



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Tratamiento y valorización de efluentes de biodiésel para la producción de bioplásticos mediante fermentación electroestimulada”.

TESIS

Que como parte de los requisitos para

obtener el Grado de:

Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental.

Presenta

IBT. María de Jesús Trejo Espinosa

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Querétaro, Querétaro a junio del 2026

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Tratamiento y valorización de efluentes de biodiésel para la producción de bioplásticos mediante fermentación electroestimulada”.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

IBT. María de Jesús Trejo Espinosa

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Dr. Aldo Amaro Reyes

Presidente

Dr. Juan Campos Guillén

Secretario

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Vocal

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Suplente

Dr. Juan Carlos Quintero Díaz

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

María de Jesús Trejo Espinosa

DEDICATORIAS:

A mí mamá preciosa, por apoyarme en todo momento, por ser mi motor, mi motivo de vivir y nunca dejarme sola, mis victorias y logros son todos tuyos. A mi papá, por desvelarse conmigo, moverme y no dejarme sola, gracias por tu apoyo incondicional. A mi Fercillo, por hacerme reír mucho y ser mi quita estrés, gracias por ser el niño más bonito del mundo. A mi Danicita preciosa, por ser mi niña bonita, por hacerme reír, por quererme tanto y motivarme a ser mejor persona. A Me, por apoyarme y estar conmigo, por motivarme y enseñarme a ser paciente. A mí tía Lore, por estar siempre al pendiente de mí, por ser un apoyo fundamental y ser parte de mi familia. A mí tía Juanis, por estar al pendiente de mí y siempre darme ánimos de seguir. A Daniel y a mí tío Gil, por sus consejos fundamentales. A mí Filomena, mi Vali y mi Bicha, por desvelarse conmigo, darme mucho cariño y motivarme a levantarme temprano. A mi amistad más sincera, Enrique Limón, gracias por enseñarme todo lo que sé en el laboratorio, por ser mi guía, por no dejarme sola y ser como un hermano para mí, la vida me dio la oportunidad de tener una amistad tan bonita como tú. A Keni, Eli, Erick y Nao, por ser mis amigos y escucharme siempre, por no dejarme caer y acompañarme en este camino. A mi Abi Toni y Papá Pillo por cuidarme y guiarme desde el cielo, nunca me han dejado sola y lo noto en las pequeñas señales. Finalmente, a Diosito amigo mío, por ser mi ejemplo a seguir y darme toda la fortaleza que necesitaba para afrontar este reto, por abrirme puertas y llenar mi vida de mucha luz. Gracias personas en mi vida, por apoyarme mucho en este camino, soy un ser muy bendecido y lleno de luz porque los tengo en mi vida, gracias infinitas.

AGRADECIMIENTOS:

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada durante dos años. A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por el espacio brindado para el desarrollo del proyecto. A la doctora Flor González Cataño del Laboratorio de uso común de alimentos, por brindarme agua destilada para poder trabajar en la experimentación. Al doctor Víctor Pérez Moreno del Laboratorio de tratamiento de aguas por brindarme un espacio para trabajar con el objetivo 4. Al doctor Juan Carlos Quintero de la Universidad de Antioquía por aceptar ser mi sinodal, por su apoyo en la parte estadística y su paciencia. Al doctor Carlos Peña del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindar la cepa de *Azotobacter vinelandii* OP, por apoyarme con las correcciones y su paciencia. Al doctor Juan Campos y el doctor Juan Ramiro por aceptar ser mis sinodales y por ser mis maestros de seminario. Al doctor Miguel Ramos por ser mi tutor, escucharme, guiarme y apoyarme. A Nancy, por mantener limpio el laboratorio, apoyarme, escucharme y ser buena persona conmigo. A Erika, por apoyarme en la parte administrativa, por su paciencia y por ser tan linda con todo mundo. Finalmente, al doctor Aldo Amaro por aceptar ser mi asesor, por su guía constante, su paciencia infinita y brindarme un espacio de trabajo. Gracias infinitas.

Índice general

Índice de Cuadros	8
Índice de Figuras	9
Resumen	10
Abstract	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Contaminación de agua	13
2.2 Contaminación por aguas industriales	14
2.2.1 Residuos de biodiesel	15
2.2.2 Estrategias de tratamiento del glicerol	16
2.2.3 Obtención de glicerol durante la producción de biodiesel	17
2.3 Contaminación por plásticos	18
2.3.1 Producción de ácido polihidroxibutírico (P3HB)	19
2.3.2 Ruta de biosíntesis de P3HB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	20
2.4 Fermentación	23
2.5 Electrofermentación	24
2.6 Diferencia entre fermentación y electrofermentación	30
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. METODOLOGÍA	34
5.1 Sitio de estudio	34
5.2 Material biológico y preparación del inóculo	34
5.3 Sistema de electrofermentación	35
5.4 Cuantificación del rendimiento del polihidroxibutirato producido por <i>Azotobacter vinelandii</i> OP bajo el efecto de fermentación electroestimulada	36

5.5 Producción de P3HB en diferentes fases de crecimiento	38
5.6 Extracción y cuantificación de P3HB (ácido polihidroxitúrico)	39
5.7 Producción de polihidroxitúricato a partir de glicerol	40
5.8 Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO)	40
5.9 Determinación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV)	41
5.10 Determinación del pH	41
5.11 Diseño experimental	41
5.12 Análisis estadístico	42
5.13 Consideraciones éticas	42
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
7. CONCLUSIONES	65
8. REFERENCIAS	67
9. ANEXOS	77

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Electrofermentación y su uso con distintos microorganismos	29
Cuadro 2 Fermentación convencional vs. electrofermentación	31
Cuadro 3 Composición del medio PYS	35
Cuadro 4 Variables de estudio del sistema de electrofermentación	43
Cuadro 5 Rendimiento en la producción de P3HB en un sistema de electrofermentación	44
Cuadro 6 Aplicación del sistema de fermentación electroestimulada en diferentes puntos de la fase exponencial	51
Cuadro 7 P3HB (g/L) obtenido en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con diferentes fuentes de carbono	57
Cuadro 8 Valores de pH obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono	60
Cuadro 9 Valores de DQO (mg O ₂ /L) obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono	62
Cuadro 10 Valores de SSV (mg/L) obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono	64
Cuadro 11 Análisis de varianza realizado para evaluar el efecto del área superficial de los electrodos, la concentración de rojo neutro y el voltaje aplicado, así como sus posibles interacciones, sobre la producción de P3HB.	77
Cuadro 12 Prueba Tukey para el área superficial de los electrodos	77
Cuadro 13 Prueba Tukey para la concentración de rojo neutro (RN)	77

Índice de Figuras

Figura 1 Síntesis de biodiésel (adaptado de Mitrea <i>et al.</i> , 2017).	18
Figura 2 Ruta metabólica de la biosíntesis de PHB (Huamán et al., 2021).	22
Figura 3 Ruta metabólica de Entner-Doudoroff (adaptado de Conway, 1992).	23
Figura 4 Ruta metabólica de la síntesis de glicerol a PHB (Yoneyama et al., 2015).	24
Figura 5 Mecanismos de transferencia electrónica bidireccional entre bacterias y electrodos. Mecanismos de transferencia electrónica entre bacterias electroactivas y electrodos. (Zheng et al., 2020).	27
Figura 6 Mecanismo de electrofermentación (Moscoviz <i>et al.</i> , 2016).	29
Figura 7 Metodología resumida del crecimiento de <i>A. vinelandii</i> OP	36
Figura 8 Diseño de los reactores para electrofermentación de <i>Azotobacter vinelandii</i> OP	37
Figura 9 Metodología resumida para la obtención de P3HB mediante <i>A. vinelandii</i> OP. El proceso incluye la recuperación de biomasa celular, extracción del polímero mediante cloroformo, separación de residuos celulares y recuperación del P3HB seco.	39
Figura 10 Metodología resumida para el crecimiento de <i>A. vinelandii</i> OP usando diferentes fuentes de carbono	40
Figura 11 Efecto de la concentración de rojo neutro (0, 87.5 y 175 μ M) y el voltaje (0, 0.75 y 1.5 V) sobre la producción de P3HB por <i>Azotobacter vinelandii</i> OP a las 48 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada	46
Figura 11 Ecuación de regresión lineal entre la relación del área superficial de los electrodos (cm^2), concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación.	48

Figura 12 Diagrama Pareto que demuestra la relación del área superficial de los electrodos (cm ²), concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación.	49
Figura 13 Gráfica de superficie de la relación entre la concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación para la obtención del P3HB (g/L).	50
Figura 15 Producción de P3HB (g/L) en diferentes etapas de la fase exponencial de <i>A. vinelandii</i> OP.	52
Figura 16 Crecimiento de <i>Azotobacter vinelandii</i> OP en medio PYS durante 72 horas, 28 ° C, 220 rpm, donde se puede observar el crecimiento en fermentación tradicional (FT) y en el sistema de electrofermentación (EF), donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75 V, mediador rojo neutro de 87.5 µM y 195.96 cm ² de área superficial de los electrodos. Los datos representan la media ± la desviación estándar (n=3).	54
Figura 17 Efecto del tiempo sobre la producción de P3HB por <i>Azotobacter vinelandii</i> OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm ² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional con sacarosa como fuente de carbono, 220 rpm, 28 °C y utilizando medio PYS. Los datos representan la media ± la desviación estándar (n=3).	55
Figura 18 Biopolímero de P3HB obtenido durante la fermentación electroestimulada.	56
Figura 19 Biopolímero de P3HB resultante de la fermentación tradicional.	57
Figura 20 Producción de P3HB por <i>Azotobacter vinelandii</i> OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada	59

(electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

Figura 21 Valores de pH sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada (electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3). 61

Figura 22 Valores de DQO (mg O₂/L) sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada (electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3). 63

Figura 23 Valores de SSV (mg/L) de diferentes tratamientos sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada y fermentación tradicional. 65

Resumen

El glicerol residual generado como subproducto del proceso de producción de biodiésel representa un residuo con potencial de valorización biotecnológica mediante procesos fermentativos. Sin embargo, la producción de P3HB (polihidroxibutirato) puede verse limitada por el balance redox intracelular, el cual puede ser modulado mediante sistemas de transferencia externa de electrones. En este estudio se evaluó el efecto de la electrofermentación sobre la producción de poli(3-hidroxibutirato) (P3HB) por *Azotobacter vinelandii* OP. Inicialmente, se evaluaron diferentes condiciones de operación del sistema electrofermentativo, considerando el voltaje aplicado (0, 0.75 y 1.5 V), la concentración del mediador redox rojo neutro (0, 87.5 y 175 μM) y el área superficial de los electrodos de acero inoxidable (65.32 y 195.96 cm^2). La condición de 0.75 V, 87.5 μM de rojo neutro y 195.96 cm^2 de área de electrodo mostró la mayor producción de P3HB que fue de 2.24 g L^{-1} en medio con sacarosa representando un incremento en la producción de P3HB en medio con sacarosa (20 g L^{-1}) hasta 2.24 g L^{-1} , representando un aumento de 2.6 veces respecto a la fermentación tradicional (1.32 g L^{-1}). Además, bajo estas condiciones se observó una disminución del tiempo de duplicación celular de 6.83 h con electrofermentación en comparación con 7.29 h con fermentación tradicional. Posteriormente, la mejor condición fue evaluada utilizando glicerol residual complementado con sacarosa como fuente de carbono, obteniéndose una producción de P3HB 2.93 veces mayor mediante electrofermentación en comparación con la fermentación tradicional. Los análisis de demanda química de oxígeno (DQO), pH y sólidos suspendidos volátiles (SSV) indicaron una reducción parcial de la materia orgánica y una adecuada adaptación del microorganismo al medio proveniente del proceso de biodiésel. Los resultados obtenidos demuestran que la electrofermentación representa una estrategia potencial para mejorar la producción de P3HB mediante la modulación del metabolismo de *A. vinelandii* OP y favorecer el aprovechamiento de residuos provenientes de la industria del biodiésel.

Palabras clave: *Azotobacter vinelandii* OP, electrofermentación, polihidroxibutirato (P3HB), glicerol residual.

Abstract

Residual glycerol generated as a by-product of the biodiesel production process represents a waste stream with potential for biotechnological valorization through fermentation processes. However, P3HB (polyhydroxybutyrate) production can be limited by the intracellular redox balance, which can be modulated through external electron transfer systems. In this study, the effect of electrofermentation on poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) production by *Azotobacter vinelandii* OP was evaluated. Initially, different operating conditions of the electrofermentation system were assessed, considering the applied voltage (0, 0.75, and 1.5 V), the concentration of the redox mediator neutral red (0, 87.5, and 175 μM), and the surface area of stainless-steel electrodes (65.32 and 195.96 cm^2). The optimal condition (0.75 V, 87.5 μM neutral red, and 195.96 cm^2 electrode area) increased P3HB production in a sucrose-based medium (20 g L^{-1}) to 2.24 g L^{-1} , representing a 2.6-fold increase compared with traditional fermentation (1.32 g L^{-1}). Additionally, under these conditions, a reduction in the cell doubling time was observed, from 7.29 h in traditional fermentation to 6.83 h under electrofermentation. Subsequently, the optimized condition was evaluated using residual glycerol supplemented with sucrose as a carbon source, obtaining a 2.93-fold higher P3HB production under electrofermentation compared with traditional fermentation. The analysis of chemical oxygen demand (COD), pH, and volatile suspended solids (VSS) indicated a partial reduction of organic matter and adequate microbial adaptation to the medium derived from the biodiesel production process. The results demonstrate that electrofermentation represents a promising strategy to enhance P3HB production through the modulation of *A. vinelandii* OP metabolism and to promote the valorization of residual streams from the biodiesel industry.

Keywords: *Azotobacter vinelandii* OP, electrofermentation, polyhydroxybutyrate (P3HB), residual glycerol.

1. INTRODUCCIÓN

El acceso al agua limpia constituye un derecho humano fundamental; sin embargo, millones de personas en todo el mundo aún dependen de fuentes de agua contaminadas. Se estima que aproximadamente 1.8 millones de personas utilizan agua potable contaminada y que más del 80 % de las aguas residuales generadas por actividades humanas se descargan en ríos, lagos y mares sin tratamiento (ONU, 2024). Esta situación contribuye significativamente al deterioro de los ecosistemas acuáticos y a la escasez de agua dulce de calidad para el consumo humano.

Entre las principales fuentes de contaminación se encuentran las aguas residuales industriales, las cuales contienen altas concentraciones de materia orgánica, compuestos químicos y otros contaminantes que pueden afectar gravemente al ambiente si no se gestionan adecuadamente. En este contexto, la industria de los biocombustibles, particularmente la producción de biodiésel, ha cobrado gran relevancia en los últimos años debido a su potencial como alternativa energética sostenible; sin embargo, también genera importantes residuos industriales. Dentro de estas descargas industriales destacan los efluentes generados durante la producción de biodiésel, en los que se producen grandes volúmenes de subproductos, entre ellos el glicerol residual. Este compuesto se genera principalmente durante la etapa de transesterificación y en los procesos posteriores de purificación del biodiésel. El glicerol residual presenta una elevada carga orgánica y contiene impurezas como metanol, sales, catalizadores y ácidos grasos, lo que dificulta su tratamiento. Por estas características, el glicerol residual es considerado un contaminante emergente, ya que su creciente generación asociada al aumento en la producción de biodiésel, así como la limitada implementación de tecnologías eficientes para su valorización y tratamiento, incrementan su presencia en el ambiente y sus posibles efectos adversos en los ecosistemas. Un contaminante emergente es un compuesto químico o microbiológico que, previamente no era relevante o no se monitoreaba de manera rutinaria, pero ha sido detectado con creciente frecuencia en aguas residuales. Estos compuestos representan un potencial riesgo para la salud humana y el ambiente, debido a su persistencia y posible toxicidad, ya que no son eliminados eficientemente mediante los tratamientos convencionales de agua.

No obstante, el glicerol residual también representa una oportunidad para la valorización de residuos industriales, ya que puede utilizarse como fuente de carbono en diversos procesos biotecnológicos. El aprovechamiento de este tipo de residuos se alinea con los principios de la economía circular, en la que los subproductos industriales se transforman en materias primas para la obtención de productos de valor agregado. Paralelamente, otro problema ambiental de gran magnitud es la contaminación por plásticos. Desde 1950, la producción mundial de plásticos ha aumentado exponencialmente, alcanzando cientos de millones de toneladas anuales. Una proporción significativa de estos residuos termina en vertederos o en ecosistemas acuáticos, donde pueden persistir durante décadas debido a su baja degradabilidad. Además, la fragmentación de estos materiales genera microplásticos que han sido detectados incluso en organismos vivos y en tejidos humanos, lo que representa un riesgo potencial para la salud y el ambiente (Vessa et al., 2022 & Kibria, 2024).

Ante esta problemática, se han desarrollado alternativas más sostenibles, entre las cuales destacan los bioplásticos, materiales producidos a partir de recursos renovables o mediante procesos biotecnológicos. Uno de los biopolímeros más estudiados es el polihidroxibutirato (P3HB), un poliéster producido de forma natural por diversas bacterias como reserva intracelular de carbono y energía. En especies como *Azotobacter vinelandii*, la producción de P3HB se asocia a mecanismos de adaptación metabólica para almacenar carbono y energía en condiciones ambientales variables. Por esa capacidad, *A. vinelandii* ha sido estudiada como un microorganismo potencial para la producción biotecnológica de P3HB. Este biopolímero presenta propiedades termomecánicas similares a las de plásticos convencionales como el polipropileno, además de ser biodegradable y biocompatible.

A pesar de sus ventajas ambientales, la producción industrial de P3HB aún se encuentra limitada por los elevados costos asociados a los sustratos y a los procesos de producción. Una estrategia para reducir estos costos consiste en emplear residuos industriales como fuentes de carbono, entre ellos el glicerol residual generado en la industria del biodiésel.

