \left(\frac{0.170+0.108+0.121}{3}\right) = 0.133 g \quad (40)$$

Se determinó la media aritmética del crecimiento de *B. megaterium* después de 120 h en la adaptación con 20 g/L con caldo nutritivo en 125 mL donde N es la cantidad de muestras. En este caso fue triplicado utilizando los valores de la diferencia de peso seco al inicio y al final de la fermentación de la Tabla 27.

Determinación de desviación estándar

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{(x_1-\bar{x})^2+(x_2-\bar{x})^2+\dots+(x_n-\bar{x})^2}{N}\right)} \quad (41)$$

Donde x_n corresponde a los valores obtenidos en la muestra y N corresponde al total de las muestras obtenidas.

Cálculo 23. Determinación de desviación estándar del crecimiento de *B. megaterium*

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{(0.170-0.133)^2+(0.108-0.133)^2+(0.121-0.133)^2}{3}\right)g^2} = 0.0262 g \quad (42)$$

Se determinó la desviación estándar del crecimiento de *B. megaterium* después de 120 h con la diferencia de la media aritmética en la adaptación con 20 g/L con caldo nutritivo en 125 mL.

Determinación de varianza

$$\sigma^2 = \left(\frac{(x_1-\bar{x})^2+(x_2-\bar{x})^2\dots+(x_n-\bar{x})^2}{N}\right) \quad (43)$$

Donde x_n corresponde a los valores obtenidos en la muestra y N corresponde al total de las muestras obtenidas.

Cálculo 24. Determinación de varianza del crecimiento de *B. megaterium*

$$\sigma^2 = \left(\frac{(0.170-0.133)^2+(0.108-0.133)^2+(0.121-0.133)^2}{3}\right)g^2 = 0.00069 g^2 \quad (44)$$

Se determinó la varianza del crecimiento de *B. megaterium* después de 120 h con la diferencia de la media aritmética en la adaptación con 20 g/L con caldo nutritivo en 125 mL.

E. Fotografías

La documentación fotográfica de cada uno de los procedimientos y etapas, toma relevancia, al plasmar el avance y crear comparaciones posteriores, desde la evidencia primaria del desarrollo del proceso investigativo; de aquí en adelante, se muestran las fotografías que respaldan este aporte a la industria.

Figura 72

Propagación de la cepa *Bacillus megaterium* en agar nutritivo.

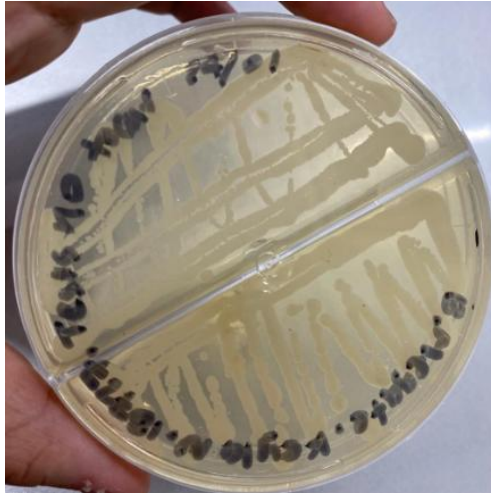


Figura 73

Propagación de la cepa *Bacillus Cereus* en agar nutritivo.

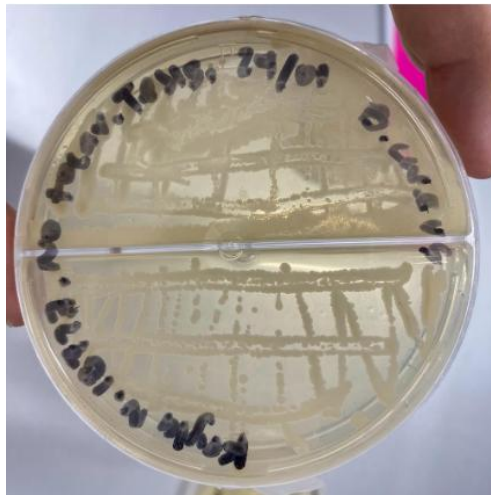


Figura 74

Propagación de la cepa *Bacillus subtilis* en agar nutritivo.

