

REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DEL LIXIVIADO A TRAVÉS DE
BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)
AISLADAS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS. PASTO, NARIÑO.

PATRICIA GONZÁLEZ PONCE

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2011

REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DEL LIXIVIADO A TRAVÉS DE
BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)
AISLADAS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS. PASTO, NARIÑO.

PATRICIA GONZÁLEZ PONCE

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial
para optar el título de Biólogo

Director:
PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO, Ph. D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2011

Las ideas y conclusiones aportadas del trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de su autor. Artículo 1ero acuerdo N° 324 del 11 de octubre de 1966 del honorable concejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Diciembre de 2010.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	16
1.1. LOS LIXIVIADOS	16
1.2. TRATAMIENTO CONVENCIONAL DE LIXIVIADOS Y AGUAS RESIDUALES	19
1.2.1. Tratamiento primario	19
1.2.2. Tratamiento secundario	20
1.2.2.1. Importancia de la Demanda Química de Oxígeno DQO	20
1.2.3. Tratamiento terciario	21
1.3. TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS A TRAVÉS DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOPOLÍMERO	21
1.4. POLIHIDROXIALCANOATOS	24
2. METODOLOGÍA	28
2.1. ÁREA DE ESTUDIO.	28
2.2. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS.	29
2.3. ESTIMACIÓN <i>in-Vitro</i> DE LA PRODUCCIÓN DE PHA DE BACTERIAS AISLADAS DEL RSA.	30
2.3.1. Diseño de muestreo	30
2.3.2. Aislamiento de bacterias productoras de PHA.	31
2.3.3. Preservación de Bacterias.	32
2.3.4. Producción de PHA por bacterias aisladas.	32

2.4. EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA EN LA TRANSFORMACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL LIXIVIADO DEL RSA.	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS.	34
3.2. ESTIMACIÓN <i>in Vitro</i> DE LA PRODUCCIÓN DE PHA DE BACTERIAS AISLADAS DEL RSA.	38
3.2.3. Producción de PHA por bacterias aisladas.	40
3.3. EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA EN LA TRANSFORMACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL LIXIVIADO DEL RSA.	41
4. CONCLUSIONES	48
5. RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	58
Anexo A. Cromatogramas obtenidos en este trabajo	58

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Parámetros de lixiviados que varían de acuerdo a la etapa del proceso del relleno sanitario.	18
Tabla 2. Parámetros para el análisis de las aguas residuales y su variación con respecto al tiempo.	18
Tabla 3. Diferencias debidas a la presencia y ausencia de oxígeno y procesos metabólicos en los microorganismos bajo estas circunstancias.	23
Tabla 4. Matriz de tratamientos como resultado de la combinación de niveles y factores según diseño experimental 2 ⁿ	29
Tabla 5. Concentraciones aplicadas en los tratamientos	29
Tabla 6. Composición de la mezcla de oligonutrientes empleada para el diseño del medio de cultivo	30
Tabla 7. Se referencia el volumen de cada zona de muestreo y el porcentaje de contribución o volumen de lixiviado que puede alojar cada área.	31
Tabla 8. Conformación de los tratamientos aplicados	33
Tabla 9. Porcentajes de remoción en los diferentes tratamientos.	34
Tabla 10. Se indican las diferentes concentraciones de los nutrientes por cada uno de los medios a experimentar.	36
Tabla 11. Total de cajas de Petri a inocular en este estudio y los puntos de muestreo por área de muestreo.	39
Tabla 12. Resultados de las características microscópicas de cada morfotipo productor de polímero.	40
Tabla 13. Valores de remoción de Materia orgánica del lixiviado por bacterias productoras de PHAs en medio cultivo a base de lixiviado suplementado con nutrientes después de 5 días de incubación.	41

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Efecto de los factores nutricionales sobre la remoción de materia orgánica.	35
Gráfica 2. Remoción de materia orgánica en el lixiviado presentada por los medios formulados.	36
Gráfica 4. Distribución de las bacterias aisladas.	38
Gráfica 5. Producción de PHA por los morfotipos bacterianos aislados.	41
Gráfica 6. Cromatografía del patrón poli (3HB-co-HV).	46
Gráfica 7. Cromatografía de polímero extraído en el tratamiento	46

TABLA DE ILUSTRACIONES

	Pág.
Ilustración 1. Enzimas implicadas en la producción de P(3HB).	25
Ilustración 2. Ruta metabólica para la producción de copolímero.	26
Ilustración 3. Estructura general de los PHA.	27
Ilustración 4: Relleno Sanitario Antanas.	28
Ilustración 5. Fotografía de bacterias bacilares Gram-negativas (100x)	39
Ilustración 6. Disminución en el color del lixiviado	45
Ilustración 7. Reducción del sedimento	45

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Cromatogramas obtenidos en este trabajo	Pág. 58
--	------------

RESUMEN

La descontaminación de líquidos percolados provenientes de los vertederos públicos, es una preocupación constante en la sociedad actual. El aprovechamiento de los lixiviados como fuente de nitrógeno o fósforo en forma de fosfatos y de componentes orgánicos como los ácidos grasos butirato, valerato y propionato, precursores igualmente, de polímeros biodegradables, hace posible el uso de microorganismos como intermediarios en este proceso.

Partiendo del proceso de remoción de materia orgánica llevado a cabo en el relleno sanitario Antanas de la ciudad de Pasto (Nariño), se realizaron variaciones en la adición de los nutrientes: Úrea, fosfato ácido de potasio y mezcla de oligonutrientes, con el objeto de evaluar una vía alternativa, logrando un porcentaje de remoción de materia orgánica de 35,05% en el lixiviado sin tratamiento. Adicionalmente, se evaluó el efecto por parte de 12 morfotipos bacterianos productores de polihidroxialcanoatos aislados del lixiviado, inoculándolos en el medio que presentó el mejor porcentaje de remoción con la variación de nutrientes. De ese modo, se obtuvo un porcentaje de remoción de 21,96% de la DQO total (DQOt) y 34,61% en la DQO soluble (DQOs). Igualmente se observó reducción del color y sedimento en el lixiviado tratado y producción de polihidroxialcanoato de tipo co-polímero P(3HB-co-HV).

Con los resultados obtenidos se pudo establecer un modelo matemático en el cual se relaciona la DQO del lixiviado y la producción de PHA por parte de los microorganismos; determinando que según las condiciones de este experimento, por cada $4080,73 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ se obtienen 60 mgL^{-1} de polímero.

ABSTRACT

Decontamination of liquid percolate from the landfills, is a constant concern in today's society. The use of leachate as a nitrogen and phosphorus source in the form of phosphates and organic compounds such as fatty acids butyrate, valerate and propionate, also precursors of biodegradable polymers, makes possible the use of microorganisms as intermediaries in this process.

With the aim to evaluate an alternative to the removal of organic matter process in the landfill Antanas of the city of Pasto (Nariño) were made variations in the addition of nutrients: urea, potassium acid phosphate and micronutrients mixture, were obtained 35.05% of organic material removal present in the untreated leachate. Subsequently, was analyzed the effect of organic material removal by 12 polyhydroxyalkanoates accumulating bacterial morphotypes isolated from the leachate; those were inoculated on the medium that presented the highest removal percentage with the variation of nutrients. We obtained a removal percentage of 21,96% of the total COD (COD_t) and 34,61% in the soluble COD (COD_s). Also observed reduction in color and sediment in the leachate treated and production of polyhydroxyalkanoate copolymer type P (3HB-co-HV).

With the results obtained are able to establish a mathematical model which relates the COD of the leachate and the production of PHA by microorganisms, determining that under the conditions of this experiment, each 4080,73 mgO₂L⁻¹ was obtained 60 mgL⁻¹.de polymer.

INTRODUCCIÓN

Entre los principales problemas que enfrentan los rellenos sanitarios, se encuentran: el arrastre de material por el viento, anegación, contaminación de acuíferos debido a las aguas residuales, la generación de gases metano y dióxido de carbono causantes de explosiones y generación de olores¹. Dentro de estos factores, los lixiviados son los directos responsables de generar una carga contaminante en los suelos y cuerpos acuíferos directamente relacionados, modificando sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y alterando el ecosistema de los organismos vivos que los componen. Debido a esto, algunos países consideran dentro de sus leyes² un reglamento claro que restringe la producción y disposición final de estos líquidos percolados.

Los lixiviados generados en el relleno Sanitario de Antanas (RSA) de la Ciudad de Pasto, están, constituidos fundamentalmente por metales como: mercurio, cromo, cadmio, cobre, hierro, manganeso, níquel, selenio y ácidos grasos como butirato, valerato, propionato y octanoato³, los cuales son controlados debido a su alto grado de peligrosidad, mediante procesos físicos, químicos y microbiológicos que permiten reducir la carga contaminante a los valores exigidos por la legislación colombiana⁴.

Sin embargo, aunque estos procesos disminuyen en parte el nivel de contaminación de los líquidos percolados, una alta concentración de materia orgánica en forma de ácidos grasos de cadena corta aún permanece en el lixiviado, por lo tanto, teniendo en cuenta que la mayor parte de los componentes de estos líquidos percolados son empleados por diversos microorganismos como sustrato, se ha propuesto que sean estos la principal medida de tratamiento. Por esta razón, diversos países han planteado el uso de lodos activados^{5,6}, constituidos por cúmulos de bacterias muchas de las cuales pueden aprovechar los ácidos grasos de cadena corta⁷ y fosfatos^{8,9} presentes en el medio para

¹ KYLEFORS, Katarina. Predictions of Leaching from Municipal Solid Waste (MSW) and Measures to Improve Leachate Management at Landfills. Sweden. 2002.

² Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2000

³ Grupo de biotecnología microbiana, Universidad de Nariño. Por publicar

⁴ MINISTERIO DE AMBIENTE VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Decretos Número 1594 de 1984, 3100 de 2003 y 838 de 2005. República de Colombia

⁵ MADISON, L, y HUISMAN, G. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. 1999.

⁶ PUNRATTANASIN, Warangkana. The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics. 2001.

⁷ HARMSEN, Hermie, Antón AKKERMANS, y Alfons STAMS. Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge. 1996

biotransformarlos en sustancias poliméricas biodegradables conocidas como polihidroxicanoatos (PHAs) y polihidroxifosfatos respectivamente. Es así como las bacterias cumplen con una doble propiedad ecológica: participan en la descontaminación del lixiviado y adicionalmente, producen sustancias como los polihidroxicanoatos que revisten importancia a nivel industrial, médico y ecológico^{10,11}.

Diariamente, en el RSA de la ciudad de Pasto se producen aproximadamente 112.320L¹² de lixiviado los cuales, se vierten al suelo tras cumplir con los parámetros establecidos por las normas nacionales¹³. Para esto, los líquidos percolados son sometidos a un tratamiento microbiológico de tipo aerobio y anaerobio, donde el lixiviado es suplementado con nutrientes considerados necesarios en el crecimiento bacteriano; el efluente resultante se somete a floculación, sedimentación, un filtro de anaerobiosis y cloración, es en este punto, donde finalmente se considera que en el lixiviado se ha removido la mayor parte de carga contaminante expresada en términos de remoción de materia orgánica y por tanto es apto para la aspersión al medio externo. Sin embargo, es posible mejorar la remoción de materia orgánica si se modifica uno o algunos factores en el tratamiento actual incrementando la efectividad del proceso microbiológico.

Teniendo en cuenta los planteamientos anteriores, el grupo de investigación en biotecnología microbiana, tras realizar estudios en el RSA de la ciudad de Pasto, ha encontrado bacterias productoras de PHAs en el lixiviado, indicando que es posible utilizar estos microorganismos en procesos de remoción de ácidos grasos tales como butírico, valérico y propiónico presentes en el medio para generar gránulos de polímero que utilizarán como reserva de energía. Por tanto cabría preguntarse, ¿son eficientes las bacterias productoras de PHAs en la remoción de materia orgánica presente en el lixiviado del RSA de la ciudad de Pasto?. Para esto fue necesario conocer si las condiciones existentes en el RSA, eran favorables para que las bacterias cumplan con una función biorremediadora adecuada y a su vez tengan una buena síntesis y producción de polímero biodegradable (PHA).

En el presente estudio se manejaron algunas condiciones nutricionales en el crecimiento bacteriano que permiten una mejor descontaminación del lixiviado en

⁸ WU, WEI-MIN, Robert F HICKEY, y Gregory ZEIKUS. Characterization of Metabolic Performance of Methanogenic Granules Treating Brewery Wastewater: Role of Sulfate-Reducing Bacteria. 1991.

⁹ OMIL, F, A VISSER, L W HULSHOFF POL, y G LETTINGA. Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. 1997.

¹⁰ MINO, T. Microbial Selection of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Activated Sludge Wastewater Treatment Processes for Enhanced Biological Phosphate Removal. 2000.

¹¹ ROZSA, Ch. *et al.* Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxicanoatos. 2004.

¹² Ingeniero José Zambrano EMAS. Comunicación personal.

¹³ MINISTERIO DE AMBIENTE VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Op. Cit.

el RSA, con el fin de influir benéficamente en los procesos metabólicos bacterianos responsables de la descomposición de sustancias altamente contaminantes¹⁴ las cuales son transformadas a fuentes energéticas o diferentes tipos de metabolitos, algunos de interés industrial como los PHAs^{15,16,17,18} los cuales constituyen la materia prima renovable utilizada en la industria para la generación de envases y contenedores que actualmente están reemplazando los producidos a partir de derivados de petróleo¹⁹.

Para cumplir con lo propuesto se plantearon los siguientes objetivos:

☞ Diseñar un medio de cultivo para la remoción de la materia orgánica presente en el lixiviado del Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de Pasto

☞ Estimar in Vitro la producción de PHAs en bacterias aisladas del RSA de la ciudad de Pasto.

☞ Determinar la eficiencia de las bacterias productoras de PHA en la remoción de la materia orgánica presente en el lixiviado del Relleno Sanitario Antanas.

Al cumplir con los objetivos propuestos, se genera un aporte diferente de descontaminación de lixiviados para el Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de Pasto, enfocándose en la remoción de materia orgánica que metabolizan los microorganismos presentes en estos líquidos al manipular la concentración de los nutrientes adicionados. Igualmente, se estableció una relación entre la producción de polímero biodegradable a partir de la cantidad de materia orgánica presente en el lixiviado tratado. Del mismo modo, la aplicación de este proyecto favorecerá la calidad de vida de los habitantes de la región y ofrecerá una alternativa industrial en la producción de plásticos biodegradables en el departamento.

¹⁴ STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. 2001.

¹⁵ RAMÍREZ, OCAMPO y VANEGAS. XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química. V Congreso Argentino de Ingeniería Química. 2006.

¹⁶ ENCARNACIÓN, *et al.* Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. 1995

¹⁷ PUNRATTANASIN 2001. Op. Cit. p.37

¹⁸ WÄLTERMANN, M y A STEINBÜCHEL. Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent insights into structure, formation and relationship to Eukaryotic Lipid Depots. 2005.

¹⁹ American Water Works Association Research Foundation, Lyonnaise de Eux, Water Research Commission of South Africa. Tratamiento del agua por procesos de membrana, principios, procesos y aplicaciones. 1998.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. LOS LIXIVIADOS

El relleno sanitario es un lugar diseñado para la disposición final de la basura, su objetivo es disminuir el peligro que esta implica para la salud y la seguridad pública²⁰. En el relleno sanitario se aplican principios de ingeniería para depositar en el suelo los desechos sólidos, los cuales se esparcen y compactan reduciéndolos al menor volumen posible para que así ocupen un área pequeña. Además, prevé los problemas que puedan causar los líquidos y gases producidos en el relleno, por efecto de la descomposición de la materia orgánica durante su operación y después de terminado el mismo^{21, 22}.