En este contexto, la fermentación microbiana se ha consolidado como una plataforma biotecnológica clave para la producción de biopolímeros. Sin embargo, los procesos fermentativos convencionales pueden presentar limitaciones asociadas a desequilibrios en el

balance redox celular, lo que afecta la eficiencia metabólica y la formación del producto deseado.

Como alternativa, la electrofermentación ha surgido como una tecnología innovadora que permite modular el metabolismo microbiano mediante la aplicación de estímulos eléctricos o electromagnéticos. Esta estrategia facilita el control del balance redox intracelular, favoreciendo la conversión de sustratos y mejorando el rendimiento de productos metabólicos.

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de un sistema de electrofermentación en la producción de polihidroxibutirato (P3HB) por *Azotobacter vinelandii* OP utilizando glicerol residual proveniente de la producción de biodiésel como fuente de carbono, integrando así el tratamiento de efluentes industriales con la producción de bioplásticos de valor agregado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación de agua

Las aguas residuales son generadas a partir de diversas actividades humanas, incluyendo descargas domésticas, hospitalarias, industriales y agrícolas (Wang et al., 2021; Alazaiza et al., 2024; Jiad & Abbar., 2024). Estas aguas pueden contener una amplia variedad de contaminantes, tales como materia orgánica, metales pesados, sólidos suspendidos y otros compuestos potencialmente tóxicos que representan un riesgo significativo para el ambiente y la salud humana cuando no reciben un tratamiento adecuado (Cosgrove & Loucks., 2015; Zhu et al., 2022; ONU, 2024).

Para evaluar la calidad del agua se consideran diversos parámetros físicos, químicos y microbiológicos establecidos por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre los parámetros físicos destacan la turbidez y el color del agua, los cuales permiten determinar su claridad y apariencia. En cuanto a los parámetros químicos, el pH es uno de los indicadores más importantes, ya que debe mantenerse dentro de un rango aproximado de 6.5 a 8.5 para considerarse adecuado para diversos usos (OMS, 2022). A pesar de la importancia del tratamiento de aguas residuales, en muchos países aún existe una

infraestructura limitada para su manejo adecuado. En México, por ejemplo, se estima que únicamente alrededor del 50 % de las aguas residuales reciben algún tipo de tratamiento antes de ser descargadas al ambiente. En comunidades rurales, la ausencia de plantas de tratamiento provoca que estas aguas sean vertidas directamente en ríos, lagos o mares, lo que contribuye al deterioro de los ecosistemas acuáticos y a la propagación de contaminantes en el ambiente (Vidal, 2019; WaterAid, 2020).

Debido a esta problemática, el tratamiento y manejo adecuado de las aguas residuales se ha convertido en una prioridad para la gestión ambiental y la protección de los recursos hídricos (Vidal, 2019).

2.2 Contaminación por aguas industriales

Dentro de las diferentes fuentes de contaminación hídrica, las aguas residuales industriales representan una de las principales preocupaciones en regiones con alto desarrollo urbano e industrial. Este tipo de efluentes proviene de diversas actividades productivas, como la industria textil, la refinación de petróleo, la industria alimentaria y la obtención de productos químicos, entre otras (Cosgrove & Loucks, 2015; Holkar et al., 2016; Jiad & Abbar, 2024).

Las aguas residuales industriales suelen contener compuestos químicos potencialmente peligrosos, como microorganismos patógenos (*E. coli*), contaminantes emergentes (fármacos, productos de cuidado personal) así como altas concentraciones de materia orgánica, lo que puede generar impactos negativos en los ecosistemas acuáticos cuando son descargadas sin un tratamiento adecuado (Ren et al., 2024). La presencia de estos contaminantes puede alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas del agua, afectando tanto la biodiversidad como la calidad del recurso hídrico disponible para consumo humano y otras actividades (Jiad & Abbar, 2024). Aunque existen métodos tradicionales para el monitoreo de la calidad del agua, muchos de estos sistemas presentan limitaciones, ya que pueden ser costosos, requieren largos tiempos de análisis y, en algunos casos, resultan insuficientes para detectar de manera oportuna eventos de contaminación (Cosgrove & Loucks, 2015).

En este contexto, se ha incrementado el interés en el desarrollo de estrategias más sostenibles para la gestión de efluentes industriales. Entre estas alternativas se encuentra el uso de fuentes de energía renovables y procesos industriales más limpios, como la producción de biodiésel, que busca reducir la dependencia de combustibles fósiles y disminuir el impacto ambiental asociado a las actividades industriales (Kumar et al., 2020).

2.2.1 Residuos de biodiesel

El biodiésel es considerado una alternativa energética renovable que presenta ventajas ambientales frente al diésel convencional derivado del petróleo. Durante su combustión se generan menores emisiones de dióxido de carbono (Kumar et al., 2020; Osman et al., 2024). Además, el biodiésel posee una mayor biodegradabilidad, lo que reduce el riesgo de contaminación del suelo y del agua en caso de derrames o fugas (Kumar et al., 2019).

La producción de biodiésel se lleva a cabo mediante un proceso químico conocido como transesterificación, en el cual los triglicéridos presentes en aceites vegetales o grasas animales reaccionan con un alcohol, generalmente metanol, para formar ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol como subproducto (Mitrea et al., 2017). Durante las etapas de purificación y lavado del biodiésel se generan diferentes residuos que contienen impurezas tales como jabones, agua, alcoholes, metales y glicerol residual. Estas corrientes líquidas representan un problema ambiental importante, ya que poseen una elevada carga orgánica y pueden contribuir significativamente a la contaminación del agua si no son tratadas adecuadamente (Firman et al., 2018). La producción mundial de biodiésel ha mostrado un crecimiento sostenido en la última década, alcanzando 46 millones de toneladas anuales en 2024. A nivel global, Indonesia, Brasil y Estados Unidos se posicionan como los principales productores, concentrando cerca del 45 % de la producción total (IndexBox, 2024).

Con el crecimiento de la industria del biodiésel, la generación de glicerol residual ha aumentado considerablemente, convirtiéndose en un subproducto abundante cuya gestión representa un desafío ambiental y económico. No obstante, este residuo también puede ser considerado un recurso potencial, ya que puede emplearse como materia prima en diferentes

procesos biotecnológicos para la obtención de productos de valor agregado, incluyendo biopolímeros y otros compuestos de interés industrial (Hejna et al., 2016; Wang et al., 2024).

2.2.2 Estrategias de tratamiento del glicerol

El glicerol residual, principal subproducto generado durante la producción de biodiésel, ha despertado un creciente interés debido a su potencial para ser transformado en productos de valor agregado. Este compuesto puede ser utilizado como materia prima en diversas aplicaciones industriales como la producción de biocombustibles como biogás e hidrógeno, la síntesis de compuestos de alto valor agregado como 1,3-propanodiol y ácido succínico, incluyendo la producción de compuestos químicos y polímeros como 1,3-propanodiol, poliuretanos y polihidroxialcanoatos (PHA) (Yang et al., 2012; Hejna et al., 2016; Wang et al., 2024). Diversos procesos han sido propuestos para el aprovechamiento de este subproducto, entre los que destacan la fermentación microbiana, la oxidación química y los procesos de polimerización, los cuales permiten transformar el glicerol en compuestos de interés industrial (Wang et al., 2024). Por otra parte, la calidad del glicerol residual generado durante la producción de biodiésel depende en gran medida del tipo de catalizador utilizado en el proceso de transesterificación. En este sentido, pueden emplearse catalizadores homogéneos, como ácidos y bases, o catalizadores heterogéneos, tales como óxidos metálicos, sales metálicas o enzimas (Hejna et al., 2016).

Los catalizadores homogéneos suelen ser ampliamente utilizados debido a su bajo costo y alta eficiencia en la reacción. Sin embargo, estos requieren etapas adicionales de neutralización y purificación, lo que puede incrementar la generación de residuos. En contraste, los catalizadores heterogéneos o enzimáticos pueden producir glicerol con mayor grado de pureza, aunque su implementación puede implicar mayores costos o tiempos de reacción más prolongados (Wang et al., 2024). En este contexto, el desarrollo de tecnologías que permitan aprovechar directamente el glicerol residual sin necesidad de procesos de purificación complejos representa una alternativa prometedora para reducir costos de producción y promover el aprovechamiento sostenible de residuos industriales (Hejna et al., 2016).

2.2.3 Obtención de glicerol durante la producción de biodiesel.

La producción de biodiésel se lleva a cabo principalmente mediante un proceso químico denominado transesterificación, proceso que se puede observar en la Figura 1, en el cual los triglicéridos presentes en aceites vegetales o grasas animales reaccionan con un alcohol de cadena corta, generalmente metanol, para formar ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol como subproducto (Mitrea et al., 2017).

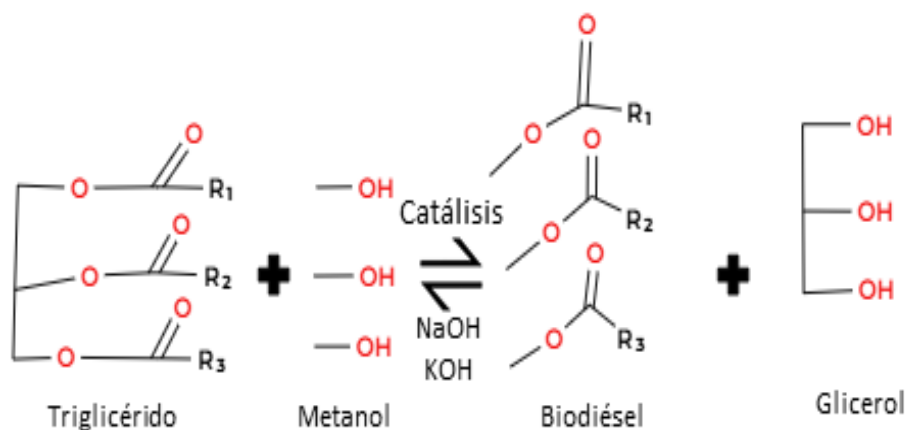


Figura 1 Síntesis de biodiésel (adaptado de Mitrea *et al.*, 2017).

Durante esta reacción, una molécula de triglicérido reacciona con tres moléculas de metanol, dando como resultado la formación de tres moléculas de biodiésel y una molécula de glicerol. (Kumar et al., 2020).

No obstante, este subproducto también puede considerarse un recurso potencial para el desarrollo de procesos biotecnológicos. En particular, el glicerol residual puede ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento de diversos microorganismos, permitiendo su conversión en compuestos de mayor valor agregado, como biocombustibles, ácidos orgánicos o biopolímeros. Por esta razón, el aprovechamiento biotecnológico del glicerol residual ha sido ampliamente investigado como una estrategia para promover la economía circular dentro de la industria del biodiesel (Mitrea *et al.*, 2017).

2.3 Contaminación por plásticos

Los plásticos son materiales poliméricos sintéticos derivados principalmente del petróleo, ampliamente utilizados en diferentes sectores industriales debido a su bajo costo, resistencia mecánica y durabilidad. Sin embargo, estas mismas propiedades han contribuido a la acumulación masiva de residuos plásticos en el ambiente, convirtiéndolos en uno de los contaminantes más persistentes a nivel global (Nafiu et al., 2024). Actualmente, los residuos plásticos se encuentran distribuidos en una amplia variedad de ecosistemas, particularmente en ambientes marinos y de agua dulce, donde pueden permanecer durante largos periodos de tiempo debido a su baja degradabilidad (Qian et al., 2025). Los plásticos de gran tamaño, conocidos como macroplásticos, pueden causar daños directos a la fauna mediante ingestión o enredo, provocando lesiones o incluso la muerte de diversos organismos (Gregory, 2009). Además, la fragmentación progresiva de estos materiales da origen a partículas más pequeñas denominadas microplásticos, las cuales presentan un diámetro menor a 5 mm y representan una preocupación creciente debido a su capacidad de dispersarse ampliamente en el ambiente (Andrady, 2017).

Diversos estudios han demostrado que los microplásticos pueden generar efectos negativos en los organismos vivos, incluyendo procesos de bioacumulación, estrés oxidativo e incluso alteraciones reproductivas (Vessa et al., 2022; Kibria, 2024). Asimismo, se han detectado partículas plásticas en tejidos humanos, incluyendo la placenta, lo que evidencia la magnitud del problema y sus posibles implicaciones para la salud (Zurub et al., 2024). Ante esta problemática, ha surgido un creciente interés en el desarrollo de materiales alternativos más sostenibles, entre los que destacan los bioplásticos, los cuales pueden ser producidos a partir de recursos renovables o mediante procesos biotecnológicos. Entre estos materiales se encuentra el polihidroxibutirato (P3HB), un biopolímero producido por diversos microorganismos y que presenta propiedades similares a las de algunos plásticos convencionales, además de ser biodegradable y biocompatible (Barboza & Gimenez, 2015).

2.3.1 Producción de ácido polihidroxibutírico (P3HB)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son una familia de biopolímeros producidos de manera natural por diversos microorganismos como una forma de almacenamiento intracelular de carbono y energía. Entre estos compuestos, el polihidroxibutirato (P3HB) es uno de los más estudiados debido a sus propiedades fisicoquímicas y su potencial aplicación como sustituto de plásticos convencionales derivados del petróleo (Bhagchandani et al., 2020; Andler et al., 2023). El P3HB es un poliéster biodegradable y biocompatible que presenta características similares a las de algunos polímeros sintéticos ampliamente utilizados, como el polipropileno. Entre sus propiedades destacan su capacidad de formar películas, su biodegradabilidad bajo condiciones ambientales y su biocompatibilidad, características que han impulsado su interés para diversas aplicaciones industriales, incluyendo envases, materiales biomédicos y productos agrícolas. Sin embargo, el P3HB presenta ciertas limitaciones asociadas a sus propiedades mecánicas, como baja flexibilidad y fragilidad en comparación con otros poli(hidroxicanoatos) (PHAs), lo que puede restringir algunas aplicaciones. Por ello, se han estudiado estrategias como la producción de copolímeros y la modificación de sus propiedades para mejorar su desempeño como biomaterial (Bhagchandani et al., 2020). Este biopolímero es sintetizado por distintos microorganismos, como bacterias de los géneros *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, entre otros. La acumulación de P3HB generalmente ocurre cuando las células microbianas se desarrollan en condiciones donde existe exceso de fuente de carbono y limitación de otros nutrientes esenciales, como nitrógeno, fósforo u oxígeno. Bajo estas condiciones, los microorganismos canalizan el exceso de carbono hacia la formación de gránulos intracelulares de P3HB como mecanismo de reserva metabólica (Dalsasso et al., 2019). A pesar de sus ventajas ambientales, la producción industrial de P3HB aún enfrenta diversos desafíos, principalmente con los costos de producción, que están asociados al precio de los sustratos, las condiciones de cultivo requeridas para su síntesis y las etapas de purificación del polímero (Bhagchandani et al., 2020). Actualmente, la producción de PHAs sigue siendo económicamente menos competitiva en comparación con los plásticos convencionales que se derivan del petróleo. Se han reportado costos de producción de PHAs cercanos a 4–6

USD/kg, mientras que los polímeros petroquímicos convencionales presentan costos aproximados de 1–2 USD/kg, lo que representa una de las principales limitaciones para su adopción a gran escala (Gundlapalli & Ganesan., 2025). La diferencia económica se atribuye al costo de las fuentes de carbono y la complejidad de las etapas de extracción y purificación (Mahato et al., 2023). Por esta razón, en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de residuos industriales como fuentes alternativas de carbono, tales como glicerol residual, melazas, residuos lignocelulósicos y efluentes agroindustriales (Peña et al., 2014; Castillo et al., 2020).

El aprovechamiento de estos residuos no solo permite reducir los costos de producción del biopolímero, sino que también contribuye al desarrollo de estrategias de economía circular, en las que los subproductos industriales son transformados en materiales biodegradables de alto valor agregado (Huamán et al., 2021).

2.3.2 Ruta de biosíntesis de P3HB en *Azotobacter vinelandii*

La biosíntesis de P3HB en microorganismos ocurre a través de una ruta metabólica relativamente simple que involucra tres reacciones enzimáticas principales a partir de acetil-CoA, un intermediario central del metabolismo celular los cuales se mencionan a continuación (Anderson et al., 1990). En la primera etapa, dos moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA mediante la acción de la enzima β -cetotiolasa (PhaA). Posteriormente, el acetoacetil-CoA es reducido a (R)-3-hidroxibutiril-CoA por la enzima acetoacetil-CoA reductasa (PhaB), utilizando NADPH como cofactor reductor. Finalmente, la enzima P3HB sintasa (PhaC) cataliza la polimerización de las moléculas de (R)-3-hidroxibutiril-CoA para formar cadenas de P3HB que se acumulan en forma de gránulos intracelulares dentro de la célula bacteriana (Anderson et al., 1990). La regulación de esta ruta metabólica está estrechamente relacionada con el estado fisiológico de la célula y con las condiciones del medio de cultivo. Factores como la disponibilidad de nutrientes, la relación carbono/nitrógeno y el balance redox intracelular influyen significativamente en la

acumulación de P3HB. En particular, un exceso de carbono acompañado de limitación de otros nutrientes favorece la desviación del flujo metabólico hacia la síntesis del biopolímero.

En *Azotobacter vinelandii*, la producción de P3HB está asociada a mecanismos de adaptación metabólica que permiten a la bacteria almacenar carbono y energía en condiciones ambientales variables. Debido a esta capacidad, *A. vinelandii* ha sido ampliamente estudiada como un microorganismo potencial para la producción biotecnológica de P3HB, como se observa en la Figura 2, *Azotobacter vinelandii* presenta diversas rutas metabólicas involucradas en el aprovechamiento de fuentes de carbono. En esta bacteria se ha reportado que el catabolismo de la glucosa ocurre principalmente a través de la vía de Entner-Doudoroff, una ruta metabólica que permite la generación de intermediarios necesarios para la obtención de energía y precursores biosintéticos (Conway, 1992).