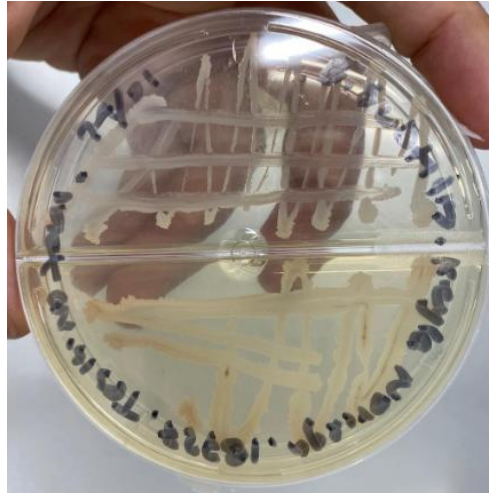


Figura 75

Glicerina cruda procedente del proceso de producción de Biodiesel.



Figura 76

Propagación y adaptación de las cepas bacterianas al medio de sales con glicerina 15 g/L en triplicado.



Figura 77

Propagación y adaptación de *B. subtilis* al medio de sales con glicerina 15 g/L

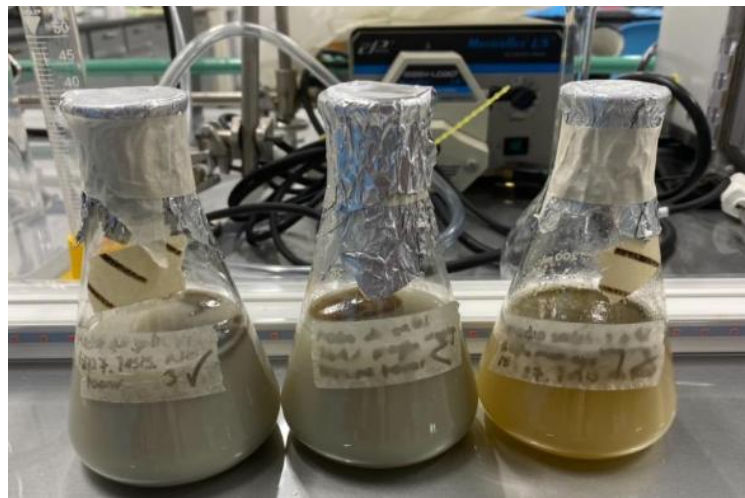


Figura 78

Propagación y adaptación de *B. megaterium* al medio de sales con glicerina 30 g/L.



Figura 79

Solución de negro de Sudán 0.3 %



Figura 80

Sistema de fermentación en el reactor Biostat Sartorius de *B. megaterium* en medio de sales 15 g/L en 1 L de escala.



Figura 81

Fermentación de *B. megaterium* en medio de sales con 15 g/L de glicerina en escala de 1 L después de 6 días de fermentación



Figura 82

Ampolla de decantación por gravedad de 500 mL con las dos fases de hipoclorito de sodio y cloroformo.



Figura 83

Precipitación del PHA presente en la fase del cloroformo.

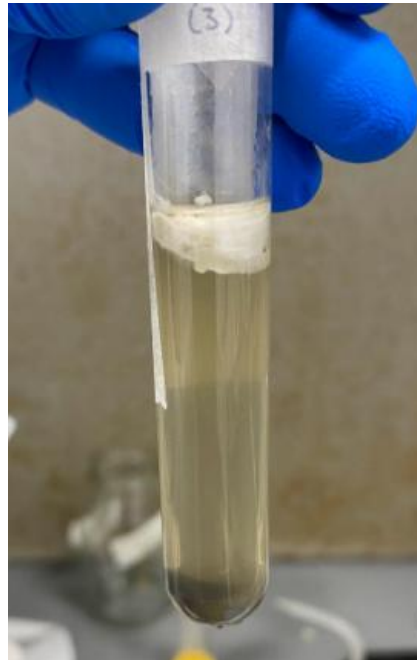


Figura 84

Sistema de evaporación del cloroformo para la obtención del PHA precipitado.