Entre los principales problemas que debe considerar un relleno, está la generación de lixiviados, los cuales son productos de la descomposición o putrefacción natural de la basura²³. Estos líquidos percolados dependen del tipo de residuos, los que a su vez varían debido a diferentes características como la región, la época del año, la fase de descomposición, etc. los más conocidos son²⁴:

☞ De tipo mineral: productos de quemas naturales y residuos industriales y domésticos que generan cenizas volátiles y remanentes sólidos. Este tipo de lixiviados son ricos en sales de iones como potasio, sodio, calcio, plomo, molibdeno, manganeso, cadmio, cobre, zinc, cromo y mercurio²⁵.

☞ De tipo orgánico: considerados degradables, provienen de la descomposición de residuos orgánicos. Son estos lo que en las fases de degradación, generan subproductos que incluso se combinan con los lixiviados minerales hasta la obtención de complejos con un rango elevado de peligrosidad por lo que deben ser controlados y disminuidos para evitar la contaminación de las fuentes de agua cercanas y del ambiente circundante²⁶.

²⁰ ALCUBIERRE, D. Striatum Web. Un blog verde. Rellenos sanitarios. <http://www.dforceblog.com/2009/05/23/rellenos-sanitarios>. (último acceso: 2009)

²¹ JARAMILLO, J. Guía para el diseño y construcción de los rellenos sanitarios manuales. 2002.

²² KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

²³ Ibid. p.8

²⁴ ODRIOZOLA, V. Rellenos sanitarios: enterrar basura, sepultar el futuro. 2004

²⁵ Ibid.

²⁶ Ibid.

Además teniendo en cuenta estudios previos²⁷, dentro de un relleno sanitario existen dos procesos de reacción bioquímica, aeróbicos y anaeróbicos, bajo esta última característica se observan las dos fases típicas de un relleno sanitario:

☞ Aerobiosis. Los tanques están dispuestos a la acción del oxígeno atmosférico o promovido por procesos de aireación y los residuos que se encuentran en éste, circulan por un espacio corto (estimado en semanas como máximo), hasta que se haya consumido el oxígeno presente. En esta fase, se generan cantidades mínimas de Dióxido de carbono (CO₂) y algunos procesos de consumo de iones nitrato (NO₃)²⁸.

☞ Anaerobiosis. Compuestos orgánicos como los ácidos grasos son empleados en el metabolismo microbiano. Se compone de dos fases²⁹:

○ Fase acidogénica o anaeróbica: los organismos facultativos o anaeróbicos descomponen las sustancias orgánicas de partida como proteínas; grasas e hidratos de carbono en CO₂, H₂ y ácidos grasos, estos últimos son los responsables de la reducción del pH.

○ Fase metanogénica: es la fase más prolongada de la degradación. Ahí el nivel de acidez se ve estabilizado por la disminución del material orgánico, principalmente ácidos grasos y la consecuente generación de gases, en especial metano gracias a la acción de organismos anaeróbico.

Durante la fase o fermentación ácida o fase acidogénica los ácidos grasos producidos junto con el CO₂ y H₂ representan una alta carga orgánica en los lixiviados y generan valores de pH ácidos. En la fase de la fermentación metanogénica, los ácidos grasos son descompuestos a tal punto que los productos restantes pueden escapar como gases y con ello reducir en buena medida la carga orgánica de los lixiviados³⁰.

Según Ehrig, existen varios parámetros que permiten identificar en qué fase se halla el lixiviado del relleno sanitario (ver tabla 1).

²⁷ LAGERKVIST *et al.* 1995. Samordnad deponigas - Forskning, Utveckling, Demonstration. Slutrapport. En: KYLEFORS, Katarina. Predictions of Leaching from Municipal Solid Waste (MSW) and Measures to Improve Leachate Management at Landfills. 2002.

²⁸ *Ibid.*, p. 7

²⁹ *Ibid.*, p. 7

³⁰ EHRIG, H. Cantidad y contenidos de lixiviados de rellenos de desechos domésticos. 1999.

Tabla 1. Parámetros de lixiviados que varían de acuerdo a la etapa del proceso del relleno sanitario.³¹

Parámetro o (unidad)	Fermentación ácida		Fermentación metanogénica	
	Valor medio	Rango	Valor medio	Rango
pH	6,1	4,5-7,5	8	7,5-9
DQO (mgL ⁻¹)	22000	6000-60000	3000	500-4500
DBO ₅ (mgL ⁻¹)	13000		180	20-550
DBO ₅ /DQO	0,58		0.06	
Fe (mgL ⁻¹)	780	20-2100	15	3-280
Ca (mgL ⁻¹)	1200	10-2500	60	20-600
Mg (mgL ⁻¹)	470	50-1150	180	40-350
Mn (mgL ⁻¹)	25	0,3-65	0,7	0-45
Zn (mgL ⁻¹)	5	0,1-120	0,6	0,03-4
St (mgL ⁻¹)	7,2	1,1-14,7	0,94	0,3-7,25
SO ₄ (mg L ⁻¹)	500	70-1750	80	10-420

Al final de estos procesos se obtiene una composición característica en los lixiviados que varía en el tiempo (tabla 2) y la época del año³². De esta manera se hace evidente que este tipo de compuestos no pueden ser lanzados directamente al ambiente, por esta razón, uno de los principales mecanismos empleados para la descontaminación de estas aguas residuales es el tratamiento microbiológico³³.

Tabla 2. Parámetros para el análisis de las aguas residuales y su variación con respecto al tiempo³⁴.

Parámetro	Concentración (mgL ⁻¹)			
	1 año	2 años	3 años	4 años
DBO	4.460	13.000	11.359	10.907
DQO	11.210	20.032	21.836	18.533
Sólidos Disueltos	11.190	14.154	13.181	13.029
pH	7.1	6.6	7.3	6.9
Alcalinidad (CaCO ₃)	5.685	5.620	4.830	5.404
Dureza (CaCO ₃)	5.116	4.986	3.135	4.652
Calcio	651	894	725	818
Magnesio	652	454	250	453
Fosfatos	3	3	3	3

³¹ EHRIG, H. "Water and elements balances of landfills", Earth Sciences, The Landfill. En: MÉNDEZ NOVELO y otros. Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario. 2002

³² ALUKO, O, M SRIDHAR, y P OLUWANDE. Characterization of leachates from a municipal solid waste landfill site in Ibadan, Nigeria. 2003.

³³ KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

³⁴ Miliarium Aureum, S.L. variación de los lixiviados con la edad del vertido.

<http://www.miliarium.com/Proyectos/Vertederos/RSU/Lixivybiogas/Lixiviado.htm> (último acceso: 2009).

N-Kjeldahl	1.660	760	611	984
Sulfatos	114	683	428	462
Cloruros	4.816	4.395	3.101	4.240
Sodio	1.177	1.386	1.457	1.354
Potasio	969	950	968	961
Cadmio	0.04	0.09	0.1	0.09
Cromo	0.16	0.43	0.22	0.28
Cobre	0.44	0.39	0.32	0.39
Hierro	245	378	176	312
Níquel	0.53	1.98	1.27	1.55
Zinc	8.7	31	11	21
Mercurio	0.007	0.005	0.011	0.007

El lixiviado ofrece un excelente medio para el crecimiento de microorganismos. Los procesos de descomposición que se llevan a cabo en el relleno sanitario acarrearán la generación de grandes concentraciones de materia orgánica y nitrógeno, haciendo que estas aguas tengan un alto grado de contaminación, es aquí donde los microorganismos hacen uso de estas sustancias necesarias para su metabolismo y reducen eficientemente las altas concentraciones de material orgánico en poco tiempo³⁵. En casos como el de las bacterias productoras de biopolímero, las fuentes de carbono son transformadas en estos compuestos de reserva de gran utilidad para el hombre^{36,37}.

1.2. TRATAMIENTO CONVENCIONAL DE LIXIVIADOS Y AGUAS RESIDUALES

El tratamiento de aguas residuales tiene como objetivo controlar y reducir la contaminación presente en ellas a través del monitoreo constante de algunos parámetros fisicoquímicos y biológicos como son la demanda biológica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos totales (SST), demanda química de oxígeno (DQO), oxígeno disuelto (OD), Coliformes fecales y pH. Para mantener estos parámetros dentro de los rangos establecidos por la ley, las entidades encargadas incluye la aplicación de tres fases: Tratamiento primario, secundario y terciario³⁸.

1.2.1. Tratamiento primario. Incluye la remoción física de cuerpos voluminosos que pueden obstruir las bombas y canalizaciones, o bien interferir en el desarrollo de los procesos posteriores. Esto se lleva a cabo mediante rejillas de diferentes calibres, las cuales interceptan el flujo de la corriente en un canal de entrada a la estación depuradora. Posteriormente, los residuos son sometidos a sedimentación por gravedad de las partículas sólidas y contaminantes que no pudieron ser

³⁵ KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

³⁶ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p.21

³⁷ PUNRATTANASIN 2001. Op. Cit. p.3

³⁸ REYNOLDS, Kelly. Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica, identificación del problema. 2002.

retenidos con anterioridad. En esta fase también se lleva a cabo la eliminación de aceites o grasas que pueden causar obstrucción de rejillas y ductos. El tratamiento primario permite eliminar aproximadamente el 90% de las materias decantables y el 65% de las materias en suspensión^{39,40,41}.

1.2.2. Tratamiento secundario. En este, se reduce la materia orgánica presente en las aguas residuales a través de la digestión biológica en aerobiosis y/o anaerobiosis, usando lodos activados, filtros del goteo y biodiscos, que fomentan el crecimiento de los microorganismos por tanto esta fase es dependiente de la actividad microbiana. Estos sistemas, al manejar aspectos biológicos son afectados por factores externos, como son los climáticos, por lo que se tiene que estudiar sus características y adaptación al sitio de aplicación, para poder hacer una elección adecuada del método a emplear^{42, 43}.

1.2.2.1. Importancia de la Demanda Química de Oxígeno DQO. Determina la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua residual. Los procesos de depuración biológica de aguas residuales y en particular de eliminación biológica de nutrientes dependen de los diferentes componentes de la materia orgánica. La DQO de un afluente tiene dos componentes principales: la DQO biodegradable total y la no biodegradable total. La fracción biodegradable se compone de las fracciones fácilmente y lentamente biodegradables. La DQO fácilmente biodegradable está formada por compuestos solubles tales como los ácidos grasos volátiles, carbohidratos simples, alcoholes y aminoácidos, los cuales pueden absorberse directamente en el metabolismo. Los ácidos grasos volátiles, en especial el ácido acético componen la mayor parte de esta fracción la cual se utiliza como fuente de carbono en la desnitrificación; los ácidos grasos volátiles se requieren en las etapas anaeróbicas de la eliminación biológica de fosforo. La DQO lentamente biodegradable se hidroliza y fermenta para producir DQO soluble de diferentes clases, como los ácidos grasos^{44,45}.

Debido a esto, la parte más útil para el tratamiento de aguas residuales es la DQO biodegradable total. La DQO fácilmente biodegradable es básicamente del 8 al 25% de la DQO total en el agua residual y del 10 al 35% en el agua sedimentada, la DQO lentamente biodegradable representa generalmente un 40-60% de la DQO de un agua residual⁴⁶.

³⁹ ATLAS, R, y R BARTHA. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 2002.

⁴⁰ REYNOLDS 2002. Op. Cit.

⁴¹ OROPEZA B, Víctor Manuel. Parque Reserva, Peninsula del Carrizal. 2004.

⁴² ATLAS y BARTHA 2002. Op. Cit. p.473

⁴³ REYNOLDS 2002. Op. Cit. p.

⁴⁴ Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. Protocolo. Demanda Química de Oxígeno, método de reflujó abierto. 2001

⁴⁵ BARAJAS LÓPEZ, María Guadalupe. Eliminación biológica de nutrientes en un reactor biológico secuencial. 2002.

⁴⁶ Ibid., p.24

Igualmente, la fracción inerte de la DQO puede dividirse en no biodegradable soluble y no biodegradable particulada. La primera sale del sistema sin tomar parte en las reacciones bioquímicas del reactor, la segunda queda atrapada y acumulada en el fango⁴⁷.

1.2.3. Tratamiento terciario. Es de carácter físico-químico, utiliza la precipitación, filtración y cloración para reducir drásticamente los niveles de nutrientes inorgánicos, especialmente los fosfatos y nitratos del efluente final. El agua residual que recibe un tratamiento terciario adecuado no permite un desarrollo microbiano considerable^{48,49}.

1.3. TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS A TRAVÉS DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOPOLÍMERO

Las bacterias productoras de PHAs se han aislado en diferentes ambientes, como suelos, ambientes marinos, asociadas a rizosfera de plantas, caso en el que encontramos a *Bacillus megaterium*, primera bacteria en la que se descubrió el polímero de hidroxibutirato (HB), de nódulos de plantas leguminosas, aguas residuales, donde se encuentra el género *Pseudomonas sp.* y lodos activados^{50,51}.

La disposición y manejo de las aguas residuales se han convertido en un problema medioambiental de graves proporciones. Asimismo, la participación de bacterias productoras de PHAs se ha convertido en una alternativa para su tratamiento^{52;53} puesto que no sólo promueven la remoción de la materia orgánica sino que ofrecen la posibilidad de obtener un biopolímero versátil que, debido a su carácter biodegradable, resistencia al agua, radiación ultravioleta e impermeabilidad al oxígeno puede ser empleado industrialmente en el empaquetamiento de alimentos, botellas, contenedores de cosméticos, bolígrafos, productos de higiene personal, en el campo biomédico como suturas quirúrgicas y placas o tornillos biodegradables⁵⁴.

Las aguas residuales ofrecen una amplia gama de sustratos tales como, propionato, butirato, valerato, lactato, malato, piruvato, glucosa, citrato y succinato utilizables por bacterias productoras de polihidroxicanoatos como fuentes de

⁴⁷ BARAJAS LÓPEZ 2002. Op. Cit. p.24

⁴⁸ HANNA INSTRUMENTS CHILE. Etapas del tratamiento de Aguas servidas. 2008.

⁴⁹ DIPUTACIÓN GENERAL DE ARAGÓN. Depuración de Aguas residuales. 2008.

⁵⁰ LIU, W.T., A.T. NIELSEN, J.H. WU, C.S. TSAI, Y MATSUO, y S MOLIN. *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. 2001.

⁵¹ LEE, Sang Yup, y Jong-il CHOI. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. 1999

⁵² HANADA, S, H SATOH, y T MINO. Measurement of microorganisms with PHA production capability in activated sludge and its implication in activated sludge model No. 3. 2002.

⁵³ SATOH, *et al.* PHA production by activated sludge. 1999.

⁵⁴ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p.21

carbono^{55, 56}. Esta característica hace que el cultivo y producción de polímero biodegradable sea mucho más económico que otros sustratos^{57,58}.

El componente microbiológico dentro del tratamiento de lixiviados tiene una función vital, pues es una importante medida de descontaminación, es así como se ha evaluado el sistema conocido como “lodos activados”^{59,60}, el cual consiste en un tratamiento aerobio que oxida la materia orgánica a CO₂, agua y NH₄⁺ empleando la microbiota del lixiviado. El aire necesario para el procedimiento se proporciona mediante difusión o por tratamiento mecánico, durante éste, los microorganismos forman flóculos que, posteriormente, se dejan sedimentar en un tanque denominado tanque de clarificación⁶¹.

Las bacterias presentes en los lodos oxidan la materia orgánica y producen polisacáridos y otros polímeros extracelulares que facilitan la floculación. Los microorganismos aerobios representan una fracción importante cuyo número varía inversamente al tamaño del flóculo puesto que la difusión de O₂ al interior se dificulta⁶².

En los flóculos de gran tamaño el interior es anaerobio, los procesos están dirigidos principalmente por bacterias de este tipo, las cuales presentan ventajas frente a la digestión aerobia ya que ellas pueden usar el CO₂ como aceptor final de electrones y por tanto, no hay necesidad de suministrar oxígeno, el proceso anaerobio presenta mayor estabilidad en cuanto a producción de biomasa que el aerobio puesto que este último es más sensible a variables como temperatura, sólidos totales, pH y el tipo de bacteria estudiado, por otro lado, el sistema anaeróbico está directamente correlacionado con la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en el medio; por esta razón, el proceso de anaerobiosis es más económico y sencillo al momento de ponerlo en práctica (ver tabla 3)^{63,64}.