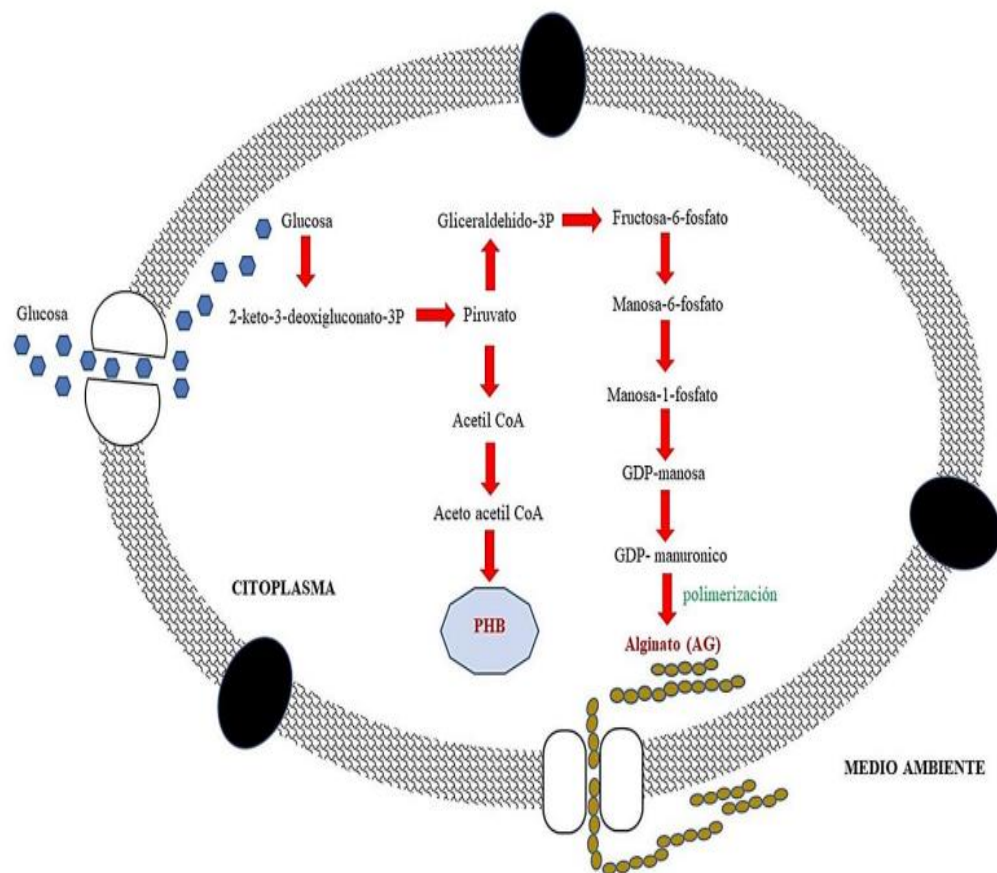


Figura 2 Ruta metabólica de la biosíntesis de P3HB (Huamán et al., 2021).

La vía Entner-Doudoroff constituye una ruta central para el catabolismo de glucosa en *Azotobacter vinelandii*. En esta vía, la glucosa es fosforilada y posteriormente oxidada hasta formar 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), un intermediario clave que es escindido por la enzima KDPG aldolasa para generar gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. Estos intermediarios pueden incorporarse al metabolismo central para la generación de energía y la formación de precursores biosintéticos necesarios para el crecimiento celular y la acumulación de compuestos de reserva como el poli(3-hidroxibutirato) (P3HB). En *A. vinelandii*, el flujo de carbono hacia la biosíntesis de P3HB depende de la disponibilidad de precursores metabólicos y del balance entre crecimiento celular, generación de energía y almacenamiento de carbono (Velázquez et al., 2020). La ruta se puede observar en la Figura 3.

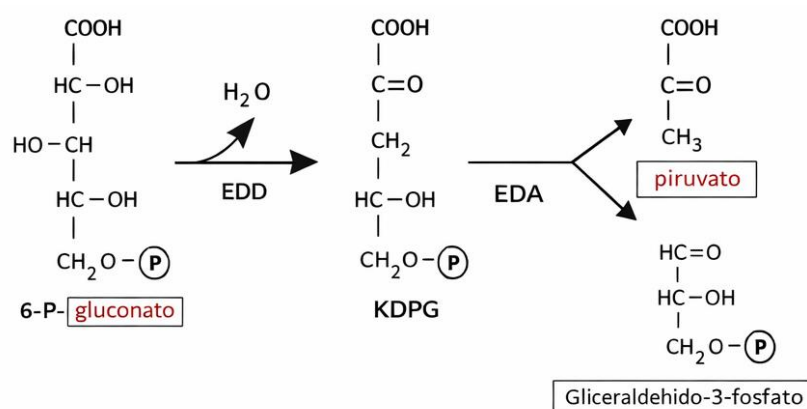


Figura 3 Ruta metabólica de Entner-Doudoroff (adaptado de Conway, 1992).

Para la producción de P3HB a partir de glicerol, el glicerol es primero catabolizado a glicerol-3-fosfato, luego a dihidroxiacetona fosfato, y finalmente se incorpora en la vía glucolítica, como se puede observar en la Figura 4. Diversos microorganismos tienen la capacidad de utilizar el glicerol como única fuente de carbono a través de la dihidroxiacetona (Yoneyama et al. 2015).

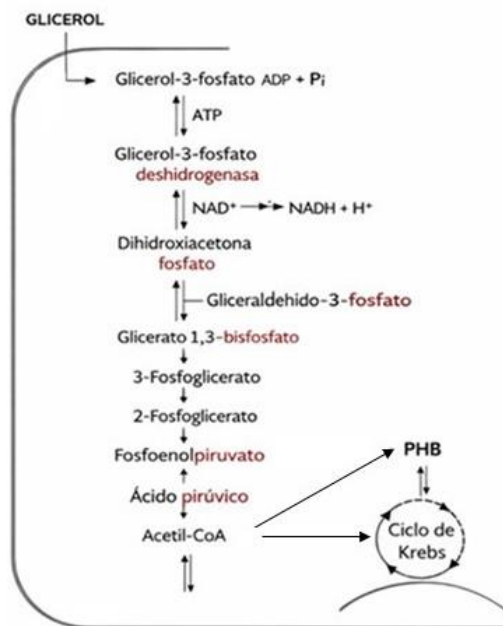


Figura 4 Ruta metabólica de la síntesis de glicerol a P3HB (Yoneyama et al., 2015).

En este contexto, se está promoviendo un modelo de economía circular que incluye el uso de bioplásticos P3HB, un biopolímero producido por bacterias, que ofrece una alternativa sostenible a los plásticos convencionales (Dalsasso et al., 2019), ya que estos representan una problemática ambiental global (Qian et al., 2025).

En este contexto, el control de las condiciones metabólicas y del balance redox celular se vuelve un factor clave para optimizar la producción de este biopolímero. Por ello, tecnologías emergentes como la electrofermentación han comenzado a ser investigadas como estrategias para modular el metabolismo microbiano y mejorar el rendimiento en la producción de compuestos de interés, incluyendo P3HB (Dalsasso et al., 2019).

2.4 Fermentación

La fermentación es un proceso biotecnológico ampliamente utilizado para la producción de una gran variedad de compuestos de interés industrial, incluyendo biocombustibles, ácidos orgánicos, enzimas y biopolímeros. Este proceso se basa en la capacidad metabólica de diversos microorganismos para transformar sustratos orgánicos en productos específicos mediante rutas bioquímicas reguladas por condiciones ambientales y nutricionales del cultivo

(Moscoviz et al., 2016). Durante la fermentación, los microorganismos utilizan diferentes fuentes de carbono y energía para su crecimiento y mantenimiento celular. Dependiendo del metabolismo del microorganismo y de las condiciones de cultivo, estos sustratos pueden convertirse en distintos productos metabólicos. En los procesos industriales, el control de variables como la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno y la concentración de nutrientes es fundamental para optimizar la productividad del sistema (Jiang et al., 2019; Gong et al., 2020).

Diversos estudios han explorado el uso de sustratos de bajo costo o residuos industriales como fuentes de carbono para la fermentación, con el objetivo de reducir los costos asociados a la producción de biopolímeros. Entre estos sustratos destaca el glicerol residual proveniente de la industria del biodiésel, el cual ha demostrado ser una fuente de carbono viable para el crecimiento microbiano y la producción de diversos metabolitos de interés (Moscoviz et al., 2016; Jiang et al., 2019).

Sin embargo, los procesos fermentativos convencionales pueden presentar limitaciones asociadas a desequilibrios en el balance redox celular, entendidos como una alteración en la relación entre compuestos reducidos y oxidados dentro de la célula, principalmente cofactores como NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺. Estos desequilibrios pueden limitar la disponibilidad de poder reductor necesario para diversas rutas metabólicas, afectando la eficiencia metabólica, el crecimiento celular y la conversión del sustrato en los productos deseados. (Moscoviz et al., 2016; Gong et al., 2020).

2.5 Electrofermentación

La electrofermentación es una estrategia biotecnológica emergente que combina principios de fermentación microbiana con sistemas bioelectroquímicos para influir en el metabolismo de los microorganismos mediante la aplicación de estímulos eléctricos (Wong et al., 2014). Este enfoque permite modificar el estado redox del sistema y, en consecuencia, redirigir las rutas metabólicas hacia la producción de compuestos específicos (Liu et al., 2013). La electrofermentación se conceptualizó a principios de la década de 2010 y ha despertado un interés como herramienta para modular el metabolismo microbiano sin recurrir a

modificaciones genéticas, siendo una alternativa atractiva en contextos industriales y ambientales (Bajracharya et al., 2017). Su principal potencial radica en la capacidad de influir en los equilibrios redox celulares mediante la modificación de la disponibilidad de equivalentes reductores, como NADH y NADPH, y de la relación entre sus formas reducidas y oxidadas (NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺). Estos cambios pueden alterar el flujo de electrones intracelular y favorecer determinadas rutas metabólicas, permitiendo incrementar la producción de compuestos reducidos como butanol, etanol o 1,3-propanodiol, o bien promover la formación de productos más oxidados como succinato y acetato, dependiendo del tipo de polarización aplicada (Batlle et al., 2017).

Además, la electrofermentación presenta nuevas oportunidades para valorarizar residuos orgánicos y subproductos industriales. Existen estudios que demuestran que la aplicación de potenciales catódicos moderados, mejoran la conversión de sustratos residuales como glicerol residual, lactosuero o aguas residuales industriales en productos de valor agregado. Un ejemplo, es el trabajo de Moscoviz et al., (2017) donde el acoplamiento de un electrodo catódico en fermentaciones mixtas de glicerol favorece a la selección de comunidades microbianas más eficientes para la producción de 1,3-propanodiol, sin necesidad de un aporte energético significativo. De igual modo, otros trabajos demostraron que la electrofermentación reduce la producción de gases indeseables como H₂ o CO₂, al redirigir los electrones hacia rutas metabólicas más controladas (Bian et al., 2021).

En los sistemas de electrofermentación, los microorganismos interactúan con electrodos que actúan como sumidero de electrones. Esta interacción puede ocurrir de forma directa, a través de proteínas redox presentes en la membrana celular, o de forma indirecta mediante mediadores redox solubles que facilitan la transferencia de electrones entre el microorganismo y el electrodo (Ghimire et al., 2015).

El principio fundamental de la electrofermentación es la transferencia de electrones entre microorganismos y electrodos como se puede apreciar en la Figura 5, proceso que se da de manera directa (a través de proteínas redox o nanofilamentos bacterianos) o indirecta (usando mediadores solubles como el hidrógeno, el formiato o la menadiona, entre otros) (Bolognesi, 2021). Esta flexibilidad en mecanismos de transferencia electrónica permite que una gama

amplia de microorganismos, ya sea aerobios facultativos o anaerobios estrictos, participen en los procesos electrofermentativos. Entre las especies más estudiadas destacan *Geobacter sulfurreducens*, *Shewanella oneidensis*, *Clostridium acetobutylicum* y *Escherichia coli*, las cuales presentan estrategias para intercambiar electrones con los electrodos (Ghimire et al., 2015; Jiang et al., 2019; Alami et al., 2020; Yang et al., 2021; Haupt et al., 2022).

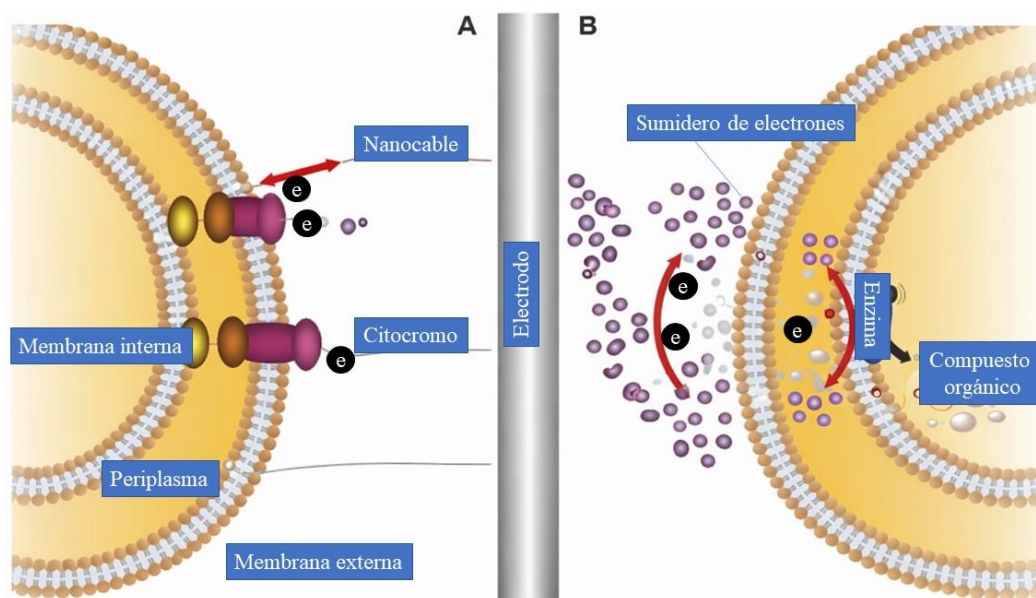


Figura 5 Mecanismos de transferencia electrónica bidireccional entre bacterias y electrodos. Mecanismos de transferencia electrónica entre bacterias electroactivas y electrodos. (A) Transferencia electrónica directa (TED), mediada por pili conductores (nanocables) y citocromos de la membrana externa, con o sin la participación de lanzaderas electrónicas. Estos mecanismos permiten el transporte de electrones desde el metabolismo intracelular hasta la superficie del electrodo. (B) Transferencia electrónica indirecta (TEI), en la que los electrones se transportan mediante lanzaderas electrónicas endógenas o exógenas, lo que permite el intercambio electrónico sin contacto directo entre la célula y el electrodo. Modificada con ChatGPT (Zheng et al., 2020).

La capacidad de modular el flujo de electrones dentro del sistema permite influir en el balance redox intracelular, un factor clave en la regulación de muchas rutas metabólicas. Al controlar este equilibrio, es posible favorecer la formación de determinados metabolitos y mejorar el rendimiento de los procesos fermentativos (Modestra et al., 2015).

En los últimos años, la electrofermentación ha sido investigada como una herramienta prometedora para la producción de diversos compuestos de valor agregado, incluyendo biocombustibles, ácidos orgánicos y biopolímeros. En particular, esta tecnología ha mostrado potencial para mejorar la eficiencia metabólica de ciertos microorganismos mediante la regulación de las condiciones electroquímicas del sistema (Ghimire et al., 2015). Así el sistema permite que la corriente eléctrica juegue un papel determinante, ya que no solo mantiene la reacción de fermentación, sino que incluso proporciona pequeñas densidades de corriente que pueden modificar al ORP tanto extracelular como intracelular (Ghimire et al., 2015). Este cambio en el equilibrio NADH/NAD^+ impacta significativamente el espectro de productos finales de la fermentación (Moscoviz et al., 2016). Este tipo de transferencia de electrones se puede realizar de diversas formas: directamente a través del contacto entre el microorganismo y el electrodo, por medio de nanocables que conectan a ambos, o utilizando sustancias poliméricas extracelulares generadas por biopelículas microbianas (Liu et al., 2013).

En la Figura 6 se describe la conversión del sustrato en producto, proceso durante el cual los microorganismos transfieren el exceso de electrones hacia el ánodo. Esta transferencia electrónica favorece la oxidación de equivalentes reductores intracelulares, disminuyendo la relación NADH/NAD^+ dentro de la célula. Como respuesta, el metabolismo celular regula el flujo de carbono hacia rutas capaces de regenerar NADH , con el fin de restablecer el equilibrio redox y mantener la actividad metabólica (Moscoviz et al., 2016). Así, el microorganismo que se utiliza en la fermentación, consume al sustrato, sin embargo, el microorganismo que es electroactivo funciona como mediador entre el organismo que fermenta y el ánodo, permitiendo mecanismos de transferencia de electrones. Así, el microorganismo electroactivo consume los subproductos finales de la fermentación del sustrato (Moscoviz et al., 2016).

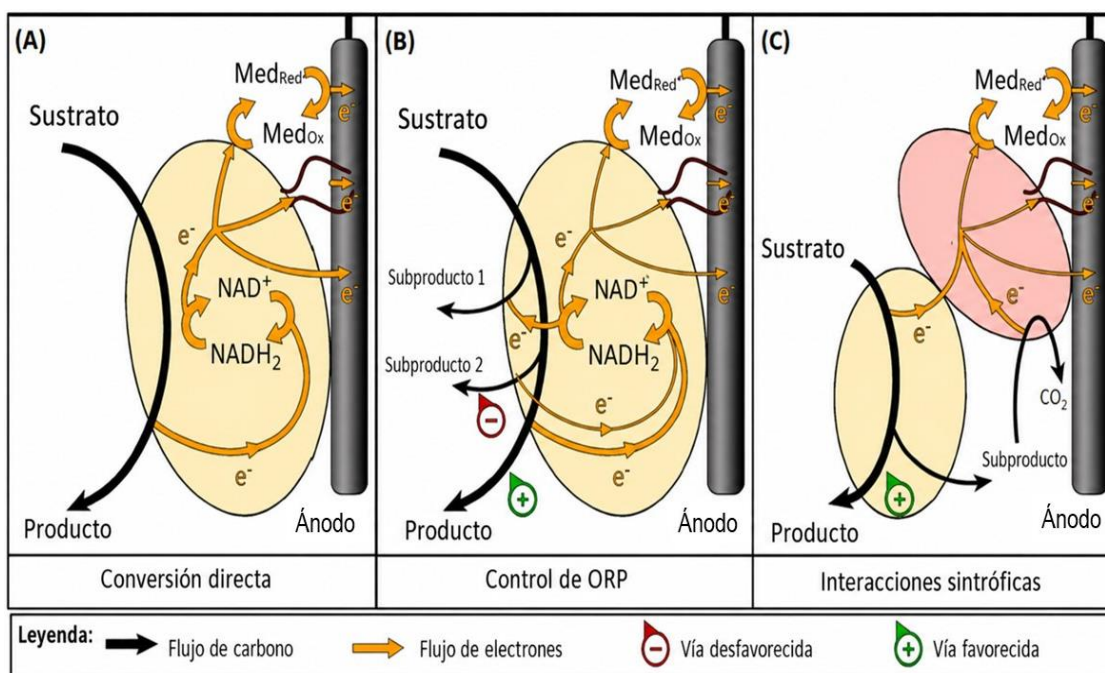


Figura 6 Mecanismo de electrofermentación (Moscoviz et al., 2016).

La electrofermentación constituye una estrategia capaz de superar algunas de las limitaciones presentes en la fermentación tradicional, permitiendo un mayor control de los procesos fermentativos y favoreciendo una mayor eficiencia de las rutas metabólicas microbianas (Schievano et al., 2016). En el Cuadro 1 podemos observar algunas aplicaciones de los sistemas de electrofermentación.

Cuadro 1 Electrofermentación y su uso con distintos microorganismos.

Microorganismo	Condición de voltaje aplicado	Efecto observado	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Sistema electrofermentativo con glicerol como fuente de carbono, comparado con condición sin aplicación de voltaje (0 V) y 0.2 de V.	Incremento en el consumo/aprovechamiento de glicerol respecto al control	Sturm et al., 2015
<i>Bacillus subtilis</i>	Electroestimulación a 0.4 V comparada con la condición control.	Incremento en la producción de poli- γ -glutámico (γ -PGA) de 3.3 a 9.13 g/L	Adilkhanova et al., 2024
<i>Clostridium Kluyveri</i>	Condición electrofermentativa a 0.1 V comparada con el control sin estimulación eléctrica.	Incremento en la producción de caproato de 0.6 a 1.51 g/L Incremento en la producción de caproato de 0.6 a 1.51 g/L	Chaitanya et al., 2024

Estos estudios evidencian que la aplicación de estímulos eléctricos puede modificar el metabolismo microbiano y favorecer la producción de metabolitos de interés; sin embargo, el efecto depende del microorganismo, la intensidad del estímulo eléctrico y las condiciones de operación.

En la última década, los estudios han avanzado hacia la aplicación de EF en la producción de ácidos grasos, alcoholes y otros compuestos de interés industrial, mostrando su potencial como herramienta sostenible para superar los límites de la fermentación clásica (Becker et al., 2015; Chandrasekhar et al., 2021).

Por tal motivo, el diseño y la geometría de los reactores presentan una relevancia concreta, para que la eficiencia durante el proceso electrofermentativo dependa de la interacción entre los electrodos, microorganismos y el entorno de la reacción. Los sistemas tradicionales emplean configuraciones, entre las que se encuentran las celdas tipo H, que están constituidas

de dos compartimentos separados mediante una membrana de intercambio iónico, donde el electrodo de trabajo y el contraelectrodo se encuentran en cámaras distintas. Dicha disposición permite que la dirección del flujo electrónico sea controlada y así evitar interferencias entre los productos generados (Rosenbaum & Franks, 2014). No obstante, las geometrías muestran limitaciones en escalabilidad y transferencia de masa. Por ello, se han explorado variaciones más compactas y eficientes, como celdas de una sola cámara, biopelículas catódicas en electrodos de fieltro de grafito y configuraciones de membrana de intercambio iónico (Virdis et al., 2022).

2.6 Diferencia entre fermentación y electrofermentación

La fermentación convencional se caracteriza por ser un proceso anaerobio en el que un sustrato actúa paralelamente como donador y aceptor de electrones. Esto permite la formación de productos reducidos (como etanol o lactato) y oxidados (como CO₂) en proporciones que son determinadas por el equilibrio redox celular (Chandrasekhar et al., 2021). Sus ventajas destacan en el uso de la diversidad microbiana, la posibilidad de emplear distintos sustratos y su consolidada aplicación en la industria alimentaria, química y farmacéutica. Sin embargo, presenta una baja selectividad, rendimientos limitados y restricciones en la gama de productos alcanzables (Du et al., 2007). En contraste, la electrofermentación es un proceso anaeróbico que utiliza un electrodo como “válvula” externa de electrones. En la modalidad anódica, el electrodo actúa como sumidero de electrones y favorece la síntesis de productos más oxidados, mientras que, en la modalidad catódica, funciona como fuente de electrones, promoviendo compuestos más reducidos (butanol, propionato, 1,3-propanodiol) (Rosenbaum & Franks., 2014; Choi et al., 2014). Por lo tanto, la EF incrementa los títulos y selectividades de ciertos metabolitos, además de ofrecer la oportunidad de adaptarse a fuentes de energía renovable, contribuyendo a una bioeconomía circular. En el Cuadro 2, podemos destacar aspectos de distintivos entre fermentación convencional y electrofermentación.

Cuadro 2 Fermentación convencional vs. Electrofermentación

Aspecto	Fermentación convencional	Electrofermentación
Concepto	Catabolismo microbiano sin aceptores externos de electrones: el sustrato se oxida y reduce simultáneamente.	Uso de un electrodo polarizado para donar o aceptar electrones, modificando el estado redox celular y redirigiendo los flujos metabólicos.
Ventajas	Tecnología consolidada en la industria (alimentos, bioquímicos, fármacos). Amplia diversidad microbiana y de sustratos. Procesos relativamente simples y conocidos.	Supera las limitaciones de balance redox. Aumenta rendimientos y selectividad hacia compuestos reducidos u oxidados. Posibilidad de acoplarse a energías renovables. Expande la gama de productos (ácidos grasos, alcoholes, aminoácidos).
Desventajas	Baja selectividad de productos. Limitación por el equilibrio NAD^+/NADH. Costos elevados de purificación por mezclas complejas.	Tecnología emergente aún en fase de laboratorio. Complejidad en el diseño de reactores. Necesidad de materiales conductores adecuados y control electroquímico. Desconocimiento de muchos mecanismos de transferencia de electrones.
Aplicaciones actuales	Producción de bioetanol, ácido láctico, aminoácidos (glutamato, lisina), antibióticos, polisacáridos (como gomas) enzimas y biopolímeros.	Producción de compuestos más reducidos (butanol, 1,3-propanodiol, propionato) o más oxidados (acetoina, succinato). Exploración en biocombustibles, bioplásticos y plataformas de biorrefinería.

Escalabilidad	Altamente desarrollada a nivel industrial (bioetanol, ácido cítrico, etc.).	Limitada a nivel de laboratorio y piloto; retos en transferencia de masa y costos de operación.
----------------------	---	---

En este contexto, la aplicación de sistemas de electrofermentación representa una alternativa innovadora para optimizar procesos biotecnológicos y favorecer la conversión de residuos industriales, como el glicerol residual proveniente de la producción de biodiésel, en productos de mayor valor agregado, como el polihidroxibutirato (P3HB).

3 HIPÓTESIS

La intensidad de voltaje el área superficial de los electrodos y un mediador redox aplicado en una fase específica del crecimiento de *Azotobacter vinelandii* OP en un sistema de fermentación electroestimulada, incrementara la bioconversión de glicerol residual para la producción de polihidroxibutirato.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la bioconversión de glicerol residual a polihidroxibutirato mediante *Azotobacter vinelandii* OP bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la correlación entre la aplicación de distintos voltajes, área superficial de electrodos y concentración del mediador sobre la producción de polihidroxibutirato microbiano en un sistema de fermentación electroestimulada en experimentos modelo.
2. Evaluar el sistema de fermentación electroestimulada en diferentes fases de crecimiento microbiano sobre la producción del polihidroxibutirato.
3. Estimar la producción del polihidroxibutirato mediante el sistema de fermentación electroestimulada utilizando glicerol residual.
4. Cuantificar los parámetros de calidad del efluente de la producción de biodiesel tratado mediante *Azotobacter vinelandii* OP usando el sistema de fermentación electroestimulada.

5 METODOLOGÍA

5.1 Sitio de estudio

La experimentación se llevó a cabo en el Parque Biotecnológico en la Planta Piloto de Biotecnología de la Facultad de Química en la Universidad Autónoma de Querétaro.

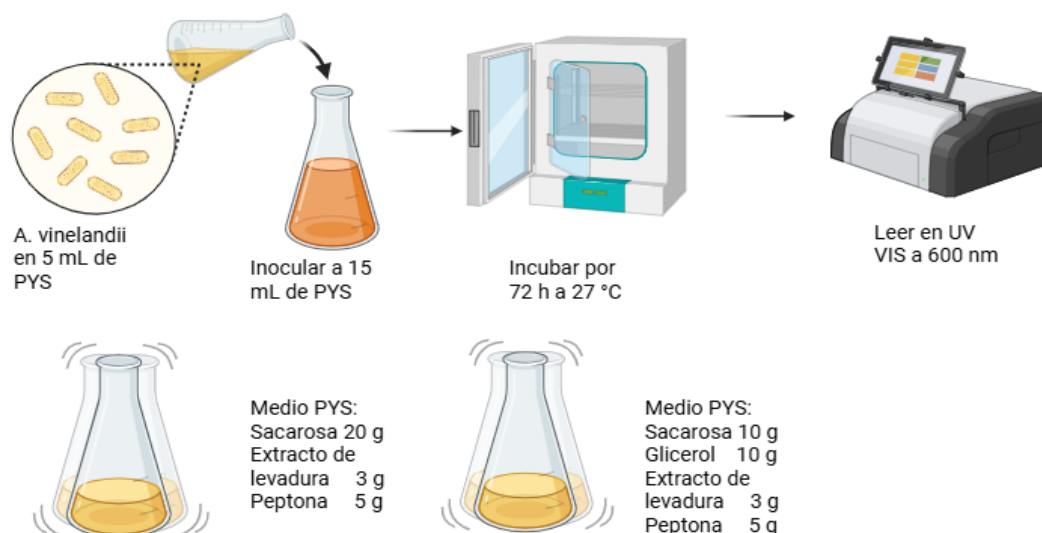
5.2 Material biológico y preparación del inóculo

Se utilizó la bacteria *Azotobacter vinelandii* OP proporcionada por el Dr. Carlos Felipe Peña Malacara proveniente del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La cepa fue preservada según lo establecido por Peña et al., 2014 en cajas Petri con Medio PYS modificado. El medio de cultivo PYS modificado estaba compuesto por sacarosa, extracto de levadura y peptona como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3 Composición del medio PYS.

Composición	Concentración (g/L)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	3
Peptona	5

La cepa se inoculó según lo que se estableció en Peña *et al.*, (2014) en 100 mL del medio PYS y 1 mL de la cepa activada, se incubó a 29 °C en una incubadora (Prendo, INO 650V-9) por 24 h, la metodología resumida puede observarse en la Figura 7.



Created in BioRender.com

Figura 7 Metodología resumida del crecimiento de *A. vinelandii* OP.

Objetivo específico 1: Determinar la correlación entre la aplicación de distintos voltajes, área superficial de electrodos y concentración del mediador sobre la producción de polihidroxibutirato microbiano en un sistema de fermentación electroestimulada en experimentos modelo.

5.3 Sistema de electrofermentación

La evaluación del rendimiento del polihidroxibutirato se realizó utilizando tres voltajes (0, 0.75 y 1.5), diferente área superficial de los electrodos (65.32 cm² y 195.96 cm²), los electrodos son cilindros de acero inoxidable y también se emplearon diferentes concentraciones de rojo neutro (0, 87.5, 175 µM). Se tomaron muestras de 15 mL cada 6 h a partir de la hora 36, para evaluar el pH y los azúcares reductores del medio fermentado. Considerando los parámetros anteriores, el funcionamiento del sistema con respecto a el metabolismo de *Azotobacter vinelandii* OP se cuantificó la producción de P3HB y la biomasa. El sistema de una fermentación tradicional sin mediador y sin voltaje en los mismos reactores incluyendo los electrodos se utilizaron como control para comparar los resultados.

Cada uno de los extremos de los electrodos se conectó a una fuente de poder (GW Instek, GPS 3030DD) en corriente continua mediante caimanes.

Para evaluar el voltaje se utilizó un sistema de electrofermentación el sistema constó de un recipiente para fermentación con capacidad de 90 mL. Contuvo 60 mL de medio PYS inoculado con *Azotobacter vinelandii* OP y se le adicionó mediador redox rojo neutro.

Cada uno de los electrodos se conectó a una fuente de poder de corriente continua por caimanes mientras estaban suspendidas de un tapón de hule del recipiente. Los biorreactores estaban bajo condiciones de 28 ° C y a una agitación magnética de 220 rpm. Los ejemplos de los reactores montados pueden observarse en la Figura 8.

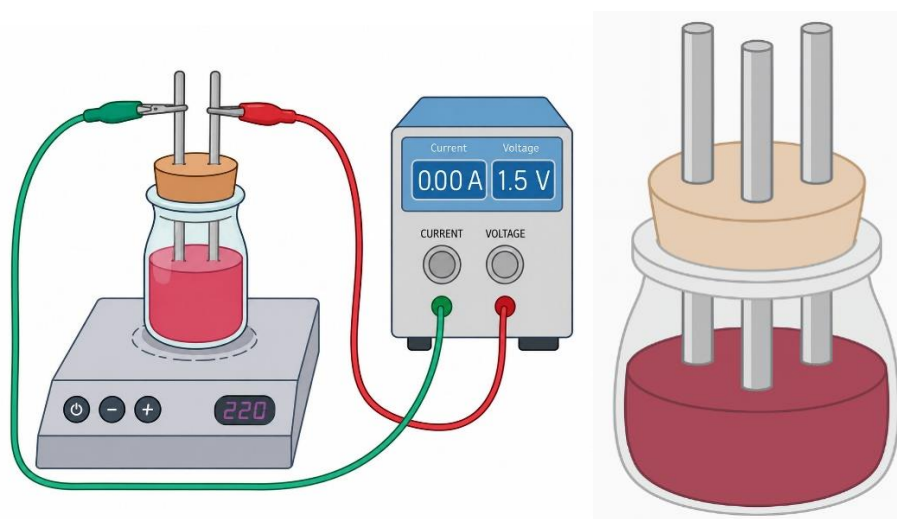


Figura 8 Diseño de los reactores para electrofermentación de *Azotobacter vinelandii* OP.

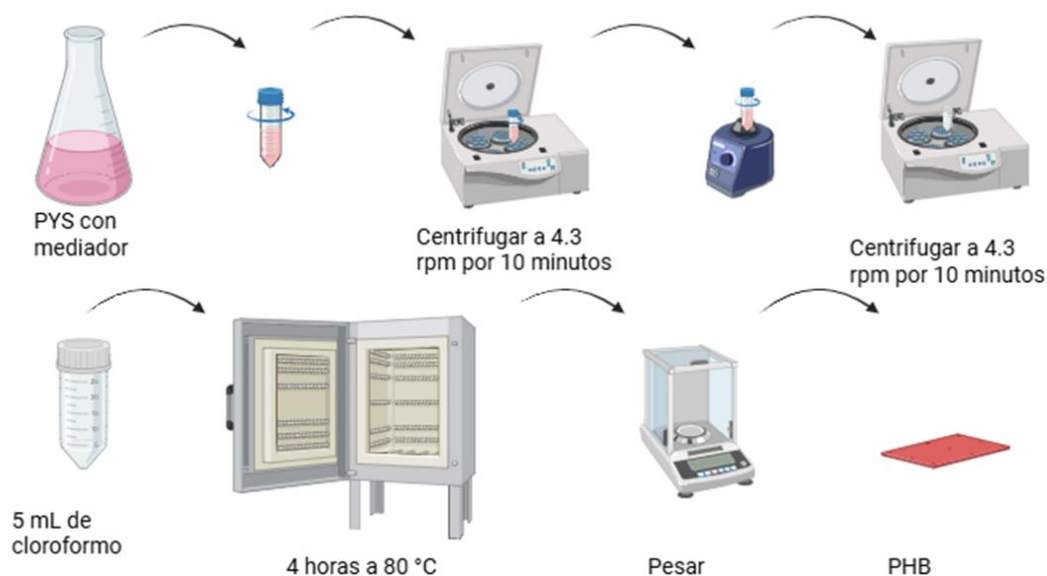
5.4 Cuantificación del rendimiento del polihidroxibutirato producido por *Azotobacter vinelandii* OP bajo el efecto de fermentación electroestimulada

La evaluación del rendimiento del polihidroxibutirato se realizó utilizando tres voltajes (0, 0.75 y 1.5), diferente área superficial de los electrodos (65.32 cm² y 195.96 cm²), diferentes concentraciones de rojo neutro (0, 87.5, 175 µM). Se tomaron muestras de 5 mL cada 6 h a partir de la hora 36, para evaluar el pH del medio fermentado. Considerando los parámetros anteriores, el funcionamiento del sistema con respecto a el metabolismo de *Azotobacter vinelandii* OP se cuantificó la producción de P3HB y la biomasa. El sistema de una

fermentación tradicional sin mediador y sin voltaje en los mismos reactores incluyendo los electrodos se utilizaron como control para comparar los resultados.