⁵⁵ CARRUCCI, et al. Dynamics of phosphorus and organic substrates in anaerobic and aerobic phases of a sequencing batch reactor. 1994.

⁵⁶ JEON, *et al.* Enhanced Biological Phosphorus Removal in an Anaerobic–Aerobic Sequencing Batch Reactor: Effect of pH. 2001.

⁵⁷ LEMOS, PC, LS SERAFIM, y MA REIS. Polyhydroxyalkanoates production by activated sludge in a SBR using acetate and propionate as carbon sources. 2004

⁵⁸ LEE y CHOI 1999. Op. Cit. p.133

⁵⁹ LEMOS, *et al.* Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge: 13C Labeling and *In Vivo* Nuclear Magnetic Resonance. 2003.

⁶⁰ TAKABATAKE, H, H SATOH, T MINO, y T MATSUO. PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater. 2002.

⁶¹ COTORAS, Davor. Los derrames incontrolados: El problema de la gestión de residuos sólidos no termina con su almacenamiento en vertederos controlados. 1995.

⁶² LAW Kin-Ho, LEUNG Yun-Chung, LAW FORD Hugh, CHUA Hong, LO Wai-Hung, HOIFU YU Peter. Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Isolated from Municipal Activated Sludge. 2001.

⁶³ FARRAH, Samuel, y Gabriel BITTON. Bacterial Survival and Association with Sludge Floccs during Aerobic and Anaerobic Digestion of Wastewater Sludge under Laboratory Conditions. 1983.

⁶⁴ MINO 2000. Op. Cit. p. 341.

Tabla 3. Diferencias debidas a la presencia y ausencia de oxígeno y procesos metabólicos en los microorganismos bajo estas circunstancias⁶⁵.

Zona	Característica
<u>Anaerobia</u>	
1. Fermentación	De la DBO soluble se producen ácidos grasos volátiles (AGV) por organismos facultativos.
2. Liberación de fosforo	Los AGV son transferidos al interior de la célula acumuladora para generar PHB a través de la liberación de energía por los ortofosfatos.
<u>Aerobia</u>	
3. Fermentación	Los PHB son oxidados. Los ortofosfatos son capturados y retenidos en el interior de la célula como PoliP y por lo tanto removidos de la solución. El fósforo es separado del sistema via purga de lodos.
4. Liberación de fosforo	La energía es capturada en las cadenas de polifosfatos para crecimiento y almacenamiento (a niveles que exceden en lo requerido para reproducción y crecimiento).

Igualmente, aunque el tratamiento no incluya lodos activados, el lixiviado tratado normalmente cumple con las mismas funciones y los factores que lo afectan son los mismos⁶⁶, el estudio constante de ambos sistemas de tratamiento ha permitido ampliar el campo de acción de estos procesos no sólo para la reducción de la carga contaminante de los lixiviados y aguas residuales, sino en la producción de metabolitos secundarios de importancia industrial como los polifosfatos (estudiados en los lodos activados) y los Polihidroxicanoatos, que son los poliésteres biosintéticos pertenecientes al grupo de biopolímeros degradables^{67,68}, y que generalmente depende de la fuente de carbono que se adiciona, del pH que presente el medio (siendo el óptimo entre 8 y 9) y de la presencia o ausencia de oxígeno^{69,70,71}.

Teniendo presente los trabajos realizados por Mino⁷² y Shin⁷³ en bacterias acumuladoras de polifosfatos (BAP), se estableció que la exposición de los

⁶⁵ FLORES ORDEÑANA, P, O GONZÁLEZ BARCELÓ, y S GONZÁLEZ MARTÍNEZ. Aspectos bioquímicos de la remoción biológica de fósforo y sus aplicaciones. 2007.

⁶⁶ KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

⁶⁷ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p.21

⁶⁸ SATOH, H, *et al.* Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic.1998.

⁶⁹ SATOH, *et al.* 1998. Op. Cit. p. 103

⁷⁰ CHUA, A. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. 2003.

⁷¹ WÄLTERMANN y STEINBÜCHEL 2005. Op. Cit. p.3607

⁷² MINO 2000. Op. Cit. p. 341

⁷³ SHIN, Onda, *et al.* Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratoryscale anaerobic/aerobic activated sludge system. 2002.

microorganismos a una alternancia entre una fuente rica de carbono dada en el proceso anaeróbico, con una pobre en carbono que se genera en el aeróbico induce a un cambio metabólico en las características de las cepas bacterianas acumuladoras de fosfatos, que se lleva a cabo con la conversión de las fuentes carbonadas a PHA y la hidrólisis del polifosfato intracelular a fósforo libre (Pi) el cual es acumulado como polifosfato en una fase aeróbica posterior, de esta manera se logra en el proceso aeróbico/anaeróbico un equilibrio en el potencial redox que facilita su autocompensación.

En la fase anaeróbica, los procesos de fermentación oxidativa de los compuestos carbonados como propionato o acetato, son transformados y almacenados en el contenido citoplasmático de las bacterias, formándose co-polímeros compuestos por 4 unidades monoméricas de PHA caracterizadas como 3HB, 3HV, 3H2MB y 3H2MV. Actualmente, este proceso se lo conoce como el “modelo de Mino”⁷⁴. En cuanto a PHA es interesante resaltar lo dicho por Takabatake en 2002⁷⁵; encontró, que un máximo contenido de PHA es más dependiente de las condiciones del influente que de las condiciones operacionales presentes en el medio.

Igualmente, como lo afirma Punrattanasin 2001⁷⁶, cuando el lixiviado presenta condiciones aeróbicas, una alta concentración de carbono, muy baja de fosfato y se mantiene constante la alimentación de nitrógeno amoniacal (NH_4 : 0.7mgL^{-1}), se produce un incremento de la fracción valerato, además, si estas condiciones son evaluadas bajo la presencia de ácidos grasos que intervienen directamente como intermediarios metabólicos en la síntesis de PHA se obtiene un incremento en la producción de PHA en el lixiviado.

1.4. POLIHIDROXIALCANOATOS

Son poliésteres 100% biodegradables polidispersos, es decir que las moléculas individuales de una especie particular de biopolímero no exhiben un peso molecular uniforme, por ende, sus propiedades físicas como la fuerza de tensión dependen de esta característica⁷⁷. El peso molecular del polímero depende de la genética del microorganismo empleado, de las condiciones de crecimiento y de la pureza de la muestra obtenida⁷⁸. Igualmente, la composición del copolímero se ve influenciada por el tipo de sustrato empleado, así, el copolímero 3-hidroxi-butarato y 3-hidroxi-valerato (3HB-co-3HV) es obtenido a partir de los ácidos propiónico y pentanóico⁷⁹.

⁷⁴ LIN, *et al.* Biodegradable plastic production by activated sludge with different carbon sources. 2003.

⁷⁵ TAKABATAKE, *et al.* 2002. Op. Cit. p.119

⁷⁶ PUNRATTANASIN 2001. Op. Cit. p.101

⁷⁷ STEINBÜCHEL, A, 2001. Op. Cit.1

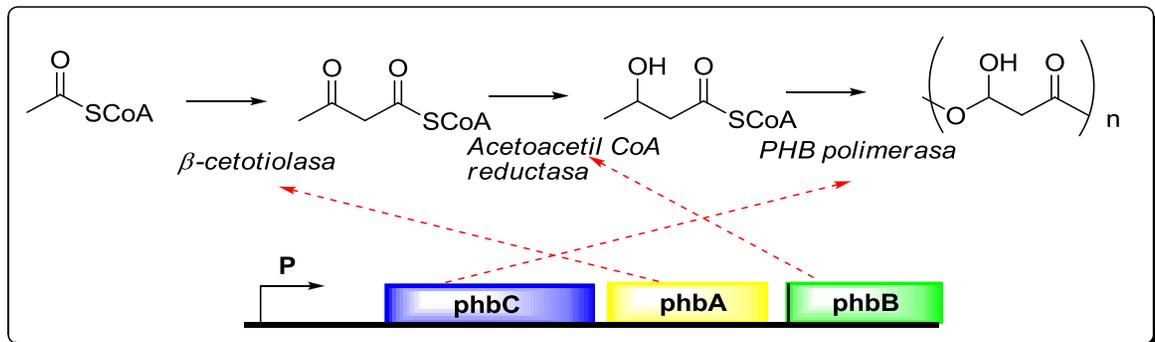
⁷⁸ PUNRATTANASIN 2001. Op. Cit. p.101

⁷⁹ *Ibid.*, p.101

Una ruta general que utilizan las bacterias para la síntesis de PHA inicia con el suministro en exceso de una fuente de carbono (glucosa, propionato, butirato, etc.) y otros factores nutricionales como nitrógeno fósforo, sulfuro, oxígeno o manganeso en menor cantidad, tras las correspondientes reacciones anabólicas y catabólicas el compuesto interiorizado se transforma en un tioéster de hidroxiacil coenzima A, el cual es un sustrato de la enzima PHA-sintasa, clave en la síntesis de PHA^{80,81}.

La ruta general es la más estudiada, conlleva a la formación de polihidroxibutirato P(3HB), consiste en tres reacciones catalizadas por tres enzimas (Ilustración 1). En esta, dos moléculas de Acetil-CoA se condensan en acetoacetyl-CoA por la acción de la enzima β -cetoacetyl-CoA tiolasa o β -cetotiolasa, posteriormente la acetoacetyl-CoA reductasa (NADPH-dependiente acetoacetyl-CoA dehidrogenasa) la reduce en monómeros de (R)-3-hidroxibutiril-CoA, por último, la enzima PHB polimerasa los une, para generar Poli(3-Hidroxibutirato)^{82,83}. Dependiendo de dónde se genere la polimerización, actuarán las proteínas llamadas fasinas encapsulando el polímero, determinando el número y tamaño de los gránulos⁸⁴.

Ilustración 1. Enzimas implicadas en la producción de P(3HB) y sus respectivos genes codificadores⁸⁵.



La producción del copolímero butirato co valerato P (3HB –co -3HV) incluye en su ruta metabólica la misma que genera el polímero de butirato y suma la que genera la fracción valerato, ésta ruta incluye el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y las tres enzimas que participan en la producción de la fracción butirato. Comienza con la condensación de Acetil-CoA y Propionil-CoA por la enzima β -cetotiolasa,

⁸⁰ PÖTTER, M. *et al.* Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. 2002.

⁸¹ FLORES ORDEÑANA, GONZÁLEZ BARCELÓ y GONZÁLEZ MARTÍNEZ . 2007. Op. Cit.

⁸² MADIGAN, MARTINKO, PARKER. Brock biología de los microorganismos. 2000.

⁸³ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p. 21

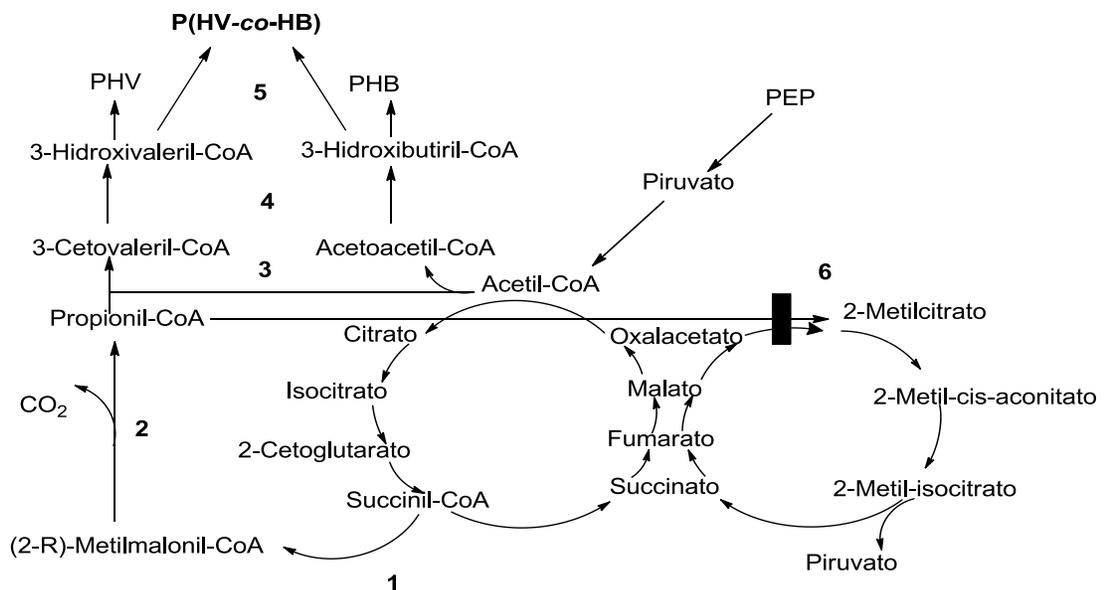
⁸⁴ PÖTTER, *et al.* 2002. Op. Cit. p.2413

⁸⁵ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p.21

produciendo 3-Cetovaleril-CoA, el cual es reducido a 3-Hidroxivaleril-CoA y polimerizado con 3-Hidroxibutiril-CoA por la enzima PHA sintasa o polimerasa⁸⁶.

Para generar propionil-CoA las bacterias productoras aprovechan el Propionato presente en medio y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Durante este ciclo se produce Succinil-CoA el cual es transformado a (2R)-Metilmalonil-CoA por la acción de la mutasa bella durmiente, Sbm por sus siglas en inglés (Sleeping beauty mutase), y la coenzima B12-dependiente. Posteriormente, la metilmalonil-CoA decarboxilasa cataliza la conversión de (2R)-metilmalonil-CoA a propionil-CoA. El propionato en el medio es catabolizado por el ciclo 2-metilcitríco, produciendo y usando la propionil-CoA (Ilustración 2)⁸⁷.

Ilustración 2. Ruta metabólica para la producción del copolímero P(3-HB-co-HV). Se ilustran 1. Sbm, 2. metilmalonil-CoA decarboxilasa, 3. β -cetotiolasa, 4. acetoacetil-CoA reductasa, 5. PHA sintasa, 6. Ácido 2-metilcitríco sintasa.⁸⁸



Hasta el momento se han encontrado más de 90 unidades monoméricas constituyentes de PHA conformadas por un grupo funcional hidroxilo adicionado al grupo carbonilo^{89,90}. Debido a la gran variabilidad de sustituyentes que conforma

⁸⁶ ALDOR *et al.* Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 2002.

⁸⁷ *Ibid.*, p.21.

⁸⁸ ALDOR, *et al.* 2002. Op. Cit. p. 3848

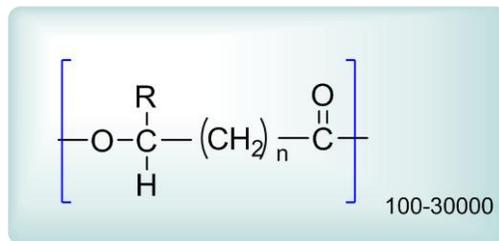
⁸⁹ FUKUI, T, y Y DOI. Cloning and Analysis of the Poly (3-Hydroxybutyrate -co-3-Hydroxyhexanoate).1997.

⁹⁰ HIDALGO, W. y ZAMBRANO, J. Aislamiento de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos PHAs presentes en suelos de la región andina del departamento de Nariño. 2005.

el grupo R, la amplia variedad de monómeros diferentes que pueden hacer parte de este y el grado variable de polimerización, permiten obtener diferentes polímeros o copolímeros que exhiben diversas propiedades físico-químicas^{91,92,93}.

La gran diversidad de PHAs (Ilustración 3) permite obtener plásticos con características que van desde materiales rígidos y quebradizos, hasta productos semejantes al hule. La mayoría de los estudios referentes a las propiedades físico-químicas de los PHAs se han realizado con el poli-3-hidroxi butirato (PHB) y el copolímero butirato co valerato P (3HB -co -3HV)^{94,95}.