Objetivo específico 2: Evaluar la aplicación del sistema de fermentación electroestimulada en diferentes fases de crecimiento microbiano sobre la producción del polihidroxibutirato.

El cultivo microbiano se dividió en tres fases de crecimiento, según el comportamiento del microorganismo en el medio de cultivo: fase exponencial, fase estacionaria y fase de declive. Las fases se identificaron mediante mediciones de biomasa. En base a los tiempos se determinaron aquellos que permitieron obtener una biomasa para cuantificar la producción de P3HB. La metodología resumida para la obtención puede observarse en la Figura 9 donde se resume que la extracción y cuantificación de P3HB se realizó mediante la metodología descrita por Hejna et al. (2016). Para ello, se tomaron muestras de 15 mL del cultivo fermentado y se centrifugaron para recuperar la biomasa celular. Posteriormente, la biomasa obtenida fue sometida a secado hasta alcanzar peso constante para determinar la biomasa seca. A partir de esta biomasa, se utilizaron 0.1 g de células secas, las cuales fueron resuspendidas en 5 mL de cloroformo para favorecer la extracción del P3HB intracelular. La suspensión fue sometida a agitación mediante vortex y posteriormente incubada bajo agitación durante 1 h a 28 °C para favorecer la solubilización del polímero. Después, la muestra fue centrifugada para separar los residuos celulares insolubles de la fase orgánica que contenía el P3HB. Finalmente, el extracto obtenido fue recuperado y secado en horno a 60 °C durante 24 h para obtener el polímero seco y determinar su rendimiento.



Created in BioRender.com

Figura 9 Metodología resumida para la obtención de P3HB mediante *A. vinelandii* OP. El proceso incluye la recuperación de biomasa celular, extracción del polímero mediante cloroformo, separación de residuos celulares y recuperación del P3HB seco.

5.5 Producción de P3HB en diferentes fases de crecimiento

La biomasa se determinó según lo descrito en Peña et al., 2014 por peso seco celular donde se tomaron de cada biorreactor, muestras de 15 mL de *Azotobacter vinelandii* OP, al inicio y al final de la fermentación, posterior, se tomaron 0.1 g de biomasa con 5 mL de cloroformo y se centrifugo a 4300 rpm durante 10 minutos, para después hacer peso constante. Finalmente, se tomaron 1 mL de muestra y se midió la absorbancia a 590 nm en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis). La metodología resumida y los medios de cultivo utilizados durante la experimentación, puede observarse en la Figura 10 donde se resume la evaluación del crecimiento de *Azotobacter vinelandii* OP se realizaron mediante cultivos en diferentes fuentes de carbono. Inicialmente, el microorganismo fue activado en medio PYS y posteriormente inoculado en los medios experimentales conteniendo sacarosa o glicerol como fuente de carbono. Los cultivos fueron incubados bajo las condiciones establecidas y el crecimiento celular fue monitoreado mediante mediciones

de densidad óptica a 600 nm. La biomasa obtenida fue utilizada posteriormente para determinar la producción de P3HB bajo las condiciones evaluadas.

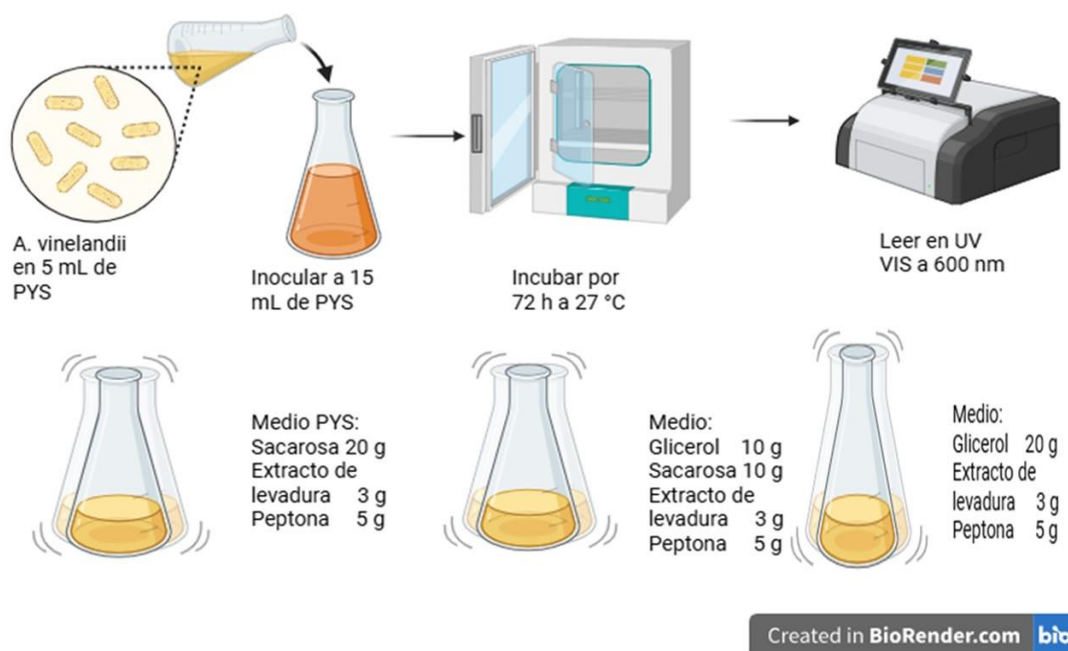


Figura 10 Metodología resumida para el crecimiento de *A. vinelandii* OP usando diferentes fuentes de carbono.

5.6 Extracción y cuantificación de P3HB (ácido polihidroxibutírico)

Se usó la metodología descrita por Hejna et al., (2016) para extraer y purificar P3HB de los cultivos. Se resuspendieron 0.1 g de biomasa seca en 5 mL de cloroformo, para la ruptura de lisis se utilizó el vortex para después centrifugar la muestra a 4300 rpm por 10 minutos. Posterior a, se llevó a la incubadora por una hora a 28 °C. Finalmente, el polímero recuperado se secó en un horno (FROILAB, AP60/156) a 60 °C durante 24 h.

Objetivo específico 3: Estimar la producción el polihidroxibutirato mediante el sistema de fermentación electroestimulada utilizando glicerol residual.

A partir de las condiciones del sistema de fermentación electroestimulada que condujeron a la mayor producción de P3HB, se estableció un experimento para evaluar la capacidad del sistema para tratar el efluente de la producción de biodiesel a la vez que se genera un producto de valor agregado como el P3HB.

5.7 Producción de polihidroxibutirato a partir de glicerol.

El glicerol residual proveniente del efluente del proceso de producción de biodiesel que se realiza en la planta de biodiesel de la Facultad de Química se utilizó como fuente de carbono para la producción de P3HB mediante el sistema de fermentación electroestimulada. El glicerol residual se acondicionó para poder ser utilizado como fuente de carbono en la fermentación usando el sistema de fermentación electroestimulada. Para ello, el glicerol residual se filtró con una malla metálica para eliminar partículas sólidas de gran tamaño, posteriormente se ajustó a pH 7.0 con 0.1 M HCl. Con el glicerol residual acondicionado se evaluaron dos diluciones del glicerol residual, una con 10 g L⁻¹ de glicerol residual con 10 g L⁻¹ de sacarosa y otra con 20 g L⁻¹ de glicerol residual suplementado con 3 g L⁻¹ de extracto de levadura y 5 g L⁻¹ de peptona como medio para la fermentación con los parámetros establecidos en los objetivos previos. El tratamiento que produjo más P3HB se utilizó para evaluar los parámetros de calidad del efluente de la producción de biodiesel utilizado como medio de fermentación. El P3HB producido será caracterizado estructuralmente.

Objetivo específico 4: Cuantificar los parámetros de calidad del efluente de la producción de biodiesel tratado mediante *Azotobacter vinelandii* OP usando el sistema de fermentación electroestimulada.

Al sistema de fermentación electroestimulada se le evaluó su capacidad de tratamiento de aguas residuales. Para ello, el tratamiento que produjo más P3HB se utilizó para evaluar los parámetros de calidad del efluente de la producción de biodiesel utilizado como medio de fermentación. Para ello se comparó la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y pH del medio de cultivo o influente, así como el medio fermentado o efluente.

5.8 Cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Se utilizó la metodología establecida en la NMX-AA-030/2-SCFI-2011 se usaron 10 mL de muestra y se le adicionaron 0.4 g de sulfato de mercurio y 5 mL de dicromato de potasio. Se adicionaron 15 mL de sulfato de plata-ácido sulfúrico. Se digirió durante 2 horas a una temperatura de 150 °C. Se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10s UV-Vis).

5.9 Determinación de los sólidos suspendidos volátiles (SSV).

Se utilizó la metodología de la NOM-AA-034-SCFI-2015, primero se tomó una alícuota y se llevó a peso constante una cápsula de porcelana y papel filtro, el peso de ambos se registró como m_3 .

Se pesaron las cápsulas y se repitió el ciclo horno-dsecador hasta tener una diferencia ≤ 0.0005 g en dos pesadas seguidas, el resultado se registra como m_4 .

Usando la Ecuación 5, se obtuvo la cantidad de sólidos suspendidos volátiles:

$$STV = \frac{(m_3 - m_4)}{V} 1\,000\,000 \quad (1)$$

donde STV son los sólidos totales volátiles en mg/L, m_3 es la masa obtenida de la cápsula con el residuo después de que este pasó por la evaporación en g, m_4 es la masa de la cápsula que tiene el residuo después de que este se calcinará expresado en g y V es el volumen de la muestra expresada en mL siguiendo lo establecido por la NOM-AA-034-SCFI-2015.

5.10 Determinación del pH

Siguiendo el procedimiento presentado en la NMX-AA-008-SCFI-2016, se sumergió el electrodo en la muestra de interés, se agitó con suavidad y se esperó hasta que la lectura de pH se estableció y se registraron al menos tres lecturas repetitivas, entre cada medición se enjuagó el electrodo de pH con agua destilada.

Se reportó el promedio que se obtuvo acompañado del dato de la temperatura.

5.11 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue factorial completa, donde se estudiaron las interacciones de 3 variables con 3 repeticiones por experimentación. Las variables fueron el voltaje, área superficial de los electrodos relacionada con la cantidad de los mismos en el medio y la concentración del mediador rojo neutro. Se contó con una variable de control, que fue una fermentación tradicional sin la aplicación de voltaje y sin la presencia del mediador, como se puede apreciar en la Tabla 4. Finalmente, las variables de respuesta fueron el rendimiento en masa del polihidroxibutirato relacionado con el sustrato consumido y la biomasa generada.

Cuadro 4 Variables de estudio del sistema de electrofermentación.

Factor	Nivel		
Voltaje	0 V	0.75 V	1.5 V
Mediador	0 μM	87.5 μM	175 μM
Área superficial de los electrodos	65.32 cm^2 y		195.96 cm^2

5.12 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la normalidad y homocedasticidad de los datos, con el fin de determinar si estos presentaban una distribución normal o no paramétrica. Posteriormente, se efectuó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$), para identificar diferencias significativas entre las variables evaluadas. Finalmente, se aplicó la prueba t de Student para determinar diferencias significativas entre las medias de los tratamientos propuestos. Se empleó un nivel de confianza del 95 % y un margen de error del 5 %. Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas Excel y Minitab 9, mientras que la elaboración de los gráficos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 8.

5.13 Consideraciones éticas

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con las prácticas de laboratorio, siguiendo la normativa correspondiente establecida por el Comité de Seguridad e Higiene de la Facultad de Química. Cabe mencionar que en este trabajo no se realizaron ensayos con humanos o animales. Se sometió al Comité de bioética y se obtuvo un dictamen de exento con número de oficio CBQ25/014.

6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Objetivo específico 1: Determinar la correlación entre la aplicación de distintos voltajes, área superficial de electrodos y concentración del mediador sobre la producción de polihidroxibutirato microbiano en un sistema de fermentación electroestimulada en experimentos modelo.

En el Cuadro 5 se muestra el efecto de diferentes voltajes (0, 0.75 y 1.5 V), concentraciones de rojo neutro (0, 87.5 y 175 μM) y área superficial de electrodos (65.32 cm^2 y 195.96 cm^2) sobre la producción de polihidroxibutirato por *Azotobacter vinelandii* OP después de 48 h de fermentación electroestimulada.

Los resultados muestran que la combinación de 0.75 V, 87.5 μM de rojo neutro y 195.96 cm^2 de área superficial de los electrodos, presentó la mayor producción de P3HB con 2.245 ± 0.019 g/L. En contraste, los tratamientos sin mediador o con concentraciones elevadas de rojo neutro presentaron menores rendimientos. Asimismo, se observó que el pH final de los tratamientos disminuyó respecto al valor inicial (7.12), alcanzando valores entre 4.20 y 4.99.

Cuadro 5 Rendimiento en la producción de P3HB en un sistema de electrofermentación.

Área superficial electrodos	Mediador rojo neutro (μM)	Voltaje (V)	P3HB (g/L)	pH
65.32 cm ²	0	0	1.79 $\pm$ 0.19 ^{CDE}	4.42 $\pm$ 0.127
		0.75	1.27 $\pm$ 0.004 ^J	4.77 $\pm$ 0.096
		1.5	1.57 $\pm$ 0.012 ^{FGH}	4.59 $\pm$ 0.168
	87.5	0	1.62 $\pm$ 0.011 ^{EFG}	4.43 $\pm$ 0.052
		0.75	2.05 $\pm$ 0.012 ^{AB}	4.36 $\pm$ 0.0057
		1.5	1.73 $\pm$ 0.006 ^{DEF}	4.45 $\pm$ 0.0057
	175	0	1.27 $\pm$ 0.003 ^J	4.73 $\pm$ 0.096
		0.75	2.08 $\pm$ 0.008 ^{AB}	4.20 $\pm$ 0.0057
		1.5	1.56 $\pm$ 0.014 ^{FGH}	4.52 $\pm$ 0.182
195.96 cm ²	0	0	1.89 $\pm$ 0.18 ^{BCD}	4.39 $\pm$ 0.12
		0.75	1.39 $\pm$ 0.023 ^{HJ}	4.99 $\pm$ 0.025
		1.5	1.95 $\pm$ 0.039 ^{BC}	4.42 $\pm$ 0.025
	87.5	0	1.31 $\pm$ 0.019 ^{IJ}	4.42 $\pm$ 0.005
		0.75	2.245$\pm$0.019^A	4.38$\pm$0.034
		1.5	1.52 $\pm$ 0.011 ^{GHI}	4.26 $\pm$ 0.005
	175	0	1.79 $\pm$ 0.0142 ^{CDE}	4.332 $\pm$ 0.054
		0.75	1.80 $\pm$ 0.091 ^{CDE}	4.34 $\pm$ 0.054
		1.5	1.78 $\pm$ 0.01 ^{CDE}	4.35 $\pm$ 0.05

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

El análisis de comparación múltiple de Tukey (95 %) mostró diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. La mayor producción de P3HB se obtuvo con un área superficial de electrodo de 195.96 cm², 87.5 μM de rojo neutro y 0.75 V (2.245 g/L), ubicándose en el grupo estadístico A. Este resultado indica que la combinación de los factores evaluados favoreció la producción del biopolímero

En la Figura 11 se observa que la aplicación de 0.75 V en presencia de 87.5 μM de rojo neutro incrementó significativamente la producción de P3HB respecto al control sin voltaje. Bajo estas condiciones, la producción aumentó aproximadamente 2.6 veces en comparación con la fermentación tradicional que fue el tratamiento control. Sin embargo, al incrementar la concentración del mediador a 175 μM , el efecto positivo de la electroestimulación disminuyó.

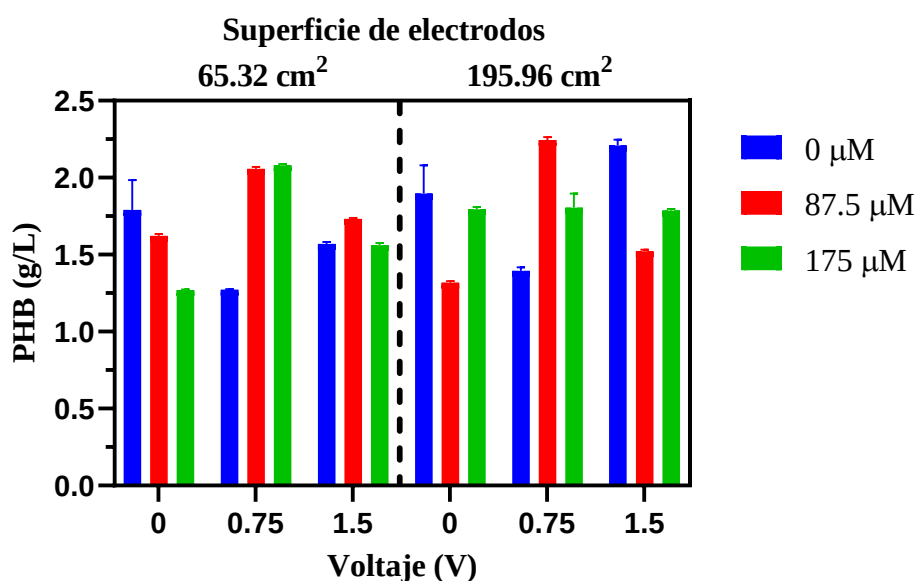


Figura 11 Efecto de la concentración de rojo neutro (0, 87.5 y 175 μM), el voltaje (0, 0.75 y 1.5 V) sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 48 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada.

Los resultados demuestran que una concentración óptima de mediador redox puede favorecer la transferencia extracelular de electrones y redirigir el metabolismo hacia la síntesis de P3HB. El rojo neutro probablemente facilitó la regeneración de equivalentes reductores intracelulares como NADH/NAD⁺, promoviendo así las rutas metabólicas relacionadas con la acumulación del P3HB (Lai & Lan., 2021).

Los resultados obtenidos muestran una coincidencia con lo reportado por Nishio et al., (2014), en donde observaron un incremento del 60 % en la producción de P3HB mediante electrofermentación utilizando *Ralstonia eutropha* y mediadores redox compatibles con el

sistema electroquímico. De manera similar, Lai & Lan., (2021) reportaron un incremento del 30 % en la acumulación de P3HB utilizando rojo neutro y azul de metileno como mediadores en sistemas bioelectroquímicos.

La mejora presentada en la producción de P3HB puede atribuirse a la modulación metabólica inducida por la electroestimulación, la que favorece el flujo de electrones hacia rutas reductivas relacionadas con la biosíntesis de P3HB (Nishio et al., 2013; Kracke et al., 2015; Lai & Lan., 2021). También, los resultados apuntan que *Azotobacter vinelandii* OP posee una capacidad para interactuar con sistemas electroquímicos, mostrando un potencial como microorganismo electroactivo en condiciones controladas de electrofermentación.

Los resultados muestran que la combinación de 0.75 V, 87.5 μ M de rojo neutro y 195.96 cm² de área superficial de electrodos favoreció significativamente la acumulación del biopolímero, alcanzando la mayor producción de P3HB.

Asimismo, se observó que concentraciones elevadas del mediador disminuyen el efecto positivo de la electroestimulación, lo que sugiere alteraciones en el equilibrio redox intracelular. Por lo tanto, los resultados permiten establecer que existe una combinación óptima de parámetros electroquímicos capaz de modular el metabolismo microbiano y favorecer rutas relacionadas con la biosíntesis de P3HB (Rosenbaum & Franks., 2014; Kracke et al., 2015; Lai & Lan., 2021).

Ecuación de regresión

$$\begin{aligned}
 \text{PHB (g/L)} = & 1.70376 - 0.04213 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)}_{65.32} \\
 & + 0.04213 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)}_{195.96} - 0.0582 \text{ RN (}\mu\text{M)}_{0.0} \\
 & + 0.0457 \text{ RN (}\mu\text{M)}_{87.5} + 0.0125 \text{ RN (}\mu\text{M)}_{175.0} - 0.0885 \text{ Voltaje (V)}_{0.00} \\
 & + 0.1052 \text{ Voltaje (V)}_{0.75} - 0.0167 \text{ Voltaje (V)}_{1.50} \\
 & - 0.0597 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{65.32} 0.0 \\
 & + 0.0966 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{65.32} 87.5 \\
 & - 0.0369 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{65.32} 175.0 \\
 & + 0.0597 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{195.96} 0.0 \\
 & - 0.0966 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{195.96} 87.5 \\
 & + 0.0369 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)}_{195.96} 175.0 \\
 & - 0.0122 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 0.00 \\
 & + 0.0361 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 0.75 \\
 & - 0.0239 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 1.50 \\
 & + 0.0122 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 0.00 \\
 & - 0.0361 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 0.75 \\
 & + 0.0239 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 1.50 \\
 & + 0.2866 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{0.0} 0.00 - 0.4178 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{0.0} 0.75 \\
 & + 0.1313 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{0.0} 1.50 - 0.1910 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{87.5} 0.00 \\
 & + 0.2968 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{87.5} 0.75 - 0.1057 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{87.5} 1.50 \\
 & - 0.0956 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{175.0} 0.00 + 0.1211 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{175.0} 0.75 \\
 & - 0.0255 \text{ RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{175.0} 1.50 \\
 & + 0.0607 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 0.0 0.00 \\
 & + 0.0039 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 0.0 0.75 \\
 & - 0.0645 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 0.0 1.50 \\
 & + 0.1100 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 87.5 0.00 \\
 & - 0.1842 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 87.5 0.75 \\
 & + 0.0742 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 87.5 1.50 \\
 & - 0.1706 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 175.0 0.00 \\
 & + 0.1803 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 175.0 0.75 \\
 & - 0.0097 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{65.32} 175.0 1.50 \\
 & - 0.0607 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 0.0 0.00 \\
 & - 0.0039 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 0.0 0.75 \\
 & + 0.0645 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 0.0 1.50 \\
 & - 0.1100 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 87.5 0.00 \\
 & + 0.1842 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 87.5 0.75 \\
 & - 0.0742 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 87.5 1.50 \\
 & + 0.1706 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 175.0 0.00 \\
 & - 0.1803 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 175.0 0.75 \\
 & + 0.0097 \text{ Área superficial (cm}^2\text{)} * \text{RN (}\mu\text{M)} * \text{Voltaje (V)}_{195.96} 175.0 1.50
 \end{aligned}$$

Figura 14 Ecuación de regresión no lineal entre la relación del área superficial de los electrodos (cm²), concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación.

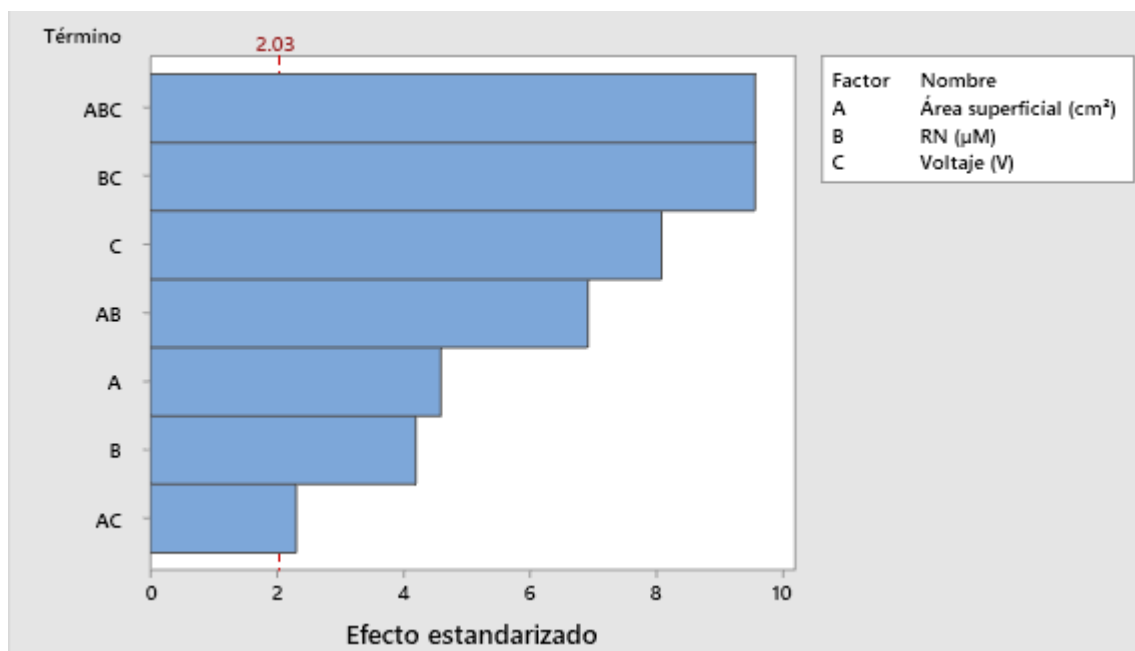


Figura 15 Diagrama Pareto que demuestra la relación del área superficial de los electrodos (cm²), concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación.

El diagrama de Pareto se puede apreciar en la Figura 13 y muestra los efectos estandarizados mostró que las interacciones entre los factores evaluados tuvieron una mayor influencia sobre la producción de P3HB que los efectos individuales. La interacción triple entre el área superficial del electrodo, la concentración de rojo neutro y el voltaje (ABC) presentó el mayor efecto, seguida por la interacción entre rojo neutro y voltaje (BC). Estos resultados indican que la producción de P3HB depende de la interacción simultánea de las condiciones electroquímicas evaluadas, más que del efecto aislado de cada factor. En particular, la influencia del voltaje estuvo condicionada por la concentración del mediador redox y el área disponible para la transferencia electrónica.

La superficie de respuesta se puede apreciar en la Figura 14 y mostró una región de máxima producción de P3HB bajo condiciones de 0.75 V y 87.5 μM de rojo neutro, utilizando un área superficial de electrodo de 195.96 cm², coincidiendo con la condición experimental que presentó el mayor rendimiento

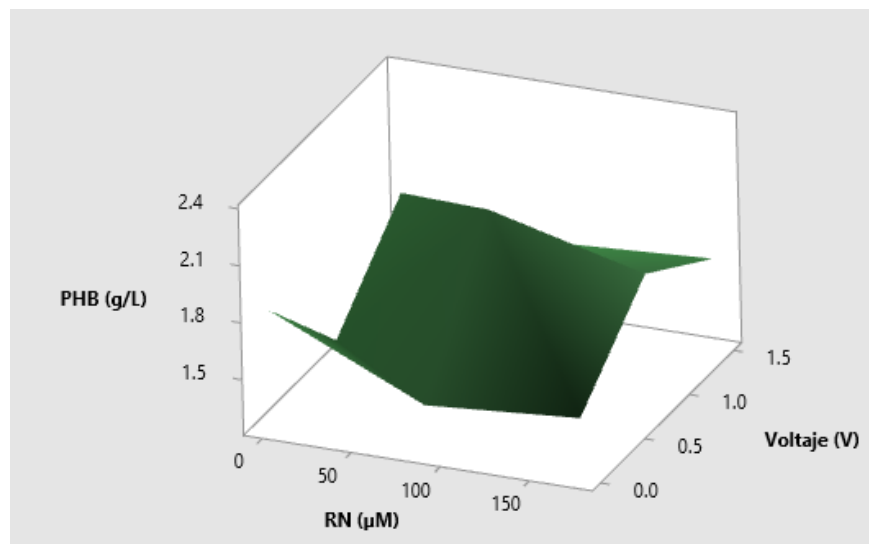


Figura 16 Gráfica de superficie de respuesta que relaciona la concentración de rojo neutro (RN) y voltaje (V) aplicado en el sistema de electrofermentación para la obtención del P3HB (g/L).

La gráfica de superficie de respuesta mostró el efecto combinado del voltaje aplicado y la concentración de rojo neutro sobre la producción de P3HB utilizando un área superficial de electrodo de 195.96 cm². Se observó que la producción del biopolímero aumentó bajo condiciones intermedias de electroestimulación, alcanzando un máximo alrededor de 0.75 V y 87.5 μM de rojo neutro. La disminución de la producción de P3HB a valores mayores de voltaje o concentraciones elevadas de mediador sugiere que la respuesta metabólica del microorganismo depende de un equilibrio adecuado en las condiciones de transferencia electrónica. Un exceso de estímulo electroquímico podría alterar el estado redox celular o generar condiciones desfavorables para la acumulación del polímero.

Estos resultados coinciden con el análisis de Pareto, donde la interacción entre la concentración de rojo neutro y el voltaje presentó un efecto importante sobre la producción de P3HB, indicando que ambos factores actúan de manera conjunta en la modulación del metabolismo de *A. vinelandii* OP durante la electrofermentación.

Objetivo específico 2: Evaluar la aplicación del sistema de fermentación electroestimulada en diferentes fases de crecimiento microbiano sobre la producción del polihidroxibutirato.

En el Cuadro 6 y en la Figura 15 se observa la producción de P3HB que se obtuvo cuando se aplica el sistema de electrofermentación en diferentes etapas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* OP. El tratamiento de 0.75 V, área superficial de los electrodos de 195.96 cm² y 87.5 µM de mediador rojo neutro que se aplicó durante 40 h al inicio de la fase exponencial (hora 32), es decir, en las primeras 32 horas no se aplicó voltaje y se presentó la mayor producción de P3HB con 4.50 ± 0.33 g/L. Por otra parte, cuando el voltaje se aplicó al final de la fase exponencial (hora 72), aquí la experimentación se dejó 96 horas, a este tratamiento se le aplicaron 24 horas de voltaje y la producción disminuyó hasta 1.32 ± 0.41 g/L.

Cuadro 6 Aplicación del sistema de fermentación electroestimulada en diferentes puntos de la fase exponencial.

Tratamiento	P3HB (g/L) a las 72 h	P3HB (g/L) por hora
40 h con 0.75 V las primeras 32 horas no se aplicó voltaje	4.50±0.33	0.062±0.33
18 h con 0.75 V las primeras 54 horas no se aplicó voltaje	3.54±0.2	0.049±0.2
24 h 0.75 V, durante las 72 horas del tratamiento no se aplicó voltaje y el experimento duro 96 horas, es decir, se le aplicaron 24 horas de voltaje	1.32±0.41	0.014±0.2

Los resultados indican que al aplicar voltaje al inicio de la fase exponencial (hora 36) hay una acumulación significativa de P3HB. Puede deberse a que durante la fase exponencial las células tienen mayor actividad metabólica y capacidad de transferir electrones, permitiendo que el sistema de fermentación electroestimulada module la síntesis del biopolímero.

Asimismo, se observó que la producción de P3HB disminuye cuando el voltaje se aplica en etapas más avanzadas del crecimiento celular. Puede relacionarse con que, en la fase estacionaria, se disminuye la actividad metabólica y el aprovechamiento de equivalentes reductores intracelulares (Khanna & Srivastava., 2005; Mathew et al., 2015; Li et al., 2025).

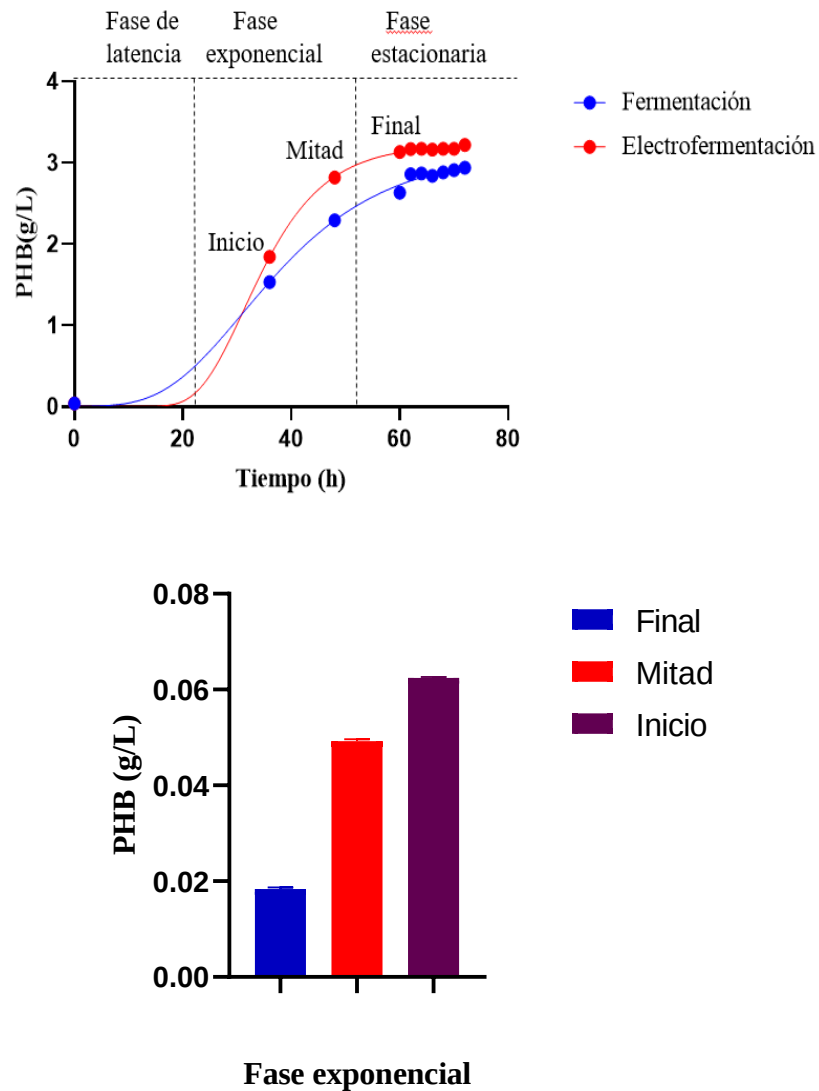


Figura 15 Producción de P3HB (g/L) en diferentes etapas de la fase exponencial de *A. vinelandii* OP.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Mathew et al., (2015), quienes hacen mención de al aplicar estímulos eléctricos en etapas tempranas del crecimiento microbiano hay un favorecimiento en la modulación metabólica y se acelera la acumulación de

compuestos intracelulares. Asimismo, en el estudio de Li et al., (2025) se reporta que hay un aumento en la producción de etanol del 12.8 % usando 1 V en comparación con la hora 12 y la 30. Se determinó que la aplicación de voltaje durante el inicio de la fase exponencial favorece significativamente la acumulación de P3HB, alcanzando producciones de hasta 4.50 ± 0.33 g/L en 72 horas.

Los resultados sugieren que la etapa fisiológica del microorganismo influye sobre la respuesta metabólica durante la fermentación electroestimulada. La mayor producción observada al inicio de la fase exponencial presenta que las células tienen mayor capacidad de transferencia de electrones y regeneración de equivalentes reductores durante etapas de elevada actividad metabólica, favoreciendo así la biosíntesis de P3HB (Chen., 2012; Mathew et al., 2015; Kracke et al., 2015).

Objetivo específico 3: Estimar la producción y caracterizar estructuralmente el polihidroxibutirato mediante el sistema de fermentación electroestimulada utilizando glicerol residual.