Ilustración 3. Estructura general de los PHA y los diferentes radicales que al adicionarse al monómero cambian su configuración⁹⁶.



- | | |
|---|---------------------------------------|
| N | Variación de radical (R) |
| | Hidrógeno poli(-3-hidroxi propionato) |
| | Metil poli(-3-hidroxi butirato) |
| 1 | Etil poli (-3-hidroxi valerato) |
| | Propil poli (-3-hidroxi hexanoato) |
| | Pentil poli (-3-hidroxi octanoato) |
| 2 | Hidrógeno poli (-4-hidroxi butirato) |
| 3 | Hidrógeno poli (-5-hidroxi valerato) |

Partiendo de la ruta biosintética y de los estudios realizados sobre la producción de PHAs a partir de lixiviados y aguas residuales usando el método de lodos activados^{97,98,99,100}, se ha determinado que existen bacterias especializadas en la obtención de este tipo de polímeros como un subproducto de sus reacciones metabólicas cuyo fin principal es la reducción de elementos altamente contaminantes en las fuentes acuíferas¹⁰¹. Igualmente, se ha establecido el efecto de variables físicoquímicas como la concentración de los nutrientes o sustratos y el pH del medio sobre el crecimiento y síntesis de PHA bajo las condiciones presentes de rellenos sanitarios de Asia y Europa pero no en las que presenta el Relleno Sanitario Antanas.

⁹¹ STEINBÜCHEL, A, y H VALENTIN. Diversity of bacterial PHA acids. 1995.

⁹² PÖTTER, *et al.* 2002. Op. Cit. p.2413

⁹³ WÄLTERMANN y STEINBÜCHEL 2005. Op. Cit. p.3607

⁹⁴ JAN, S. *et al.* 1HMNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. 1996

⁹⁵ CHEN, W, T DON, y H YEN. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3-hydroxybutyrate -co -3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. 2006.

⁹⁶ PUNRATTANASIN 2001. Op. Cit. p.6

⁹⁷ KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

⁹⁸ LAW 2001. Op. Cit. p.515.

⁹⁹ MINO 2000. Op. Cit. p. 341

¹⁰⁰ TAKABATAKE, *et al.* 2002. Op. Cit. p.119

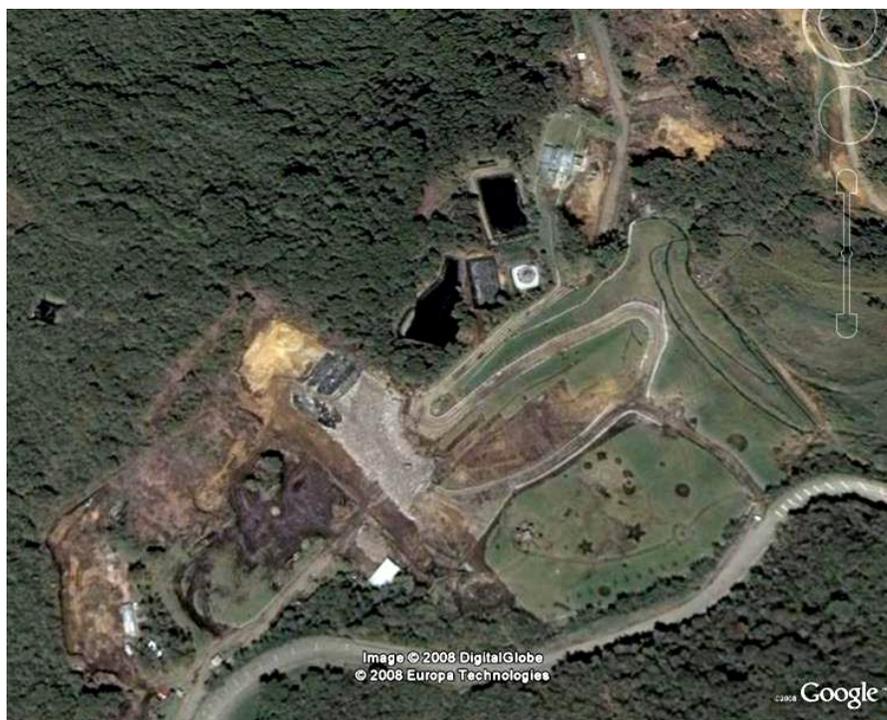
¹⁰¹ KYLEFORS 2002. Op. Cit. p.8

2. METODOLOGÍA

2.1. ÁREA DE ESTUDIO.

El Relleno Sanitario de Antanas perteneciente a la Empresa Metropolitana de Aseo (EMAS) S.A., E.S.P. se encuentra en el kilómetro 13, Alto de Daza vía Pasto-Buesaco, en la Vereda La Josefina del corregimiento Morasurco. Su altitud es de 2750m, con una temperatura promedio de 12°C y una extensión de 100 Hectáreas. Cuenta con una planta de tratamiento de lixiviados provenientes de los procesos de compactación; estos líquidos, mediante un sistema de conductos son transportados a piscinas, donde se someten a tratamientos aerobios y anaerobios, es aquí donde se lleva a cabo el proceso microbiológico de descontaminación¹⁰².

Ilustración 4: Relleno Sanitario Antanas, imagen satelital¹⁰³.



¹⁰² BASTIDAS, Adriana, Norma BENAVIDES, y Lidia BRAVO. Estandarización Y Validación Del Método Cromatográfico Para La Determinación Y Seguimiento De Pesticidas Organoclorados En El Proceso De Tratamiento De Lixiviados Del Relleno Sanitario Antanas De La Ciudad De San Juan de Pasto. 2005.

¹⁰³ GOOGLE. Google Earth. 2008.

2.2. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS.

Se aplicó un diseño factorial 2^n con 3 réplicas en el centro de la zona experimental^{104,105} donde “2” corresponde al número de niveles por factor y “n” equivale al número de factores: urea, KH_2PO_4 y mezcla de oligonutrientes, de esta manera se obtuvieron 8 tratamientos los cuales se referencian en la tabla 4. Las concentraciones de los factores se indican en la tabla 5.

Tabla 4. Matriz de tratamientos como resultado de la combinación de niveles y factores según diseño experimental 2^n . (Fuente: esta investigación)

Tratamiento	Urea	KH_2PO_4	Oligonutrientes	% Remoción
1	1	1	1	
2	-1	1	1	
3	1	-1	1	
4	-1	-1	1	
5	1	1	-1	
6	-1	1	-1	
7	1	-1	-1	
8	-1	-1	-1	
Punto C 1	0	0	0	
Punto C 2	0	0	0	
Punto C 3	0	0	0	

Tabla 5. Concentraciones aplicadas en los tratamientos. (Fuente: esta investigación)

Factor	Punto de Paso (Pp)	Punto de Central (Pc)	1	-1
Urea (gL^{-1})	0,42	4,71	5,13	4,29
KH_2PO_4 (gL^{-1})	0,035	1,035	1,07	1
Oligonutrientes (mL L^{-1})	0,01	2,14	2,15	2,13

Para todos los tratamientos se utilizaron como base 50 mL de lixiviado del RSA de la ciudad de Pasto, los cuales se suplementaron con diferentes nutrientes, urea como fuente de nitrógeno y fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) como fuente de fósforo (ver tabla 5). Además, se adicionó una mezcla de oligonutrientes correspondiente a los requerimientos metabólicos¹⁰⁶ bacterianos cuya composición se indica en la tabla 6.

¹⁰⁴ MILLER, J, y J.N MILLER. Estadística para química analítica. Segunda Edición. 1993.

¹⁰⁵ KUEHL, R. Diseño de experimentos. 2001.

¹⁰⁶ DÍAZ – BÁEZ, M, S ESPITA, y F MOLINA. Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología. 2002.

Tabla 6. Composición de la mezcla de oligonutrientes empleada para el diseño del medio de cultivo.

Compuesto	Cantidad (g/100 mL)
NaCl	0.5
ZnSO ₄	0.5
FeCl ₃	0.5
CuSO ₄	0.5
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.5
MnCl · 4H ₂ O	0.5
CoCl ₂	0.5

Con los datos obtenidos se obtuvo una ecuación polinomial de primer orden, la cual permitió emplear el método de la máxima pendiente con el fin de detectar las mejores concentraciones de cada uno de los nutrientes.^{107,108} Con los coeficientes de regresión generados por la ecuación, se calculó el tamaño de paso para cada uno de los factores y posteriormente se aplicó un diseño de bloques al azar. Cada tratamiento fue inoculado con lixiviado tomado de la piscina anaerobia el cual fue colectado a una profundidad de 50cm, este se inoculó a una concentración del 10% del volumen a fermentar, la fermentación se realizó durante 5 días a 20°C. Como variable de respuesta se tuvo en cuenta el porcentaje de remoción de materia orgánica, para esto, se calculó la DQO inicial y final que se aplicó en la ecuación 1.

Ecuación 1. Obtención del porcentaje de remoción¹⁰⁹.

$$\% \text{Remoción} = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100$$

Donde:

Ci: DQO encontrado en el blanco

Cf: DQO encontrado en el tratamiento

2.3. ESTIMACIÓN *in-Vitro* DE LA PRODUCCIÓN DE PHA DE BACTERIAS AISLADAS DEL RSA.

2.3.1. Diseño de muestreo

Para cumplir esta fase, se aislaron bacterias productoras de PHAs del lixiviado, para tal efecto, se utilizó como unidad de muestreo la caja de Petri. Para calcular el número de cajas de Petri se implementó una prueba piloto con la cual se

¹⁰⁷ MILLER y MILLER 1993. Op. cit. p.147

¹⁰⁸ KUEHL, R 2001. Op. cit. p.423.

¹⁰⁹ MINISTERIO DE AMBIENTE VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Op. Cit.

estableció la media, varianza, n muestral y la distribución estadística de las colonias^{110,111}.

Los 4 puntos de muestreo se indican en la tabla 7 y considerando que en cada uno hay diferentes volúmenes se aplicó un diseño de muestreo por conglomerados para el cual se estableció el porcentaje de contribución en volumen de lixiviado para cada punto de muestreo.

Tabla 7. Se referencia el volumen de cada zona de muestreo y el porcentaje de contribución o volumen de lixiviado que puede alojar cada área. (Fuente: esta investigación)

Zona de Muestreo	Volumen alojado de lixiviado (m ³)	Porcentaje de contribución
Piscina de tratamiento aerobio	599,5	9,37
Piscina de tratamiento anaerobio	1199	18,74
Piscina de excesos	599,5	9,37
Zona de inundación	4000	62,51
Volumen Total	6399	

Para determinar el número de cajas de Petri por zona de muestreo se empleó la ecuación 2. Posteriormente, para definir los puntos de muestro por zona de muestreo se utilizó la ecuación 3. Los puntos de muestreo por área se tomaron al azar.

Ecuación 2. Obtención de los puntos de muestreo y el número de cajas de Petri por zona de muestreo

$$\frac{(\% \text{ Contribución} \times N)}{100} = \text{Número de cajas de Petri por zona de muestreo}$$

Donde *N* equivale al número de cajas de Petri obtenidas mediante fórmula.¹¹²

Ecuación 3. Obtención de los puntos de muestreo por zona de muestreo

$$\frac{\text{Número de cajas de Petri por zona de muestreo}}{5 \text{ repeticiones}} = \text{Puntos de muestreo}$$

2.3.2. Aislamiento de bacterias productoras de PHA.

De cada punto de muestreo se colectaron en contenedores estériles, 160mL de lixiviado los cuales se analizaron en el laboratorio de Biotecnología de la

¹¹⁰ DANIEL, Wayne. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 2005.

¹¹¹ KREBS, Ch. Ecological methodology. 1989

¹¹² DANIEL, W. 2005. Op. Cit. p.83

Universidad de Nariño, aquí el lixiviado fue llevado a una dilución 10^{-3} , $100\mu\text{L}$ ¹¹³ se inocularon mediante siembra en superficie sobre agar Plate Count suplementado con glucosa al 5% y Rojo Nilo al 0.1%, esta operación fue realizada con 5 repeticiones. Luego fueron incubadas a 20°C durante 5 días, se determinaron las características culturales de las colonias y morfológicas de las bacterias, finalmente, las cajas de Petri fueron observadas en un transiluminador UV para determinar, en las colonias, la emisión de fluorescencia rojo-rosa, indicativo de la presencia de PHA de acuerdo con los parámetros ya establecidos en reportes bibliográficos¹¹⁴.

2.3.3. Preservación de Bacterias.

Por caja, una colonia de cada morfotipo bacteriano productor de polímero fue preservada en perlas de porcelana y mantenidas en tubos tapa rosca que contienen silica gel como deshidratador.

2.3.4. Producción de PHA por bacterias aisladas.

La síntesis de PHA se evaluó para cada morfotipo bacteriano a través de un diseño de bloques al azar con 3 réplicas, donde la unidad experimental fue un Erlenmeyer de 200mL y como variable de respuesta se tuvo en cuenta la producción de PHA. Se empleó caldo base estéril compuesto por glucosa (5gL^{-1}), peptona (7.5gL^{-1}) y extracto de levadura (0.5gL^{-1}), igualmente, se ajustó su pH a 8,5 con Hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl)¹¹⁵.

Se preparó un preinóculo compuesto por 5mL de caldo base, este fue inoculado con una colonia de un morfotipo bacteriano productor de PHA, se incubó durante 24 horas a 20°C, posteriormente, se adicionó 1mL de preinóculo a 9mL de caldo base, después de 24 horas de incubación a 20°C se determinó y ajustó la densidad bacteriana a una absorbancia de 0,174 ($\lambda 600\text{nm}$). Posteriormente, los 10mL fueron adicionados al erlenmeyer de 200mL que contenía 90mL de caldo base. Finalmente, al cabo de 5 días se evaluó la producción de PHA según la metodología adaptada por Fernández¹¹⁶ y producción de biomasa mediante peso seco¹¹⁷.

¹¹³ LAITINEN, S. *et al.* Relationship between bacterial counts and endotoxin concentration in the air of Wastewater treatment plants. 1992.

¹¹⁴ SPIEKERMAN, P. *et al.* A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. 1999.

¹¹⁵ CHUA, *et al.* 2003. Op. Cit. p. 3602

¹¹⁶ FERNÁNDEZ, ORTIZ y ESPAÑA. Caracterización de poli-(Hidroxibutirato-co-hidroivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FLB2. 2005.

¹¹⁷ LEFEBVRE, G, M ROCHER, y G BRAUNEGG. Effects of Low Dissolved-Oxygen Concentrations on Poly-(3-Hydroxybutyrate –co- 3-Hydroxyvalerate) Production by *Alcaligenes eutrophus*. Applied and Environmental Microbiology. 1997.

2.4. EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA EN LA TRANSFORMACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL LIXIVIADO DEL RSA.

Se utilizaron los 12 morfotipos bacterianos productores de PHA en un cultivo mixto, para esto se aplicó un diseño de bloques al azar, la unidad experimental fue un erlenmeyer de 2L, el cual contenía el medio de cultivo que presentó el mejor porcentaje de remoción de materia orgánica enunciado en el numeral 2.2.

Para la preparación del inóculo se empleó el caldo base mencionado en el numeral 2.3.4. Cada morfotipo bacteriano fue inoculado en 100mL de este medio e incubado a 20°C, luego de 5 días se ajustó su absorbancia a 0,174 (λ 600nm). Posteriormente 8,33mL de cada uno de los 12 inóculos fueron adicionados a 900mL de lixiviado hasta completar 1000 ml (tratamiento). Adicionalmente se montaron los controles constituidos por el medio anteriormente mencionado, sin la inoculación de los morfotipos bacterianos. Estos se incubaron a 20°C durante 5 días, superado este tiempo de incubación se determinó DQO t y s (total y soluble) y PHA. Los tratamientos se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Conformación de los tratamientos aplicados. (Fuente: esta investigación)

Tratamiento	Inóculo (mL)	Urea (gL^{-1})	PO4 (gL^{-1})	Mezcla oligonutrientes (ml)
M1	100	5,13	1,07	2,15
Control		5,13	1,07	2,15

Al cabo de este período se determinó la DQO total, se extrajeron 40mL de lixiviado los cuales se centrifugaron a 5000 r.p.m durante 10 minutos para obtener un sobrenadante en el que se determinó DQO soluble. Adicionalmente, 10mL más de lixiviado fueron igualmente centrifugados para obtener el sedimento en el que se cuantificó en mgL^{-1} la cantidad de PHA producidos. Posteriormente, se determinó el porcentaje de materia orgánica removida por las bacterias productoras de PHA empleando la ecuación 1.