En la Figura 16 se presenta el crecimiento de *A. vinelandii* OP bajo condiciones de fermentación tradicional (FT) y electrofermentación (EF). El sistema de fermentación electroestimulada seleccionado para las experimentaciones posteriores fue aquel que promovió la mayor producción de P3HB, correspondiente a las condiciones de 0.75 V, una concentración de rojo neutro de 87.5 μM y un área superficial de electrodos de 195.96 cm^2 . Asimismo, de acuerdo con los resultados obtenidos en el objetivo específico 2, se determinó que la aplicación de voltaje desde el inicio del proceso fermentativo favorece la acumulación de P3HB; por lo tanto, los experimentos subsecuentes se realizaron bajo estas condiciones. Los resultados muestran que *A. vinelandii* OP presentó un crecimiento exponencial a partir de las 32 h de incubación en ambos sistemas. Sin embargo, el sistema de electrofermentación favoreció el crecimiento celular, reduciendo el tiempo de duplicación a 6.83 h, mientras que en la fermentación tradicional fue de 7.29 h.

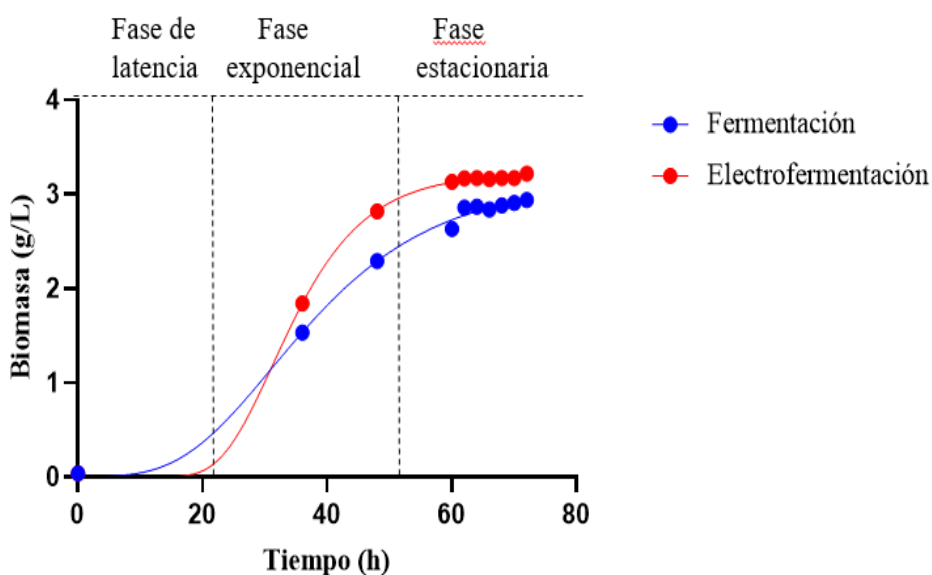


Figura 16 Crecimiento de *Azotobacter vinelandii* OP en medio PYS durante 72 horas, 28 °C, 220 rpm, donde se puede observar el crecimiento en fermentación tradicional (FT) y en el sistema de electrofermentación (EF), donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador

rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

Los resultados apuntan a que la aplicación de voltaje favorece la actividad metabólica del microorganismo, posiblemente porque hay una mejora en la transferencia extracelular de electrones. La disminución en el tiempo de duplicación indica que la electrofermentación puede acelerar la cinética de crecimiento microbiano y, así, se favorece la síntesis de metabolitos intracelulares como el P3HB (Rabaey & Rozendal., 2010; Rosenbaum & Franks., 2014; Kracke et al., 2015).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Morales., (2014), quien observó que *Azotobacter vinelandii* presenta una fase logarítmica entre las 48 y 60 h de incubación. Asimismo, Moreno et al., (1985) reportaron que utilizando un medio Burk, *A. vinelandii* ATCC 12837 inicia su fase exponencial a partir de las 48 h de cultivo.

El crecimiento de *A. vinelandii* ha sido estudiado bajo condiciones aeróbicas debido a que es un microorganismo aerobio obligado. Sin embargo, existen pocos estudios relacionados con su comportamiento en sistemas de electrofermentación. Nishio et al., (2014) reportaron que la aplicación de electroestimulación incrementó hasta en un 60 % la producción de P3HB en *Ralstonia eutropha*, lo que respalda el efecto positivo observado en el presente estudio.

En la Figura 17 se muestra el efecto del tiempo sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP utilizando sacarosa como fuente de carbono bajo condiciones de fermentación tradicional y electrofermentación. El sistema electroestimulado operado a 0.75 V, 87.5 μ M de rojo neutro y 195.96 cm² de área superficial de electrodos presentó una producción de P3HB 1.3 veces mayor respecto a la fermentación tradicional.

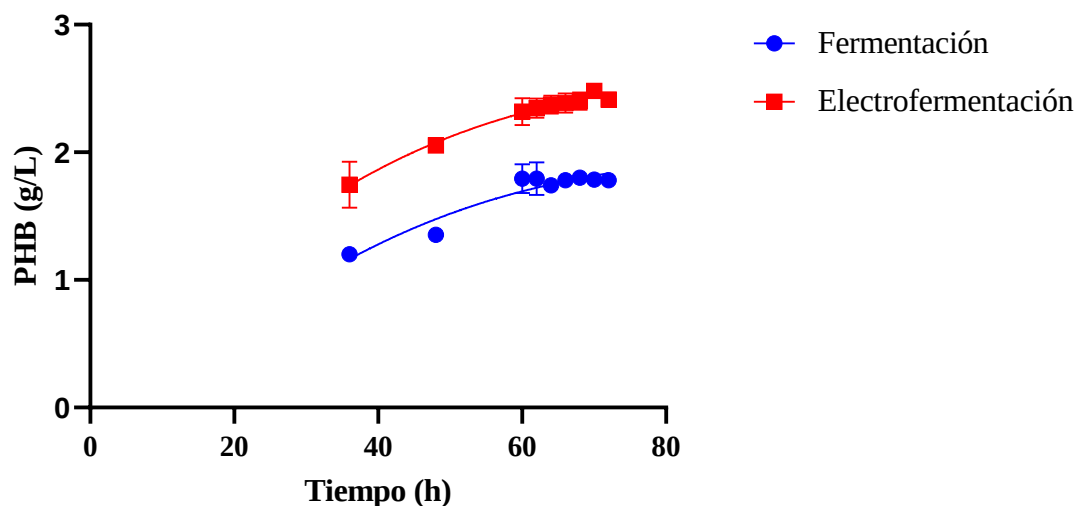


Figura 17 Efecto del tiempo sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional con sacarosa como fuente de carbono, 220 rpm, 28 °C y utilizando medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

El incremento en la acumulación de P3HB bajo condiciones de electrofermentación puede atribuirse al efecto del mediador redox sobre la transferencia de electrones. El rojo neutro facilitó el transporte extracelular de electrones y favoreció la regeneración de cofactores reductores como NADH/NAD⁺, así puede dirigir el metabolismo hacia rutas biosintéticas asociadas con la acumulación del biopolímero. Además, la aplicación de voltaje pudo contribuir a mantener un balance redox intracelular más favorable para la síntesis de P3HB. Diversos estudios han reportado que los sistemas bioelectroquímicos permiten modulares rutas metabólicas relacionadas con compuestos de reserva intracelular (Rabaey & Rozendal., 2010; Rosenbaum & Franks., 2014; Kracke et al., 2015; Lai & Lan., 2021).

Los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Díaz et al., (2016), quienes observaron acumulaciones de P3HB superiores al 60 % del peso seco celular en periodos de fermentación cercanos a las 72 h, en el caso de la experimentación de este proyecto es del 71 %. De igual forma, Dujjanutat et al., (2024) reportaron una producción máxima de 4 g/L de

P3HB después de 48 h de fermentación. En el caso de la experimentación, el porcentaje de acumulación es del 71 %.

Finalmente, en la Figura 18 se presentan fotografías (o imágenes) de los biopolímeros de polihidroxibutirato obtenidos durante la fermentación electroestimulada y en la Figura 19 se puede observar las fotografías de los biopolímeros de P3HB con fermentación tradicional. Los biopolímeros obtenidos mediante fermentación electroestimulada (electrofermentación) presentan una apariencia más homogénea, así como una mayor dureza y menor fragilidad. En contraste, los biopolímeros producidos mediante fermentación tradicional muestran una estructura más frágil y quebradiza.



Figura 18 Biopolímero de P3HB obtenido durante la fermentación electroestimulada.



Figura 19 Biopolímero de P3HB resultante de la fermentación tradicional.

En el Cuadro 7 se presenta la producción de P3HB obtenida utilizando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de fermentación tradicional y electrofermentación. Los resultados muestran que la sacarosa fue la fuente de carbono que favoreció en mayor medida la producción de P3HB, alcanzando 2.4 ± 0.2 g/L en el sistema de electrofermentación.

Cuadro 7 P3HB (g/L) obtenido a las 72 h en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con diferentes fuentes de carbono.

Tratamiento	P3HB (g/L)
Fermentación sacarosa	1.78±0.02
Electrofermentación sacarosa	2.41±0.03
Fermentación glicerol grado reactivo	0.5±0.009
Electrofermentación glicerol grado reactivo	1.46±0.08
Fermentación sacarosa y glicerol grado reactivo	0.21±0.018
Electrofermentación sacarosa y glicerol grado reactivo	0.82±0.016
Fermentación glicerol residual	0.28±0.02
Electrofermentación glicerol residual	0.915±0.013

Por otra parte, los tratamientos con glicerol grado reactivo y glicerol residual también presentaron producción de P3HB, aunque en menor proporción respecto a la sacarosa. En el caso del glicerol residual, la electrofermentación permitió incrementar la producción de P3HB hasta 0.915 ± 0.37 g/L, mientras que la fermentación tradicional únicamente alcanzó $.28 \pm 0.56$ g/L. Los resultados obtenidos muestran que la producción de P3HB fue superior cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono, tanto en fermentación convencional como en electrofermentación. En contraste, los tratamientos con glicerol presentaron menores concentraciones de P3HB, lo cual puede estar relacionado con diferencias en el metabolismo del carbono y el estado redox celular. Aunque el glicerol representa una fuente de carbono atractiva por su disponibilidad y bajo costo, su metabolismo genera una mayor cantidad de equivalentes reductores, principalmente NADH, lo que puede modificar el balance redox intracelular y afectar la distribución del flujo metabólico hacia la síntesis de P3HB.

Asimismo, la combinación de sacarosa y glicerol produjo una disminución en la acumulación de P3HB, posiblemente debido a una redistribución del carbono hacia rutas de crecimiento

celular y mantenimiento metabólico, limitando la conversión del carbono hacia compuestos de almacenamiento. Por ello, la composición del sustrato y la relación carbono/electrones disponibles son factores determinantes para favorecer la síntesis de P3HB en *A. vinelandii*.

En la Figura 20 se observa que el sistema de electrofermentación incrementó significativamente la producción de P3HB en comparación con los controles sin aplicación de voltaje. No obstante, al utilizar glicerol residual como fuente de carbono, el efecto positivo de la electroestimulación disminuyó parcialmente, probablemente debido a la presencia de impurezas asociadas al proceso de producción de biodiésel, tales como metanol, jabones y ácidos grasos libres (Yoshida et al., 2022).

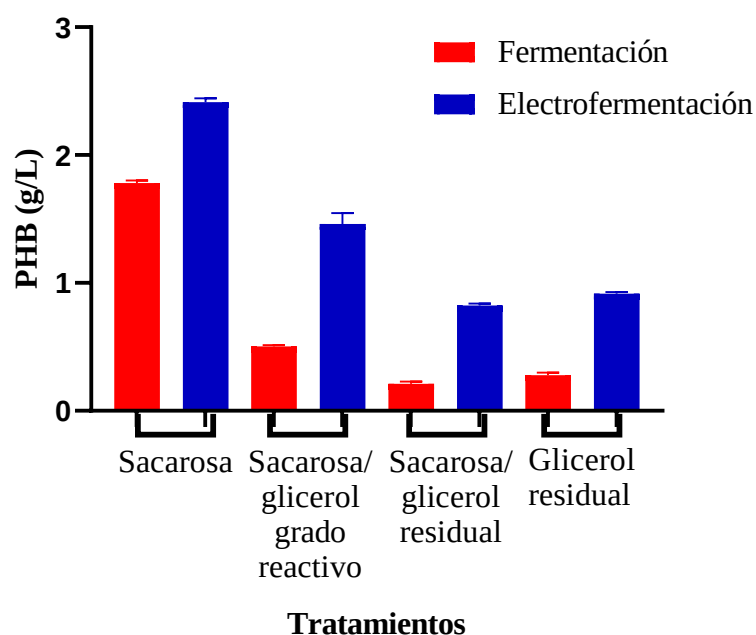


Figura 20 Producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada (electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

A pesar de ello, los resultados demuestran que *Azotobacter vinelandii* OP posee capacidad para utilizar glicerol residual como fuente de carbono, lo cual representa una alternativa biotecnológica importante para el aprovechamiento de residuos agroindustriales bajo un enfoque de economía circular.

Estos resultados coinciden con Yoneyama et al., (2015), quienes reportaron que *A. vinelandii* puede acumular P3HB utilizando glicerol como única fuente de carbono en medios limitados en nitrógeno. Asimismo, Yoshida et al., (2022) demostraron que el uso de glicerol residual permite obtener rendimientos importantes de P3HB, validando el potencial de este subproducto industrial como materia prima biotecnológica. De manera similar, Lai & Lan., (2021) reportaron un incremento del 30 % en la acumulación de P3HB utilizando sistemas de electrofermentación y mediadores redox, atribuyendo este efecto a la optimización de la transferencia extracelular de electrones.

Los resultados demostraron que *Azotobacter vinelandii* OP es capaz de crecer y producir P3HB utilizando este subproducto de la industria del biodiésel, aun en presencia de impurezas asociadas al glicerol residual. Además, el sistema de electrofermentación incrementó significativamente la producción de P3HB respecto a la fermentación tradicional, lo que indica que la aplicación de potencial eléctrico favorece la transferencia extracelular de electrones y mejora el balance redox intracelular relacionado con la síntesis del biopolímero.

Aunque el glicerol no presentó la mayor producción de P3HB bajo las condiciones evaluadas, representa un sustrato de interés debido a su bajo costo y disponibilidad como residuo industrial. Los resultados sugieren que es necesario optimizar parámetros como concentración de glicerol, relación C/N, intensidad eléctrica y condiciones redox para favorecer su conversión hacia P3HB.

Objetivo específico 4: Cuantificar los parámetros de calidad del efluente de la producción de biodiesel tratado mediante *Azotobacter vinelandii* OP usando el sistema de fermentación electroestimulada.

Los valores de pH inicial y final obtenidos durante los tratamientos fermentativos se muestran en el Cuadro 8. Los resultados indican que los tratamientos con sacarosa presentaron una disminución considerable del pH, alcanzando valores finales cercanos a 4.38–4.39, dicha condición, compromete el crecimiento de *A. vinelandii* OP. En contraste, los tratamientos con glicerol residual mantuvieron valores de pH más cercanos a la neutralidad.

Cuadro 8 Valores de pH obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono.

Tratamiento	pH inicial	pH final
Fermentación sacarosa	7.12	4.39±0.04
Electrofermentación sacarosa	7.12	4.38±0.025
Fermentación glicerol residual	7.12	7.48±0.2
Electrofermentación glicerol residual	7.12	5.57±0.26

En la Figura 21 podemos observar la comparativa de los valores finales de pH obtenidos en los tratamientos del sistema de fermentación electroestimulada y la fermentación tradicional con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono.

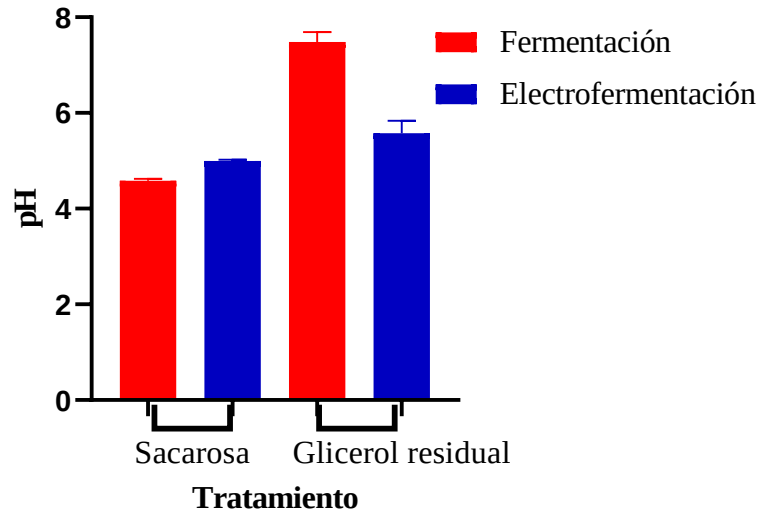


Figura 21 Valores de pH sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada (electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

La disminución del pH en los tratamientos con sacarosa puede atribuirse a la acumulación de ácidos orgánicos generados durante el metabolismo bacteriano. Se ha reportado que *Azotobacter* spp. puede disminuir el pH del medio hasta valores inferiores a 5.0 debido a la oxidación incompleta de carbohidratos (Xafenias et al., 2015).

También se indican que el rango óptimo de crecimiento para *Azotobacter vinelandii* se encuentra entre pH 7.0 y 7.5. Por debajo de pH 6.0 disminuye significativamente la actividad metabólica, la síntesis de proteínas y la capacidad de fijación de nitrógeno (Chen., 2012; León & Rojas., 2015; Moreno et al., 2026).

Comparando los resultados obtenidos, en Xafenias et al., (2015) se utilizó un pH inicial de 6.9 y el pH final fue de 5.7 utilizando un medio con glicerol. Además, en León & Rojas et

al., (2015) se utilizó un pH inicial de 6.9 y el pH final fue de 4.8 utilizando un medio con sacarosa.

En el Cuadro 9 podemos observar los resultados de DQO donde se muestran que los tratamientos con glicerol residual presentaron concentraciones considerablemente mayores respecto a los tratamientos con sacarosa. El tratamiento de electrofermentación con glicerol residual presentó una DQO inicial de 1753.57 ± 7.95 mg/L y una DQO final de 1063.57 ± 6.54 mg/L.