El polímero extraído fue caracterizado¹¹⁸ mediante cromatografía de gases en la Universidad de Nariño y comparado con un patrón de copolímero Poli-(3-Hidroxibutirato - co – 3-Hidroxivalerato).

¹¹⁸ FERNÁNDEZ, ORTIZ y ESPAÑA. 2005. Op. Cit. p. 5

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA REMOCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS.

Con el fin de evaluar si los nutrientes tienen efecto en la remoción de materia orgánica del lixiviado se aplicó un diseño factorial 2^n , en la tabla 9, se aprecian los resultados del diseño, Inicialmente se determinó que el valor de DQO proveniente del lixiviado sin tratamiento corresponde a 9109 mgL^{-1} de oxígeno disuelto.

Tabla 9. Porcentajes de remoción en los diferentes tratamientos. (Fuente: esta investigación)

Orden	Medio	pH	DQO ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$)	PHA mg (gravimetría)	PHA (gL^{-1})	% Remoción
1	+++	9,19	5076,27	0,0014	0,14	34,59
2	-++	9,15	5410,33	0,0022	0,22	31,72
3	+ - +	9,25	5078,45	0,0038	0,38	34,57
4	--+	9,15	5917,01	0,0004	0,04	27,38
5	++-	9,18	8365,61	0,0035	0,35	6,38
6	-+-	9,09	6007,11	0,0006	0,06	26,60
7	+- -	9,23	7215,35	0,0031	0,31	16,24
8	---	9,1	5175,75	0,0027	0,27	33,73
9	Control 1	9,15	5995,55	0,0004	0,04	26,70
10	Control 2	9,19	5733,21	0,0021	0,21	28,95
11	Control 3	9,14	5487,45	0,0024	0,24	31,06

En esta tabla se aprecia que el mejor tratamiento para la remoción de materia orgánica corresponde al medio 1 el cual difiere de los controles en que tiene mayor concentración de los tres factores. A través del algoritmo de Yates con 95% confiabilidad se determinó que el efecto de la mezcla de oligonutrientes sobre la remoción de materia orgánica es altamente significativo sobre los demás factores (p-Value: 0,0027) y que su interacción con los otros factores es igualmente significativa (Urea – Oligonutrientes: p-Value: 0,0022 y Fosfato – Oligonutrientes: p-Value=0,0357).

Este resultado se debe a que los oligonutrientes son minerales importantes para el metabolismo microbiano porque tienen una función estructural para varias enzimas ya que actúan como cofactores¹¹⁹. Su necesidad en cuanto a concentración es muy pequeña por lo que no es necesario añadirlos al medio de cultivo¹²⁰. Desde esta perspectiva se sugiere que en el lixiviado del relleno

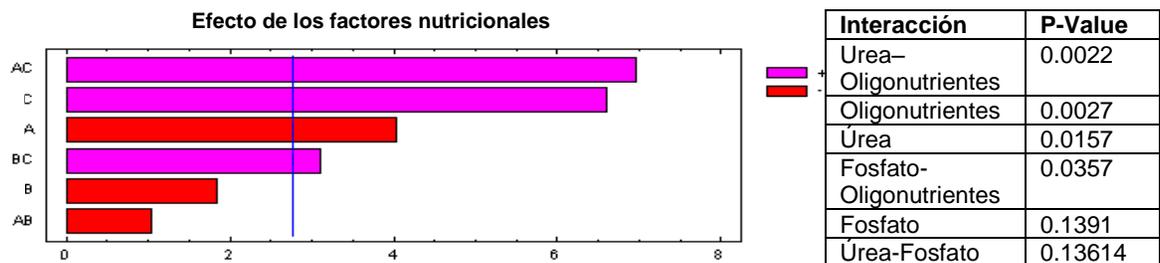
¹¹⁹ BUGG, T. Introduction to enzyme and coenzyme chemistry. 2004.

¹²⁰ MADIGAN, MARTINKO, PARKER. 2000. Op. Cit. p. 596

sanitario la disponibilidad de estos nutrientes es escasa, en consecuencia es necesario adicionarlos para incrementar la eficiencia de las bacterias¹²¹

El efecto de cada uno de los factores nutricionales sobre la remoción de materia orgánica se representa en la gráfica 1, los factores que no exceden la línea divisoria no son significativos.

Gráfica 1. Efectos estimados e interacciones de los factores nutricionales sobre la remoción de materia orgánica del lixiviado del RSA. A= Urea, B= Fosfato, C= Oligonutrientes. (Fuente: esta investigación)



Es de resaltar que la urea es esencial en el metabolismo bacteriano porque es fuente de carbono y nitrógeno necesario para la formación de proteínas y aminoácidos¹²², sin embargo, la urea puede ser hidrolizada por organismos amonificantes produciendo amonio y CO₂, el amonio incrementa el pH que afecta negativamente el metabolismo microbiano, en consecuencia, con un exceso de urea en el medio de cultivo se disminuye el porcentaje de remoción de materia orgánica¹²³. No obstante la interacción urea-oligonutrientes es significativamente positiva, este efecto posiblemente se obtiene porque los cofactores promueven vías metabólicas para asimilar el nitrógeno durante el anabolismo bacteriano.

Por otro lado, la interacción fosfato – oligonutrientes resultó significativa, el fosfato es necesario para la generación de ATP, ácidos nucleicos, polímeros y fosfolípidos, pero sin la presencia de los cofactores zinc y hierro¹²⁴ que ayuden en la actividad enzimática de la fosfatasa, este compuesto se acumula inhibiendo el crecimiento microbiano¹²⁵.

Matemáticamente, la remoción de la materia orgánica por las bacterias, en términos de los nutrientes utilizados es expresada en la ecuación 4, en esta se evidencia que la interacción con mayor efecto es urea - oligonutrientes la cual duplica la interacción: fosfato – oligonutrientes.

¹²¹ PETERSON, W. y STRONG, F. General biochemistry. 1953.

¹²² ATLAS y BARTHA 2002. Op. Cit. p.394

¹²³ BORZACCONI, L. *et al.* Comparación de tratamientos aerobio y anaerobios aplicados a lixiviado de relleno sanitario. 2001

¹²⁴ BAHAMONDE, M. I. Estudio funcional y molecular del canal Maxi-Ci activado por antiestrógenos. 2003.

¹²⁵ ATLAS y BARTHA 2002. Op. Cit. p.394

Ecuación 4. Diseño polinomial de relación entre factores

$$\% \text{ Remoción} = 34,6673 - 4,425 \cdot \text{Úrea} - 2,0225 \cdot \text{Fosfato} + 7,2475 \cdot \text{Oligonutrientes} - 1,13 \cdot \text{Úrea} \cdot \text{Fosfato} + 7,645 \cdot \text{Úrea} \cdot \text{Oligonutrientes} + 3,4175 \cdot \text{Fosfato} \cdot \text{Oligonutrientes}$$

Esta ecuación se utilizó para aplicar el método de la máxima pendiente, con el fin de calcular concentraciones que incrementen la degradación de la materia orgánica, para tal efecto se utilizó las proporciones del medio de cultivo con mejor porcentaje de remoción (tablas 5 y 9). Los resultados de las concentraciones de los nuevos medios de cultivo se aprecian en la tabla 10.

Tabla 10. Se indican las diferentes concentraciones de los nutrientes por cada uno de los medios a experimentar. (Fuente: esta investigación)

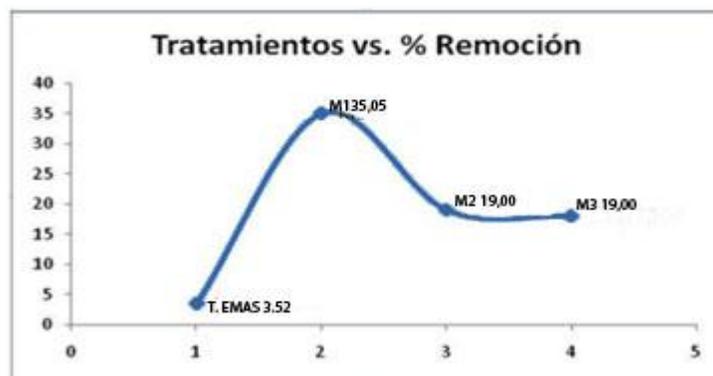
Nutriente	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Tratamiento EMAS
**Urea (g L ⁻¹)	5.13	4.41	4.71	*DAP: 0.34 g/L Urea: 0.17 g/L
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	1.07	0.975	1.01	
Oligonutrientes (mL L ⁻¹)	2.15	2.16	2.17	

*DAP (Fosfato diamónico): Nitrógeno 18-21%, Fósforo 46-54%, Azufre 2%; **Úrea: pureza ≥98% ¹²⁶

Posteriormente se aplicó un diseño experimental de bloques al azar para confrontar los resultados de los 3 medios obtenidos por el método de máxima pendiente con el medio de cultivo utilizado por la empresa EMAS.

Después de cinco días de fermentación se obtuvieron los porcentajes de remoción de materia orgánica, los resultados se aprecian en la grafica 2, en esta se observa que el medio 1 presenta la mejor remoción de materia orgánica, obteniendo un porcentaje promedio del 35%. (Gráfica 2) ¹²⁷.

Gráfica 2. Remoción de materia orgánica en el lixiviado presentada por los medios formulados (DQO Blanco= 3441,69). (Fuente: esta investigación)



¹²⁶ Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Merck4Biosciences. 2011. <http://www.merck-chemicals.com/spain/life-science-research> (último acceso: enero de 2011).

¹²⁷ KUEHL, R 2001. Op. cit. p.423

Se puede apreciar que la remoción de materia orgánica está relacionada a la diferencia en la concentración de nutrientes. Si se compara la composición de los factores entre el medio 1 y el tratamiento aplicado en EMAS, se puede apreciar que en el caso de EMAS, la concentración de los factores que afectan significativamente el proceso de remoción se halla por debajo de las concentraciones encontradas en el medio 1. Esto significa que menores y mayores concentraciones de nutrientes con respecto al medio 1 reduce la remoción de materia orgánica.

Se debe tener en cuenta, que el proceso de descontaminación de las aguas residuales, se realiza en diferentes etapas. Un tratamiento no debe ser tomado como única opción, incluso la fase biológica de remoción del material orgánico, requiere de etapas y equipos que complementen la labor de los microorganismos¹²⁸. La combinación del tratamiento planteado, con la subsecuente aplicación de otros como el reactor de biodisco en condiciones aerobias, probado por Álvarez y Suarez¹²⁹ y Borzacconi¹³⁰, podrían generar una mayor remoción de materia orgánica al final del tratamiento secundario y así incrementar la eficiencia total de remoción de la materia orgánica. Como lo afirma Ruiz, la combinación de los tratamientos aerobio y anaerobio permite eficacias en la eliminación de la DQO entre el 55 y 75% y reducción en los costos de operación del 30 al 60%¹³¹.

Aunque el valor de remoción fue de un 35%, cabe destacar que los valores de la DQO disminuyeron, pasando de un 3441,693 mgL⁻¹ presentado en el blanco, a un 2235,3773 mgL⁻¹ presentado en el medio 1 (M1). De igual manera, el porcentaje de remoción obtenido en este trabajo es mayor al que consigue EMAS (Gráfica 2) al finalizar el tratamiento microbiológico en las piscinas del Relleno sanitario (14,8%)¹³², demostrando que con solo la modificación de nutrientes se incrementa la remoción del sistema.

¹²⁸ VALENCIA, V. *et al.* Evaluación del tratamiento fisicoquímico de lixiviados parcialmente estabilizados. Estudio de caso: Vertedero de Navarro. 2007.

¹²⁹ ÁLVAREZ CONTRERAS, A. y SUAREZ GELVEZ, J. 2006. Tr, A, y J SUAREZ GELVEZ. Tratamiento Biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario "El Guayabal" de la ciudad San José de Cúcuta.» Tratamiento Biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario "El Guayabal" de la ciudad San José de Cúcuta. 2006.

¹³⁰ BORZACCONI, L. *et al.* 2001. Op. cit.

¹³¹ RUIZ, I, J ÁLVAREZ, y M SOTO. El potencial de la digestión anaerobia en el tratamiento de aguas residuales urbanas y efluentes de baja carga orgánica. 2001.

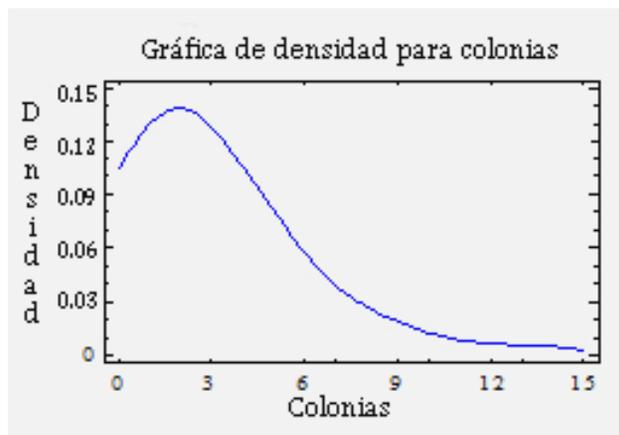
¹³² Ingeniero José Zambrano EMAS. Comunicación personal.

3.2. ESTIMACIÓN *in Vitro* DE LA PRODUCCIÓN DE PHA DE BACTERIAS AISLADAS DEL RSA.

3.2.1. Resultados de la prueba piloto

En la prueba piloto se muestrearon 2 puntos en cada una de las 4 zonas de muestreo, con 5 réplicas por punto, empleando en total 40 cajas de Petri. De esta manera se obtuvieron un total de 10081 colonias, 117 de las cuales, presentaron la fluorescencia rojo-rosa típica de las colonia productoras de polímero en presencia de rojo nilo¹³³. Considerando que las muestras presentan una distribución de Poisson, típica entre las comunidades bacterianas¹³⁴ como se indica en la gráfica 4, media igual a 2,925 y varianza de 8,4301.

Gráfica 3. Distribución de las bacterias aisladas. (Fuente: esta investigación)



Estableciendo un nivel de confiabilidad de 95% se prosiguió a calcular el tamaño de la muestra a través de la fórmula:

Ecuación 5. Fórmula aplicada a distribuciones tipo Poisson¹³⁵.

$$n = \frac{400}{x} = 136,75$$

Obteniendo un total de 136,7521 (137) cajas de Petri, o unidades de muestreo y la cantidad de puntos de muestreo de acuerdo a las ecuaciones 2 y 3 descritas en el numeral 2.3.1. Cabe mencionar que en el caso del cálculo generado para las

¹³³ SPIEKERMAN, P. *et al.* 1999. Op. Cit. p. 73

¹³⁴ THOMAS, L, J WIMPENNY, y G BARKER. Spatial interaction between subsurface bacterial colonies in a model system: a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. 1997.

¹³⁵ KREBS, Ch. 1989. Op. Cit. p. 188

unidades de muestreo y los puntos de muestreo, se presentaban resultados decimales, por tanto se aplicó una corrección en la que se acercó el resultado al número entero superior más cercano, en el caso de las unidades de muestreo se aproxima a un múltiplo de cinco debido a que se realizaron repeticiones por quintuplicados. (Tabla 11).

Tabla 11. Total de cajas de Petri a inocular en este estudio y los puntos de muestreo por área de muestreo. (Fuente: esta investigación)

Zona de Muestreo	Volumen alojado de lixiviado (m3)	Porcentaje de contribución	Unidades de muestreo	Puntos de muestreo	Unidades de muestreo corregidas	Puntos de muestreo corregidos
piscina de tratamiento aerobio	599,5	22,64	31	6	35	7
piscina de tratamiento anaerobio	1199	45,28	62	12	65	13
piscina de excesos	599,5	22,64	31	6	35	7
Zona Aspersión Alta	250	9,44	13	3	15	3
Total	2648		137		150	

3.2.2. Aislamiento de bacterias productoras de PHA.

Después de un periodo de cultivo de 72 horas de las 150 cajas de Petri evaluadas, se obtuvo un total de 45370 colonias, de las cuales, 12 morfotipos bacterianos presentaron fluorescencia rojo-rosa, estas fueron evaluadas microscópicamente para determinar su forma, reacción a la tinción de Gram (Ilustración 5) y tipo de agrupación. Así es posible observar que los morfotipos bacterianos presentan una predominancia de formas bacilares Gram-negativas organizadas en monadas como se observa en la tabla 12.

Ilustración 5. Fotografía en aumento 100x de bacterias bacilares Gram-negativas. (Fuente: esta investigación)



La presencia de bacterias gram-positivas y negativas es un indicativo de la transformación del material orgánico presente en el lixiviado, en tal sentido se ha reportado que los ácidos grasos precursores de biopolímero, se encuentran en altas concentraciones en los lixiviados¹³⁶ estos compuestos son aprovechados como fuente de carbono y energía¹³⁷ por grupos bacterianos como las arqueobacterias¹³⁸ que son normalmente visibles como organismos gram-negativos y las syntrofomonas gram – negativas quienes además son capaces de producir PHAs.¹³⁹

Tabla 12. Resultados de las características microscópicas de cada morfotipo productor de polímero. (Fuente: esta investigación)

Código Investigador	Características microscópicas									
	Forma			Gram		Agrupación				
	Coco	Bacilo	Cocobacilo	(+)	(-)	Mónadas	Duplas	Tétradas	Estrepto	Estafilo
PAP2R2 M3		x			x	x				
PAP4R3 M2		x			x	x				
PAnP1R4 M1-1		x			x	x				
PAnP1R4 M2			x		x	x				
PAnP2R2 M1	X				x	x				
PAnP2R4 M2	X			X			X			
PAnP3R1 M1	X			X		x				
PAnP3R3 M1		x			x	x				
PEP1R2 M2	X		x		x	x				
PEP2R3 M2	X			X		x				
PEP5R4 M2		x			x	x				
PEP6R3 M1		x			x	x				

3.2.3. Producción de PHA por bacterias aisladas.

Posteriormente, se realizó la extracción de PHA a los 12 morfotipos bacterianos encontrados determinando una producción máxima de 0.2 gL⁻¹ presentados en PAP4R3 M2 y PEP1R2 M2. (Gráfica 5)

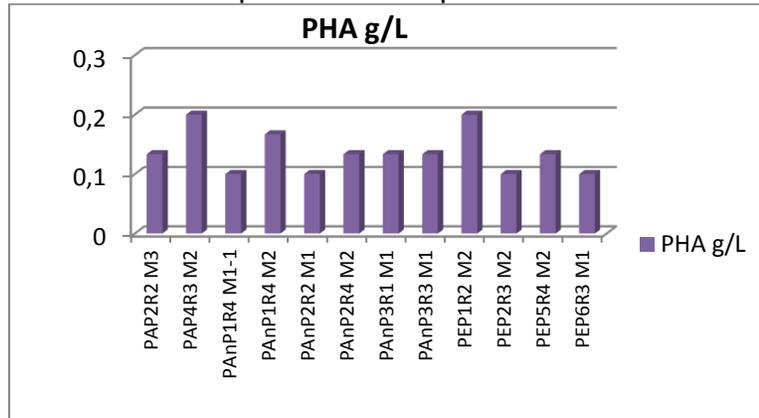
¹³⁶ BARAJAS LÓPEZ 2002. Op. Cit. p.24

¹³⁷ COMANDO SULUDA, A.I. Optimización del compostaje de residuos sólidos urbanos en proceso de serie anaerobio-aerobio. 2006.

¹³⁸ AKARUBASI, *et al.* Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. 2005

¹³⁹ CHUNYANG Zhang, XIAOLI Liu, XIUZHU Dong. Syntrophomonas erecta sp. nov., a novel anaerobe that syntrophically degrades short-chain fatty acids. International. 2005.

Gráfica 4. Producción de PHA por los morfotipos bacterianos aislados.



3.3. EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA EN LA TRANSFORMACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA PRESENTE EN EL LIXIVIADO DEL RSA.

Los resultados obtenidos en el experimento, realizado para evaluar la eficiencia de la remoción de la materia orgánica se expresan en la tabla 13. Los valores iniciales del lixiviado fueron DQO total (DQOT): 5049,37; DQO soluble (DQOs): 4248,90.

Tabla 13. Valores de remoción de Materia orgánica del lixiviado por bacterias productoras de PHAs en medio cultivo a base de lixiviado suplementado con nutrientes después de 5 días de incubación. (Fuente: esta investigación)

Medio	DQO T (mgO ₂ L ⁻¹)		DQO S (mgO ₂ L ⁻¹)		PHA mg L ⁻¹		%Remoción DQOt (mgO ₂ L ⁻¹)		%Remoción DQOs (mgO ₂ L ⁻¹)	
	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar
C	4374,39	96,08	3486,01	125,75	90,00	0,02	10,90	2,83	21,62	7,41
T	4080,73	64,87	2775,75	20,18	60,00	0,01	21,98	8,26	34,61	2,39

C = Medio de cultivo sin bacterias, T = medio de cultivo inoculado con bacterias productoras de PHAs

Teniendo en cuenta los valores obtenidos en la DQO total y soluble se determinó el porcentaje de remoción de materia orgánica en los medios: control y tratamiento (tabla 13). Aplicando un análisis de varianza se determinó con 95% de confiabilidad que existen diferencias significativas entre el porcentaje de remoción de los medios evaluados (valor-P= 0,003), los mejores resultados se presentaron con el medio inoculado con bacterias productoras de PHAs, tanto para DQOt y DQOs.

Las remociones de materia orgánica (tabla 13) en los tratamientos responden a que en la DQO se encuentran compuestos que las bacterias utilizan como fuente de carbono. Aquí están presentes los ácidos grasos volátiles propionato, butirato y

valerato; entre otros, los cuales son utilizados como intermediarios metabólicos en la producción de polihidroxicanoatos¹⁴⁰.

Esto se evidencia cuando se realiza una comparación de los datos de remoción en términos de DQOs entre del Control y el Tratamiento; El control presentó un porcentaje de remoción menor (21,6%) en comparación con tratamiento (34,6%) esta diferencia se debe a la adición de los nutrientes que inciden en la remoción de materia orgánica, aspecto que incrementó el aprovechamiento de las fuentes de carbono empleadas para producción de biomasa, las cuales se encuentran en la fracción soluble, demostrando la efectividad del medio y la capacidad de las bacterias productoras de PHAs para remover la materia orgánica presente en el lixiviado.

La diferencia en la producción de polihidroxicanoatos entre el control y el medio evaluado (Tabla13) se debe a que el tratamiento (T) fue inoculado con bacterias productoras de biopolímero que lo sintetizan en la fase exponencial la cual dura 5 días (120 horas). Posteriormente, las bacterias consumen este material de reserva¹⁴¹ para satisfacer sus demandas metabólicas de carbono con posterior eliminación de CO₂ por tanto los valores de PHA son menores que el lixiviado utilizado como control, dado que el medio denominado como T se optimizó para la remoción de materia orgánica con bacterias sintetizadoras de PHAs y no para la producción de PHAs en consecuencia, en el medio T se obtuvo una mayor remoción de materia orgánica.

Por otra parte, la concentración de materia orgánica que ingresa dentro de un sistema de fermentación es transformada en diferentes compuestos por la acción de los microorganismos, en general, los cambios en la concentración de materia orgánica se expresan en términos de DQO, de esta manera se puede decir que para el lixiviado es posible proponer un modelo matemático que exprese la transformación de la materia orgánica:

$$\text{Ecuación 6} \qquad \qquad \qquad \text{DQOt} = \text{DQOs} + \text{DQOi}$$

Donde DQOi = Hace referencia a la fracción insoluble

Donde DQOt= Hace referencia a la DQO total

Donde DQOs = Hace referencia a la fracción soluble

Despejando la DQOi y reemplazando los valores por los datos presentados en la tabla 13 se obtiene:

$$\text{DQOi} = \text{DQOt} - \text{DQOs}$$

¹⁴⁰ BARAJAS LÓPEZ 2002. Op. Cit. p.24

¹⁴¹ MADISON y HUISMAN 1999. Op. Cit. p.21

Para el caso en el cual se realizó los cálculos de DQO del relleno Sanitario Antanas, se puede inferir que la DQOi es igual:

$$DQOi = 4080,73 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} - 2775,75 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} = 1304,98 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$$

Es de resaltar que la DQOi se conforma por material refractario y por PHAs que se acumula intracelularmente; las bacterias que lo producen al igual que todas las bacterias tienen la capacidad de formar colonias o flóculos en torno a partículas orgánicas que cuando aumentan de peso se precipitan, en consecuencia, esta relación se puede modelar a través de :

$$\text{Ecuación 7.} \quad DQOi = DQOr + PHAs$$

Ahora bien, se ha establecido que la DQO en general se puede expresar en mg de Glucosa ¹⁴² ya que para oxidar 1 g de glucosa se requiere 1,067 g de Oxígeno Por tanto;

$$DQOi = 1304,98 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \times \left(\frac{1000 \text{ mg Glucosa}}{1067 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}} \right) = 1223,04 \text{ mg Glucosa}$$

Despejando la DQOr de la ecuación 7 y reemplazando sus valores tenemos:

$$DQOr = DQOi - PHA \text{ mgL}^{-1}$$

Considerando que tanto la glucosa como el PHAs son sustancias orgánicas podemos plantear la relación

$$DQOr = 1223,04 \text{ mg MO} - 60 \text{ mg MO} = 1163,04 \text{ mg MO}$$

Analizando la ecuación 7 ($DQOi = DQOr + PHA$), encontramos que: la DQOi está conformada por un cierto número de partes de DQOr y de partes de PHAs. Por lo tanto es posible establecer el porcentaje que corresponde a PHAs de un valor determinado de DQOi así:

$$\frac{PHA}{DQOi} \times 100$$

En consecuencia, para el ejemplo planteado reemplazando los términos tenemos:

$$\left(\frac{60 \text{ mg}}{1223,04 \text{ mg}} \right) \times 100 = 4,91\% \approx 5\%$$

Desde esta relación se puede inferir que teóricamente 5% de la DQOi del lixiviado evaluado en esa época corresponde a PHAs.

¹⁴² CASTILLO, J. CI51D/CI71I. Contaminación de recursos hidráulicos. 2008.

Igualmente, si se tiene en cuenta la ecuación 6 ($DQOt = DQOs + DQOi$) podremos determinar el porcentaje de PHA dentro de la $DQOt$. Transformamos la $DQOt$ en mg de Glucosa:

$$DQOt = 4080,73 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1} \left(\frac{1000 \text{ mg Glucosa}}{1067 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}} \right) = 3824,49 \text{ mg}$$

Determinamos la cantidad de PHA que estaría constituyendo la $DQOt$:

$$PHA \times \left(\frac{DQOt}{DQOi} \right)$$

Se reemplazan los términos:

$$60 \text{ mg} \times \left(\frac{3824,49 \text{ mg}}{1223,04 \text{ mg}} \right) = 187,622 \text{ mg}$$

Establecemos el porcentaje de PHA que constituye la $DQOt$:

$$\frac{PHA}{DQOt} \times 100$$

Por tanto:

$$\left(\frac{187,622 \text{ mg}}{3824,49 \text{ mg}} \right) \times 100 = 4,91\% \approx 5\%$$

Así se establece que bajo las condiciones experimentadas en este trabajo, teóricamente el 5% de la $DQOt$ corresponde a PHA.

Por otra parte, la evidencia cualitativa del buen desempeño en el tratamiento del lixiviado con bacterias productoras de PHAs se observa por la disminución del color oscuro en el lixiviado de los reactores (Ilustración 6), para Valencia 2007¹⁴³, existe una relación directa entre la remoción del color y la DQO, lo que también se corrobora este estudio (Ilustración 7). También es evidente la disminución de sedimentos, lo que justifica con mayor razón la importancia de alternar el tratamiento anaerobio con el subsecuente tratamiento aerobio, como recomienda Borzacconi, puesto que al ubicar en primer lugar la etapa anaerobia se puede lograr una importante reducción de la DQO sin los inconvenientes de los procesos aerobios tales como la generación de lodos y el gasto de energía¹⁴⁴.

¹⁴³ VALENCIA, *et al.* 2007. Op. Cit.

¹⁴⁴ BORZACCONI, L. *et al.* 2001. Op. cit.

Ilustración 6. Disminución en el color del lixiviado entre los controles (arriba) y tratamientos (abajo). (Fuente: esta investigación)

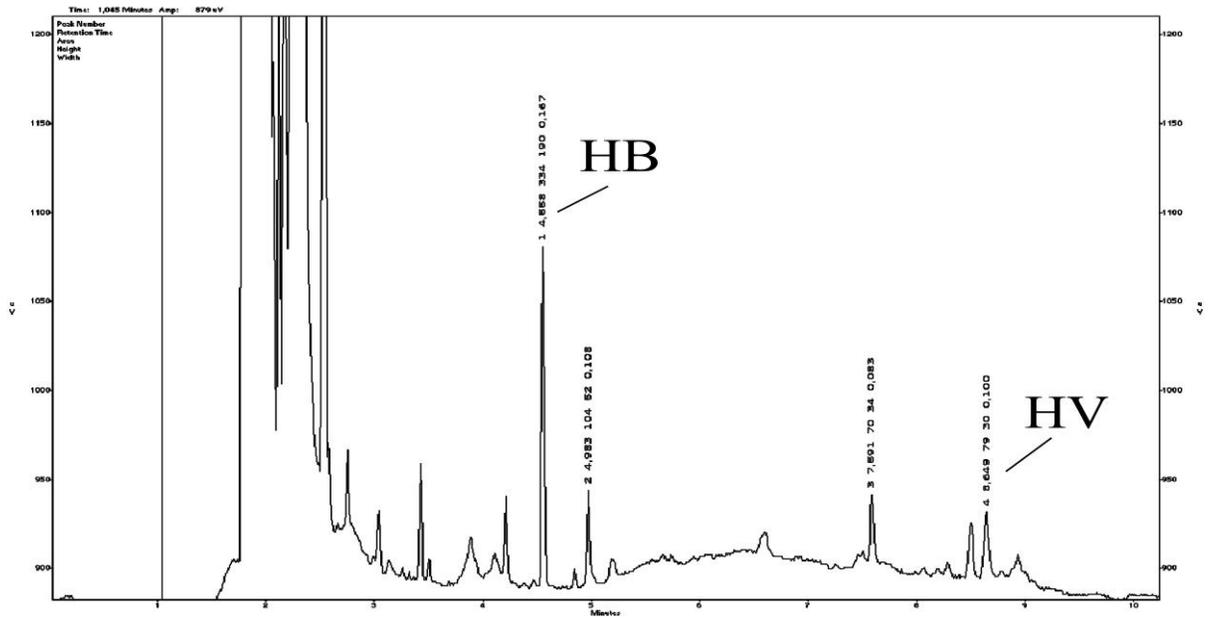


Ilustración 7. Reducción del sedimento entre los controles (foto izquierda línea superior, foto derecha, contenedor izquierdo) y los tratamientos (foto derecha línea inferior, foto derecha, contenedor derecho). (Fuente: esta investigación)

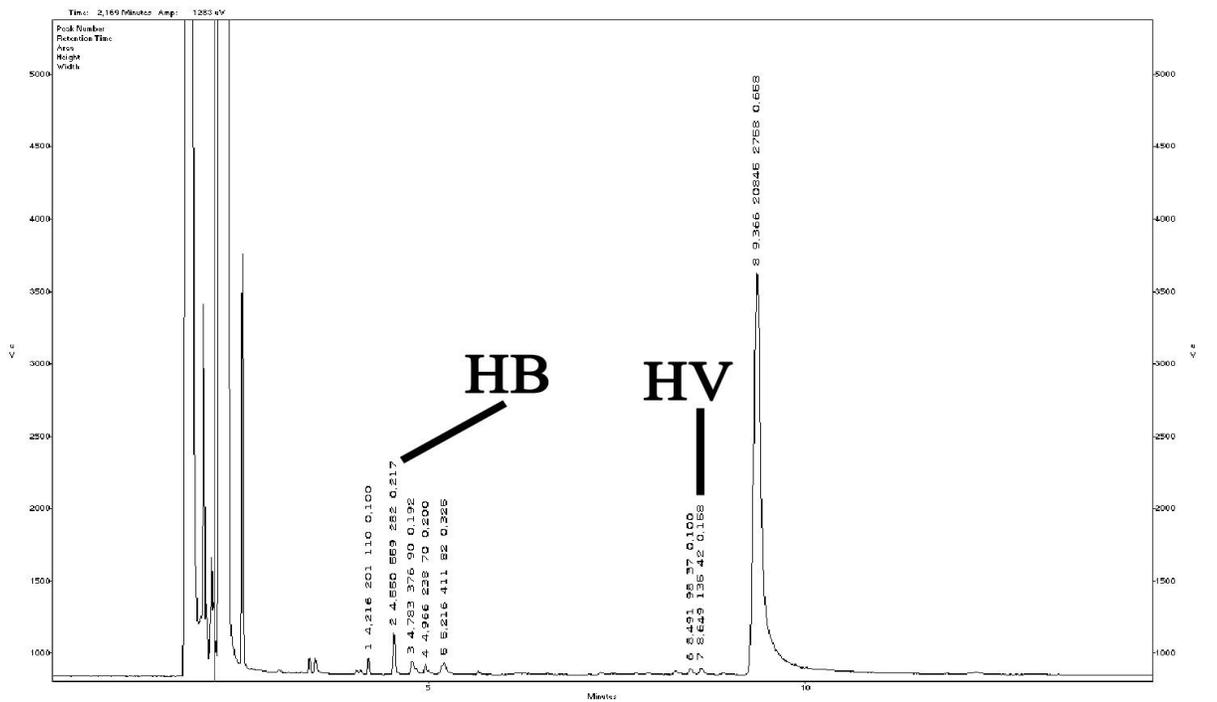


Por último, mediante la cromatografía de gases se determinó el tipo de polímero generado encontrando los picos correspondientes a las fracciones Butirato y Valerato que componen el copolímero P(3HB-co-HV). (Gráficas 6 y 7). Los tiempos de retención de las fracciones son 4,55 minutos para Hidroxibutirato (3HB) y 8,649 minutos para Hidroxivalerato (3HV) en el patrón y 4,55 y 8,624 minutos para las fracciones 3HB y 3HV respectivamente en los tratamientos

Gráfica 5. Cromatografía del patrón poli (3HB-co-HV). (Fuente: esta investigación)



Gráfica 6. Cromatografía de polímero extraído en el tratamiento. (Fuente: esta investigación)



La importancia de la presencia de este copolímero radica en sus características, éste, a diferencia de polímeros como el compuesto únicamente por monómeros de Hidroxibutirato, es más flexible y elástico, lo que disminuye su carácter quebradizo, incrementando su importancia industrial¹⁴⁵.

Ahora bien, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible utilizar bacterias productoras de PHAs para remover materia orgánica y producir este biopolímero a partir del lixiviado del Relleno Sanitario Antanas generando una alternativa no sólo ecológica por la remoción de agentes contaminantes de suelos y aguas, sino también, una nueva fuente de generación de recursos biodegradables para usos industriales.

¹⁴⁵ HIDALGO y ZAMBRANO 2005. Op. Cit. p.26.

4. CONCLUSIONES

Se diseñó un medio de cultivo basal constituido por Urea, fosfato ácido de potasio y oligonutrientes, en el que se demostró que la modificación de estos factores nutricionales puede incrementar la eficiencia en la remoción de materia orgánica en lixiviados con características similares a las de este trabajo.

A través del manejo de los factores nutricionales fue posible remover hasta un 35,05% de la carga orgánica, en comparación con el lixiviado expuesto a las condiciones nutricionales típicas del Relleno Sanitario Antanas. Con esto se demuestra que esta es una alternativa técnicamente viable y adecuada para la remoción de materia orgánica en lixiviados que presenten las condiciones en las que se desarrolló este trabajo.

En la comunidad de bacterias del lixiviado del Relleno Sanitario Antanas, existen microorganismos con capacidad metabólica para sintetizar PHAs entre ellos se destacan los morfotipos PAP4R3M2 y PEP1R2M2 los cuales produjeron en medio no optimizado para la síntesis de polímero, hasta $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de polihidroxicanoatos por litro de medio de cultivo. Igualmente, con la inoculación de estos organismos se alcanzó una remoción de 34,61% en la fracción soluble de materia orgánica y de 21,98% del total.

Se estableció un modelo matemático en el cual se relaciona la DQO del lixiviado y la producción de PHA por parte de los microorganismos; en este se determinó que según las condiciones de este experimento, de la DQOT, el 5% corresponde a PHA.

Al igual que para Valencia y su equipo de trabajo en el 2007, existió una relación directa entre la reducción de color y DQO, igualmente se redujo la sedimentación y consecuentemente la aparición de lodos.

Se presentó producción del copolímero P(3HB-co-HV), lo que implica la presencia de los sustratos adecuados para su obtención.

Para mejorar la remoción de materia orgánica es necesario adicionar urea y fosfato, acompañados de la mezcla de oligonutrientes puesto que estos por sí solos tienen un efecto negativo.

5. RECOMENDACIONES

Sería recomendable evaluar el efecto del pH, temperatura y características de oxigenación sobre la remoción de la materia orgánica en el lixiviado previo y posterior a la inoculación de las bacterias productoras de PHAs, igualmente analizar el efecto de estas variables sobre estos organismos.

Las altas cantidades de materia orgánica presentes en el lixiviado sin tratamiento indican que este es un buen sustrato para el crecimiento de bacterias productoras de PHAs y su consecuente producción de polímero. Por tanto serían de gran interés las investigaciones que se realicen para tal fin.

La evaluación de un sistema aerobio que refuerce e incremente la reducción de materia orgánica resultante del tratamiento anaerobio planteado en este trabajo sería de vital importancia a la hora de incrementar la eficacia del tratamiento secundario implementado para el tratamiento de estas aguas residuales.

Se recomienda hacer una cinética de crecimiento y síntesis de polímero con el fin de establecer el momento exacto para la cosecha de PHA.

Igualmente, es aconsejable evaluar el efecto del tratamiento anaerobio antes del aerobio, puesto que este ayuda a reducir la formación de sedimento y la cantidad de materia orgánica presente en el lixiviado.

BIBLIOGRAFÍA

AKARSUBASI, A, y otros. «Effect of wastewater composition on archaeal population diversity.» *Water Research* 39 (2005): 1576.

ALCUBIERRE, D. *Striatum Web. Un blog verde. Rellenos sanitarios.* . <http://www.dforceblog.com/2009/05/23/rellenos-sanitarios> (último acceso: 2009).

ALDOR, I, S KIM, K JONES PRATHER, y J KEASLING. «Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 68 (2002): 3848.

ALUKO, O, M SRIDHAR, y P OLUWANDE. «Characterization of leachates from a municipal solid waste landfill site in Ibadan, Nigeria.» *Journal of environmental Health Research* Vol.2 (2003): 3.

ÁLVAREZ CONTRERAS, A. y SUAREZ GELVEZ, J. 2006. Tr, A, y J SUAREZ GELVEZ. «Tratamiento Biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario “El Guayabal” de la ciudad San José de Cúcuta.» *Tratamiento Biológico del lixiviado generado en el relleno sanitario “El Guayabal” de la ciudad San José de Cúcuta. Ingeniería y desarrollo*, nº 20 (2006): 95 – 105.

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater (Métodos estandarizados para el tratamiento del agua y aguas residuales)*. Washington, D.C.: APHA, AWWA, WPCF, 1999.

American Water Works Association Research Foundation, Lyonnaise de Eux, Water Research Commission of South Africa. *Tratamiento del agua por procesos de membrana, principios, procesos y aplicaciones*. Editorial McGraw Hill., 1998. p. 866.

ATLAS, R, y R BARTHA. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: Pearson educación S.A., 2002. p. 677.

BAHAMONDE., M. I. *Estudio funcional y molecular del canal Maxi-Ci activado por antiestrógenos*. Departamento de ciencias experimentales y de la salud. Barcelona: Universidad Pompeu Fabra, 2003 .

BARAJAS LÓPEZ, María Guadalupe. *Eliminación biológica de nutrientes en un reactor biológico secuencial*. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 2002.

BASTIDAS, Adriana, Norma BENAVIDES, y Lidia BRAVO. *Estandarización Y Validación Del Método Cromatográfico Para La Determinación Y Seguimiento De Pesticidas Organoclorados En El Proceso De Tratamiento De Lixiviados Del Relleno Sanitario Antanas De La Ciudad De San Juan de Pasto*. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Química: Universidad de Nariño, 2005.

BORZACCONI, L, I LÓPEZ, E ARCIA, L CARDELINO, A CASTAGNA, y M VIÑAS. *Comparación de tratamientos aerobio y anaerobios aplicados a lixiviado de relleno sanitario*. Facultad de Ingeniería. Uruguay: Universidad de la República., 2001.

BUGG, T. *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. 2 ed. United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd., 2004. p. 292.

CARRUCCI, A, M MAJONE, R RAMADORI, y S ROSSETTI. «Dynamics of phosphorus and organic substrates in anaerobic and aerobic phases of a sequencing batch reactor.» *Water Science Technology* 30 (1994): 237.

CASTILLO, J. *CI51D/CI71I. Contaminación de recursos hidráulicos*. Curso, Universidad de Chile: Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas., 2008.

CHEN, W, T DON, y H YEN. «Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3-hydroxybutyrate -co -3-hydroxyvalerate)by *Haloferax mediterranei*.» *Process Biochemistry* Vol.41 (2006): 2289.

CHUA, A, H TAKABATAKE, H SATOH, y T MINO. «Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent.» *Water Res.* Vol.37 (2003): 3602.

CHUNYANG, Zhang, Liu XIAOLI, y Dong XIUZHU. «*Syntrophomonas erecta* sp. nov., a novel anaerobe that syntrophically degrades short-chain fatty acids.» *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 (2005): 799.

COMANDO SULUDA, A I. *Optimización del compostaje de residuos sólidos urbanos en proceso de serie anaerobio-aerobio*. Madrid: Escuela técnica superior de ingenieros de caminos, canales y puertos. Universidad Politécnica de Madrid, 2006.

COTORAS, Davor. «Los derrames incontrolados: El problema de la gestión de residuos sólidos no termina con su almacenamiento en vertederos controlados.» 1995. http://www.ecosur.net/visitantes/los_derrames_incontrolados.htm (último acceso: 2005).

DANIEL, Wayne. *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. México: Editorial Limusa Wiley, 2005. p. 755.

DÍAZ – BÁEZ, M, S ESPITA, y F MOLINA. *Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2002.

DIPUTACIÓN GENERAL DE ARAGÓN. «Depuración de Aguas residuales.» <http://portal.aragon.es/portal/page/portal/IAA/DEPURACION/RESIDUALES> (último acceso: 2008).

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2000. Por el que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. DOCE L 327 (22/12/2000)

EHRIG, H. «"Water and elements balances of landfills", Earth Sciences, The Landfill.» *Springer-Verlag Press, USA.*, 1989: En: MÉNDEZ NOVELO, R, E CACHÓN SANDOVAL, M SAURI RIANCHO, y E CASTILLO BORGES. Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario. Ingeniería. Vol. 6 (2002): 7.

EHRIG, H. «Cantidad y contenidos de lixiviados de rellenos de desechos domésticos.» *CEPIS/OPS.*, 1999.

ENCARNACIÓN, Sergio, Michael DUNN, Kaethe WILLMS, y Jaime MORA. «Fermentative and Aerobic Metabolism in Rhizobium etli.» *Journal of Bacteriology*. Vol. 177 (1995): 3058.

FARRAH, Samuel, y Gabriel BITTON. «Bacterial Survival and Association with Sludge Floccs during Aerobic and Anaerobic Digestion of Wastewater Sludge under Laboratory Conditions.» *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 45 (1983): 174.

FERNÁNDEZ, P, F ORTIZ, y J ESPAÑA. «Caracterización de poli-(Hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de Bacillus mycoides FLB2.» *Revista Centro de Estudios en Salud* Vol. 1, nº N°6 (2005): 5.

FLORES ORDEÑANA, P, O GONZÁLEZ BARCELÓ, y S GONZÁLEZ MARTÍNEZ. *Aspectos bioquímicos de la remoción biológica de fósforo y sus aplicaciones*. Instituto de Ingeniería.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

FUKUI, T, y Y DOI. «Cloning and Analysis of the Poly (3-Hydroxybutirate -co-3-Hydroxyhexanoate).» *Journal of Bacteriology* Vol. 179 (1997): 4821.

GOOGLE. *Google Earth*. <http://earth.google.es/> (último acceso: 2008).

HANADA, S, H SATOH, y T MINO. «Measurement of microorganisms with PHA production capability in activated sludge and its implication in activated sludge model no. 3.» *Water Science & Technology* 45 (2002): 107.

HANNA INSTRUMENTS CHILE. «Etapas del tratamiento de Aguas servidas.» *HANNA Instruments*. <http://www.hannachile.com/articulos/24/etapas-tratamiento-aguas-servidas.htm>. (último acceso: 2008).

HARMSEN, Hermie, Antón AKKERMANS, y Alfons STAMS. «Population Dynamics of Propionate-Oxidizing Bacteria under Methanogenic and Sulfidogenic Conditions in Anaerobic Granular Sludge.» *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 62 (1996): 2163.

HIDALGO, W, y J ZAMBRANO. *Aislamiento de bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos PHAs presentes en suelos de la región andina del departamento de Nariño*. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Química: Universidad de Nariño, 2005.

HU, W.F., S.N. SIN, H. Chua, y P.H YU. «Synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from excess activated sludge under various oxidation-reduction potentials (ORP) by using acetate and propionate as carbon sources.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121 (2005): 289.

Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. «Protocolo. Demanda Química de Oxígeno, método de reflujó abierto.» *República de Colombia* (Ministerio del medio ambiente), 2001.

JAN, S, C ROBLÓT, J COURTOIS, B COURTOIS, J BARBOTIN, y J SEGUIN. «¹HMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass.» *Enzyme Microb. Technology* Vol. 18 (1996): 195.

JARAMILLO, J. *Guía para el diseño y construcción de los rellenos sanitarios manuales*. Antioquia: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, 2002.

JEON, Che, Dae SUNG LEE, Min WOO LEE, y Jong MOON PARK. «Enhanced Biological Phosphorus Removal in an Anaerobic–Aerobic Sequencing Batch Reactor: Effect of pH.» *Water Environment Research* 73 (2001): 301.

KREBS, Ch. *Ecological methodology*. Editorial Harper & Row.USA, 1989. p. 620.

KUEHL, R. *Diseño de experimentos*. Editorial Thomson Learning, 2001. p. 666.

KYLEFORS, Katarina. *Predictions of Leaching from Municipal Solid Waste (MSW) and Measures to Improve Leachate Management at Landfills*. Sweden.: Luleå University of Technology, 2002.

LAGERKVIST, A, P NILSSON, J-E MEIJER, H KARLSSON, y T RIHM. «Samordnad deponigas - Forskning, Utveckling, Demonstration. Slutrapport.» *RVF rapport 97:7* (1997): En: KYLEFORS, Katarina. Predictions of Leaching from

Municipal Solid Waste (MSW) and Measures to Improve Leachate Management at Landfills. Sweden.: Luleå University of Technology, 2002.

LAITINEN, Sirpa, Aino NEVALAINEN, Marjut KOTIMAA, Jyrki LIESIVUORI, y Perti MARTIKAINEN. «Relationship between bacterial counts and endotoxin concentration in the air of Wastewater treatment plants.» *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 58 (1992): 3774.

LAW Kin-Ho, LEUNG Yun-Chung, LAWFORD Hugh, CHUA Hong, LO Wai-Hung, HOIFU YU Peter. «Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Isolated from Municipal Activated Sludge.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 91 (2001): 515.

LEE, Sang Yup, y Jong-il CHOI. «Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment.» *Waste Management* 19 (1999): 133.

LEFEBVRE, G, M ROCHER, y G BRAUNEGG. «Effects of Low Dissolved-Oxygen Concentrations on Poly-(3-Hydroxybutyrate –co- 3-Hydroxyvalerate) Production by *Alcaligenes eutrophus*. Applied and Environmental Microbiology.» *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 63 (1997): 827.

LEMOS, P, L SERAFIM, M SANTOS, M REIS, y H SANTOS. «Metabolic Pathway for Propionate Utilization by Phosphorus-Accumulating Organisms in Activated Sludge: ¹³C Labeling and In Vivo Nuclear Magnetic Resonance.» *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 69 (2003): 241.

LEMOS, P, L SERAFIM, y M REIS. «Polyhydroxyalkanoates production by activated sludge in a SBR using acetate and propionate as carbon sources.» *Water Science Technology* 50, nº 10 (2004): 189.

LIN, D, Y ZHANG, C WEI, y J SHEN. «Biodegradable plastic production by activated sludge with different carbon sources.» *Huan Jing Ke Xue* Vol. 24 (2003): 97.

LIU, W.T., A.T. NIELSEN, J.H. WU, C.S. TSAI, Y MATSUO, y S MOLIN. «In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process.» *Environ Microbiol* 3 (2001): 110.

MA, CK, H CHUA, PH YU, y K HONG. «Optimal production of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass.» *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86 (2000): 981.

MADIGAN, MARTINKO, y PARKER. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8. Prentice Hall, 2000. p. 1064. p. 1067.

MADISON, L, y G HUISMAN. «Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic.» *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 63 (1999): 21.

MAH, Terry, William OLDHAM, William RAMEY, y Tai Man LOUIE. «Use of metabolic inhibitors and gas chromatography/mass spectrometry to study poly- β -hydroxyalkanoates metabolism involving cryptic nutrients in enhanced biological phosphorus removal systems.» *Water Research* 34 (2000): 1507.

MÉNDEZ NOVELO, R, E CACHÓN SANDOVAL, M SAURI RIANCHO, y E CASTILLO BORGES. «Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario.» *Ingeniería* Vol. 6 (2002): 7.

Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. *Merck4Biosciences*. 2011. <http://www.merck-chemicals.com/spain/life-science-research> (último acceso: enero de 2011).

Miliarium Aureum, S.L. *variación de los lixiviados con la edad del vertido*. <http://www.miliarium.com/Proyectos/Vertederos/RSU/Lixivybiogas/Lixiviado.htm> (último acceso: 2009).

MILLER, J, y J.N MILLER. *Estadística para química analítica*. Segunda Edición. Editorial Addison -Wesley Iberoamericana, 1993. p. 296.

MINISTERIO DE AMBIENTE VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Decretos Número 1594 de 1984, 3100 de 2003 y 838 de 2005. República de Colombia.

MINO, T. «Microbial Selection of Polyphosphate-Accumulating Bacteria in Activated Sludge Wastewater Treatment Processes for Enhanced Biological Phosphate Removal.» *Biochemistry (Moscow)* Vol. 65, nº 3 (2000): 341.

ODRIOZOLA, V. «Rellenos sanitarios: enterrar basura, sepultar el futuro.» *Greenpeace en Acción*, nº 40 (2004).

OMIL, F, A VISSER, L W HULSHOFF POL, y G LETTINGA. «Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido en sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares.» *AFINIDAD. REVISTA DE QUÍMICA TEÓRICA y APLICADA* Tomo LIV, nº 471 (1997).

OROPEZA B, Victor Manuel. *Parque Reserva, Península del Carrizal. Tesis Licenciatura Arquitectura*. Escuela de Artes y Humanidades: Universidad de las Américas Puebla, 2004.

PETERSON, W, y F STRONG. *General biochemistry*. New York: Prentice - Hall, INC., 1953. p. 469.

PÖTTER, M, M MADKOUR, F MAYER, y A STEINBÜCHEL. «Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16.» *Microbiology* Vol. 148 (2002): 2413.

PUNRATTANASIN, Warangkana. *The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics*. . Virginia Polytechnic Institute., 2001.

RAMÍREZ, M, C OCAMPO, y D VANEGAS. «Producción de biopolímeros en reactores CSTR y airlift, empleando desechos industriales.» *XXII Congreso Interamericano de Ingeniería Química. V Congreso Argentino de Ingeniería Química*, 2006.

REYNOLDS, Kelly. «Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica, identificación del problema.» *Agua Latinoamérica* Vol. 2, nº 5 (Septiembre-octubre 2002).

ROZSA, Chavati, Danay DUPEYRÓN, Norma GALEGO, Viviana CYRAS, y Analía VÁZQUEZ. «Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxialcanoatos.» *Revista Iberoamericana de Polímeros* Vol.5 (2004): 55.

RUIZ, I, J ÁLVAREZ, y M SOTO. *El potencial de la digestión anaerobia en el tratamiento de aguas residuales urbanas y efluentes de baja carga orgánica*. Facultad de ciencias: Universidade da Coruña, 2001.

SATOH, H, T MINO, y T MATSUO. «PHA production by activated sludge.» *Int J Biol Macromol* 25 (1999): 105.

SATOH, H, Y IWAMOTO, T MINO, y T MATSUO. «Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic.» *Water Science and Technology* Vol. 38 (1998): 103.

SHIN, Onda, Hiraishi AKIRA, Matsuo YOSHITAKA, y Takii SUSUMU. «Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratoryscale anaerobic/aerobic activated sludge system.» *J. Gen. Appl. Microbiol* Vol. 48 (2002): 43.

SPIEKERMAN, P, B REHM, R KLASCHEUER, D BAUMEISTER, y A STEINBÜCHEL. «A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds.» *Arc. Microbiology* Vol. 171 (1999): 73.

STEINBÜCHEL, A. «Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolimers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosíntesis Pathways as a Successful Example.» *Macromol. Biosci.* Vol. 1 (2001): 1.

STEINBÜCHEL, A, y H VALENTIN. «Diversity of bacterial PHA acids.» *FEMS Microbial Letters* Vol. 128 (1995): 219.

TAKABATAKE, H, H SATOH, T MINO, y T MATSUO. «PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater.» *Water Science Technology* Vol. 45 (2002): 119.

THOMAS, L, J WIMPENNY, y G BARKER. «Spatial interaction between surface bacterial colonies in a model system: a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium.» *Microbiology* Vol. 143 (1997): 2575.

VALENCIA, V, J AGUDELO, I RESTREPO-TARQUINO, y A CAJIGAS. «Evaluación del tratamiento físico-químico de lixiviados parcialmente estabilizados. Estudio de caso: Vertedero de Navarra.» *Seminario gestión integral de residuos sólidos, LATINOSAN*, 2007.

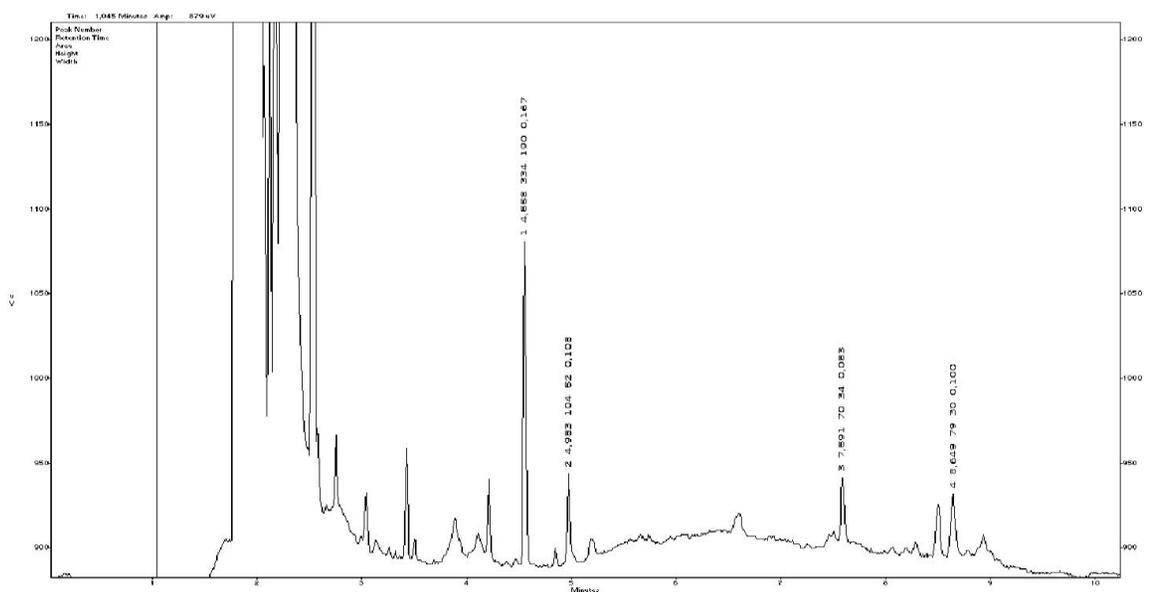
WÄLTERMANN, M, y A STEINBÜCHEL. «Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent insights into structure, formation and relationship to Eukaryotic Lipid Depots.» *Journal of Bacteriology* Vol. 187 (2005): 3607.

WU, WEI-MIN, Robert F HICKEY, y Gregory ZEIKUS. «Characterization of Metabolic Performance of Methanogenic Granules Treating Brewery Wastewater: Role of Sulfate-Reducing Bacteria.» *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* Vol.57 (1991): 3438.

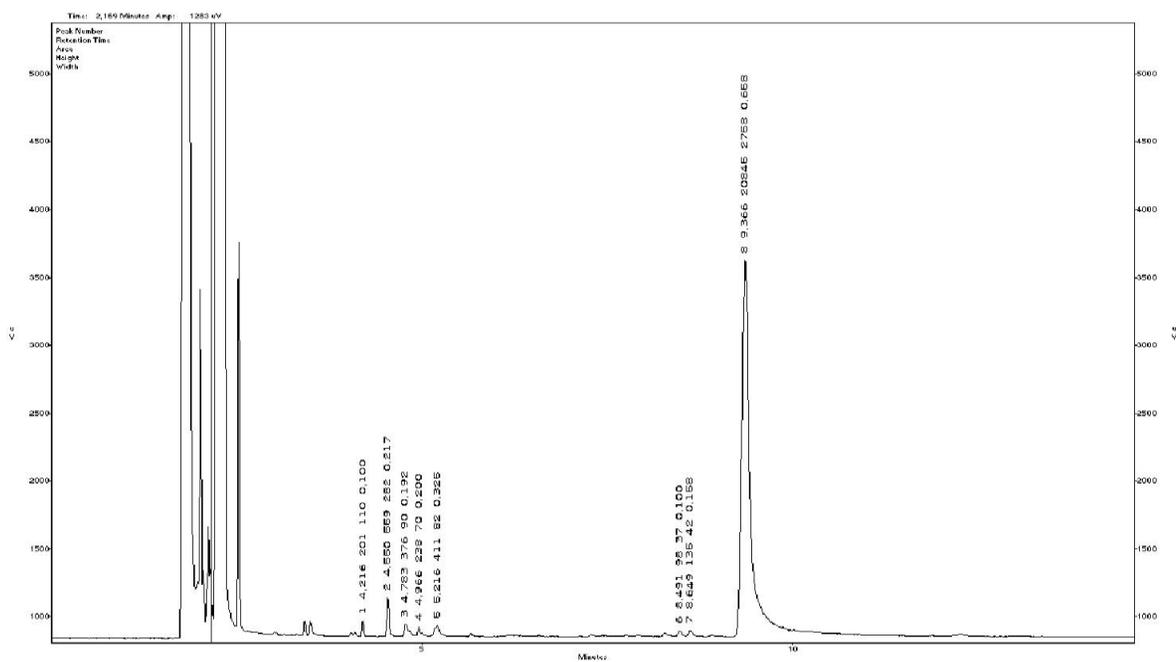
ANEXOS

Anexo A. Cromatogramas obtenidos en este trabajo

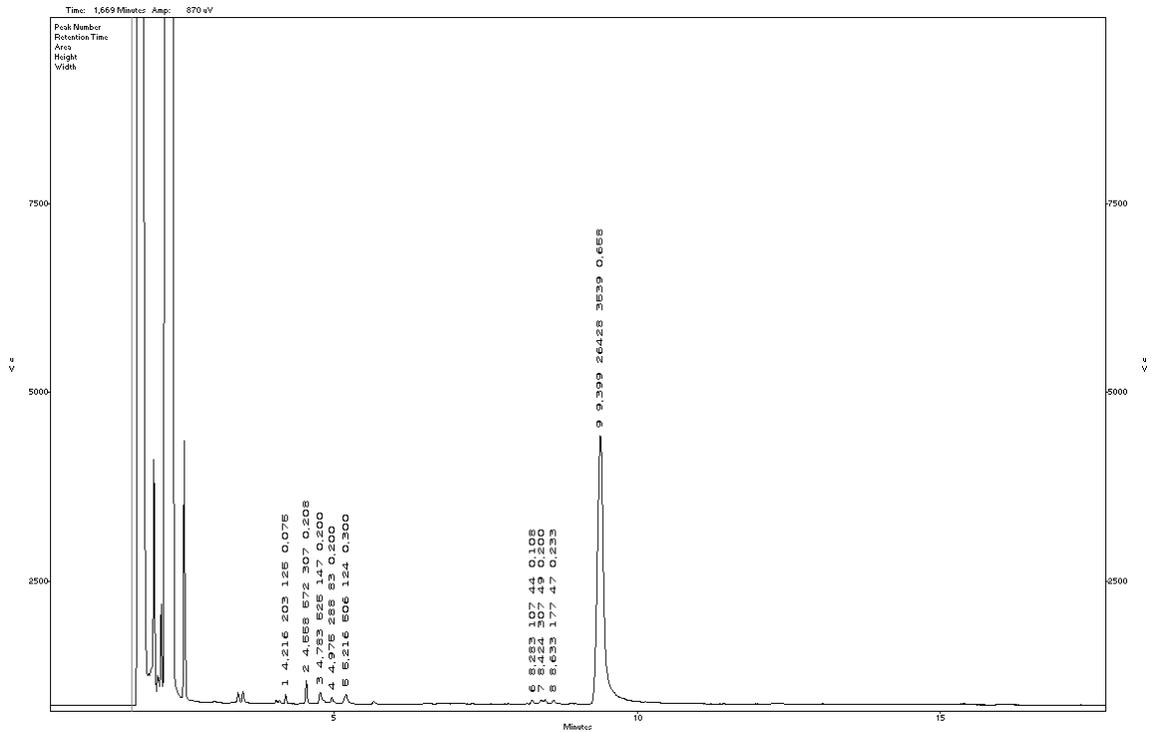
Patrón copolímero poli (3HB-co-HV). (Fuente: esta investigación)



Cromatograma correspondiente el medio. (Fuente: esta investigación)



Cromatograma correspondiente al Blanco. (Fuente: esta investigación)



Cromatograma correspondiente al Control. (Fuente: esta investigación)