Cuadro 9 Valores de DQO (mg O₂/L) obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono.

Tratamiento	DQO en mg O ₂ /L inicial	DQO en mg O ₂ /L sobrenadante
Medio sacarosa	374.52 ± 6.44	230.23 ± 5.94
Fermentación sacarosa	677.38 ± 3.59	417.86 ± 5.01
Electrofermentación sacarosa	577.85 ± 5.94	189.29 ± 10.30
Medio glicerol	1201.19 ± 7.95	782.61 ± 7.33
Fermentación glicerol residual	1571.66 ± 3.58	824.53 ± 7.04
Electrofermentación glicerol residual	1753.57 ± 7.95	602.142 ± 3.77

La disminución observada en la DQO después del proceso fermentativo indica que *Azotobacter vinelandii* OP fue capaz de consumir parcialmente la materia orgánica presente en el medio. Sin embargo, los valores finales permanecieron por encima de los límites máximos permisibles establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021, los cuales oscilan entre 150 y 200 mg/L dependiendo del tipo de descarga, con excepción de la electrofermentación con sacarosa. En la Figura 22, podemos ver la disminución de los valores

de DQO durante un periodo de 72 horas en fermentación tradicional y electrofermentación utilizando sacarosa y glicerol como fuentes de carbono.

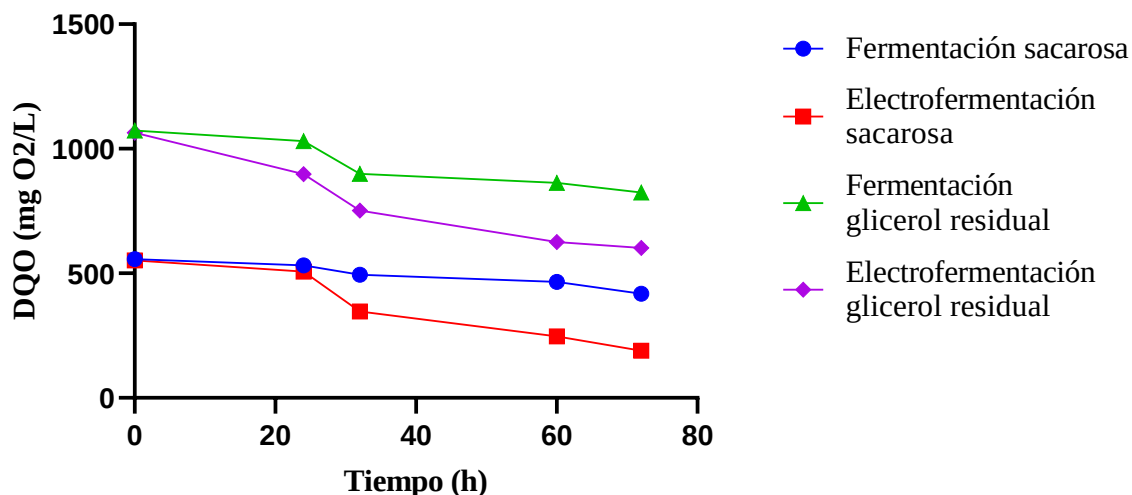


Figura 22 Valores de DQO (mg O₂/L) sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada (electrofermentación) donde el tratamiento tenía un voltaje de 0.75, mediador rojo neutro de 87.5 y 195.96 cm² de área superficial de los electrodos y fermentación tradicional usando diferentes fuentes de carbono, 220 rpm, 28 °C, medio PYS. Los datos representan la media $\pm$ la desviación estándar (n=3).

El glicerol residual proveniente de la industria del biodiésel presenta cargas orgánicas extremadamente elevadas debido a la presencia de glicerol, metanol, jabones y ácidos grasos libres. Tomczak et al., (2025) reportaron valores de DQO cercanos a 1,023,000 mg/L en glicerol industrial, mientras que Mohiyaden et al., (2019) reportaron valores de hasta 1,600,000 mg/L.

Por lo tanto, el aprovechamiento biotecnológico del glicerol residual mediante sistemas de electrofermentación representa una alternativa prometedora para disminuir el impacto ambiental asociado a este residuo industrial y, simultáneamente, obtener productos de valor agregado como el P3HB.

En el Cuadro 10 y en la Figura 23 podemos apreciar resultados de sólidos suspendidos volátiles muestran que los tratamientos con glicerol residual presentaron mayores concentraciones respecto a los tratamientos con sacarosa. El valor máximo se obtuvo en la fermentación con glicerol residual con 28.88 ± 3.38 mg/L.

Cuadro 10 Valores de SSV (mg/L) obtenidos en fermentaciones tradicionales y en el sistema de fermentación electroestimulada con sacarosa y glicerol residual como fuentes de carbono.

Tratamiento	SSV (mg/L)
Medio de cultivo sacarosa	6.66 ± 1.08
Fermentación sacarosa	17.77 ± 3.84
Electrofermentación sacarosa	11.11 ± 3.85
Medio de cultivo glicerol residual	22.22 ± 3.84
Fermentación glicerol residual	28.88 ± 3.38
Electrofermentación glicerol residual	20 ± 6.6

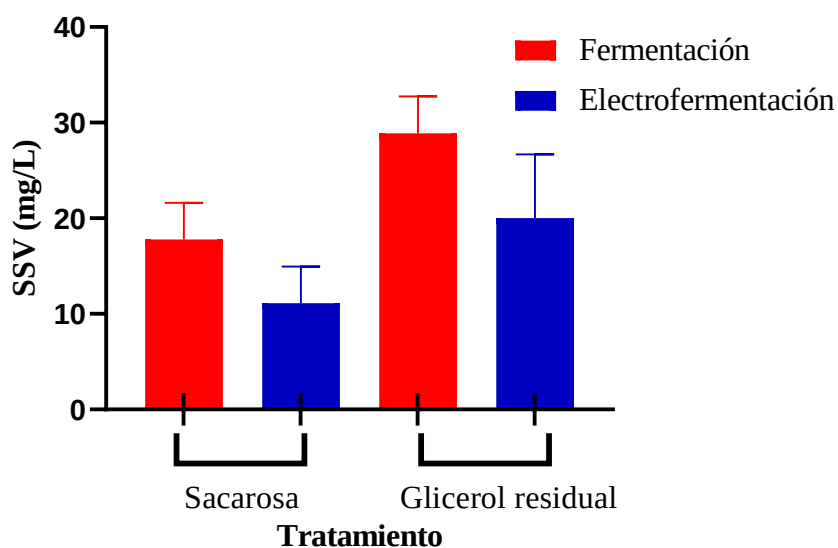


Figura 23 Valores de SSV (mg/L) de diferentes tratamientos sobre la producción de P3HB por *Azotobacter vinelandii* OP a las 72 h bajo el efecto de un sistema de fermentación electroestimulada y fermentación tradicional.

El comportamiento de los SSV estuvo influenciado por el pH del medio. En los tratamientos donde el pH disminuyó por debajo de 6.0, la actividad metabólica y el crecimiento celular se favorecieron, ya que hubo un mayor aprovechamiento de la fuente de carbono y se permitió la acumulación de biomasa y P3HB, por el contrario, con el tratamiento que tuvo un pH mayor a 6.0, donde la producción no fue favorable (Khanna & Srivastava., 2005; Chen., 2012).

Los resultados obtenidos en los Cuadros 8–10 y Figuras 18–20 permitieron cumplir el objetivo específico 4, debido a que se evaluaron parámetros de calidad del efluente tales como pH, demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) después del tratamiento mediante electrofermentación.

La disminución observada en la DQO indica que *Azotobacter vinelandii* OP fue capaz de consumir parcialmente la carga orgánica presente en el glicerol residual. Asimismo, los resultados de SSV y pH muestran que el sistema de electrofermentación favoreció el crecimiento microbiano y contribuyó parcialmente a estabilizar las condiciones del medio fermentativo (Kracke et al., 2015; Yoshida et al., 2022).

Aunque los valores finales de DQO permanecieron por encima de los límites establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021, los resultados demuestran el potencial del sistema de electrofermentación como una alternativa biotecnológica para el tratamiento y valorización de residuos derivados de la industria del biodiésel.

7 CONCLUSIONES

Azotobacter vinelandii OP posee un comportamiento compatible con los sistemas electroquímicos, por lo que puede ser considerada como una bacteria que tiene potencial para ser electroactiva en condiciones controladas de electrofermentación. La aplicación de estímulos eléctricos, en combinación con el mediador redox rojo neutro, demostró tener un efecto significativo sobre la modulación metabólica del microorganismo, favoreciendo así la síntesis de P3HB en comparación con la fermentación tradicional. Asimismo, se comprobó que la etapa fisiológica del microorganismo tuvo un efecto importante sobre la respuesta

metabólica frente a la electroestimulación. La aplicación del voltaje al inicio de la fase exponencial incrementó significativamente la producción de P3HB, lo que sugiere que durante esta etapa existe una mayor actividad metabólica, disponibilidad de equivalentes reductores y capacidad de transferencia extracelular de electrones. Este efecto depende tanto del voltaje como de la concentración del mediador, confirmando que la electroestimulación es una estrategia viable para optimizar la producción de biopolímeros.

A. vinelandii OP fue capaz de consumir parcialmente la carga orgánica presente en el glicerol residual, evidenciando el potencial de la electrofermentación como alternativa biotecnológica para el tratamiento y valorización de residuos derivados de la industria del biodiésel. Aunque los valores finales de DQO permanecieron por encima de los límites establecidos por la NOM-001-SEMARNAT-2021, el sistema mostró capacidad para reducir parcialmente la carga contaminante mientras genera productos de valor agregado

Por tal motivo, integrar la electrofermentación junto con el aprovechamiento de residuos agroindustriales como lo es el glicerol residual, es una propuesta biotecnológica con alto potencial para la eficiencia en la producción de P3HB, reducir los costos del proceso y mitigar los contaminantes provenientes de la industria del biodiesel. Finalmente, la evidencia generada en este estudio profesa las bases para futuras evaluaciones de optimización del sistema, hacerlo escalable y validar el uso de efluentes agroindustriales. Como perspectivas, se propone la caracterización estructural del P3HB, además de analizar el cambio en la expresión genética y metabólica de *Azotobacter vinelandii*.

8 REFERENCIAS

- Adilkhanova, A., Ormantayeva, A., Kaziullayeva, A., Olaifa, K., Eghtesadi, N., Abbas, A. H., & Marsili, E. (2024). Electrofermentation increases concentration of poly γ -glutamic acid in *Bacillus subtilis* biofilms. *Microbial biotechnology*, 17(3), e14426.
- Alami, A.H., Hawili, AA, Tawalbeh, M., Hasan, R., Al Mahmoud, L., Chibib, S., & Rattanapanya, P. (2020). Materials and logistics for carbon dioxide capture, storage, and utilization. *Science of The Total Environment*, 717, 137221.
- Alazaiza, M. Y., Alzghoul, T. M., Ramu, M. B., Amr, S. S. A., Abushammala, M. F., & Nassani, D. E. (2025). Global perspectives on industrial wastewater management: A bibliometric analysis of research output. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 17, 100567.
- Anderson, A. J., Haywood, G. W., & Dawes, E. A. (1990). Biosynthesis and composition of bacterial poly (hydroxyalkanoates). *International journal of biological macromolecules*, 12(2), 102-105.
- Andler, R., Rojas, V., Pino, V., Castro, R. I., Valdés, C., Kumar, V., & Díaz-Barrera, A. (2023). Efficient production of a polyhydroxyalkanoate by *Azotobacter vinelandii* OP using apple residues as promising feedstock. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124626.
- Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. *Marine pollution bulletin*, 119(1), 12-22.
- Barboza, L. G. A., & Gimenez, B. C. G. (2015). Microplastics in the marine environment: current trends and future perspectives. *Marine Pollution Bulletin*, 97(1-2), 5-12.
- Bajracharya, S., Yuliasni, R., Vanbroekhoven, K., Buisman, C. J., Strik, D. P., & Pant, D. (2017). Long-term operation of microbial electrosynthesis cell reducing CO₂ to multi-carbon chemicals with a mixed culture avoiding methanogenesis. *Bioelectrochemistry*, 113, 26-34.

- Batlle-Vilanova, P., Ganigué, R., Ramió-Pujol, S., Bañeras, L., Jiménez, G., Hidalgo, M., & Puig, S. (2017). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction. *Bioelectrochemistry*, 117, 57-64.
- Becker, J., Lange, A., Fabarius, J., & Wittmann, C. (2015). Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. *Current opinion in biotechnology*, 36, 168-175.
- Bian, B., Xu, J., Katuri, K. P., & Saikaly, P. E. (2021). Resistance assessment of microbial electrosynthesis for biochemical production to changes in delivery methods and CO₂ flow rates. *Bioresource technology*, 319, 124177.
- Bhagchandani, D. D., Babu, R. P., Sonawane, J. M., Khanna, N., Pandit, S., Jadhav, D. A., & Prasad, R. (2020). A comprehensive understanding of electrofermentation. *Fermentation*, 6(3), 92.
- Bolognesi, S. (2021). Microbial Electrochemical Technologies for Biofuels and Bioenergy Production.
- Castillo, T., García, A., Padilla-Córdova, C., Díaz-Barrera, A., & Peña, C. (2020). Respiration in *Azotobacter vinelandii* and its relationship with the synthesis of biopolymers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 48, 36-45.
- Chaitanya, N. K., Nair, P. S., Rajpurohit, A., & Chatterjee, P. (2024). Impact of cell voltage on synthesis of caproic acid from carbon dioxide and ethanol in direct current powered microbial electrosynthesis cell. *Bioresource Technology*, 412, 131383.
- Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., Kumar, G., Kim, D. H., Song, Y. C., & Kim, S. H. (2021). Electrofermentation for biofuels and biochemicals production: Current status and future directions. *Bioresource technology*, 323, 124598.
- Chen, X., Jiang, S., Zheng, Z., Pan, L., & Luo, S. (2012). Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 47(8), 1250-1255.

- Choi, O., Kim, T., Woo, H. M., & Um, Y. (2014). Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Scientific reports*, 4(1), 6961.
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS microbiology reviews*, 9(1), 1-27.
- Cosgrove, W. J., & Loucks, D. P. (2015). Water management: Current and future challenges and research directions. *Water resources research*, 51(6), 4823-4839.
- Dalsasso, R. R., Pavan, F. A., Bordignon, S. E., de Aragão, G. M. F., & Poletto, P. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, 85, 12-18.
- Díaz-Barrera, A., Andler, R., Martínez, I., & Peña, C. (2016). Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(4), 1063-1071.
- Dujjanutat, P., Singhaboot, P., & Kaewkannetra, P. (2024). Repeated Fed-Batch Culture Strategy for the Synthesis of Polyhydroxybutyrate (PHB) Biopolymers from Sugar Cane Juice Using *Azotobacter vinelandii*. *Polymers*, 16(22), 3156.
- Du, Z., Li, H., & Gu, T. (2007). A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology advances*, 25(5), 464-482.
- Firman, L. R., Ochoa, N. A., Marchese, J., & Pagliero, C. L. (2018). Treatment of aqueous effluents from the biodiesel industry using membrane technology. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23, e12082.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.

Gong, Z., Yu, H., Zhang, J., Li, F., & Song, H. (2020). Microbial electro-fermentation for synthesis of chemicals and biofuels driven by bi-directional extracellular electron transfer. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4), 304-313.

Gregory, M. R. (2009). Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2013.

Gundlapalli, M., & Ganesan, S. (2025). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Key Challenges in production and sustainable strategies for cost reduction within a circular economy framework. *Results in Engineering*, 26, 105345.

Haupt, D. R., Landwehr, L., Schumann, R., Hahn, L., Issa, M., Coskun, C., & Sievers, M. (2022). A new reactor concept for single-chamber microbial fuel cells and possible anti-fouling strategies for long-term operation. *Microorganisms*, 10(12), 2421.

Hejna, A., Kosmela, P., Formela, K., Piszczyk, Ł., & Haponiuk, J. T. (2016). Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 449-475.

Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. (2016). A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. *Journal of environmental management*, 182, 351-366.

Huamán-Castilla, N. L., Allcca-Alca, E. E., Allcca-Alca, G. J., & Quispe-Pérez, M. L. (2021). Biopolymers produced by *Azotobacter*: synthesis and production, physicomechanical properties, and potential industrial applications. *Scientia Agropecuaria*, 12(3).

IndexBox. (2024). Global biodiesel market overview. Recuperado el 15 de mayo del 2026.

Jiad, M. M., & Abbar, A. H. (2024). Petroleum refinery wastewater treatment using a novel combined electro-Fenton and photocatalytic process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 129, 634-655.

- Jiang, Y., May, H. D., Lu, L., Liang, P., Huang, X., & Ren, Z. J. (2019). Carbon dioxide and organic waste valorization by microbial electrosynthesis and electro-fermentation. *Water research*, 149, 42-55.
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process biochemistry*, 40(2), 607-619.
- Kibria, G. (2024). Contamination of coastal and marine bird species with plastics: Global analysis and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 206, 116687.
- Kumar, R., Ghosh, A. K., & Pal, P. (2020). Sustainable production of biofuels through membrane-integrated systems. *Separation & Purification Reviews*, 49(3), 207-228.
- Kumar, R., Ghosh, A. K., & Pal, P. (2020). Synergy of biofuel production with waste remediation along with value-added co-products recovery through microalgae cultivation: A review of membrane-integrated green approach. *Science of the Total Environment*, 698, 134169.
- Kracke, F., Vassilev, I., & Krömer, J. O. (2015). Microbial electron transport and energy conservation—the foundation for optimizing bioelectrochemical systems. *Frontiers in microbiology*, 6, 575.
- Lai, Y. H., & Lan, J. C. W. (2021). Enhanced polyhydroxybutyrate production through incorporation of a hydrogen fuel cell and electro-fermentation system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(31), 16787-16800.
- León, L. H., & Rojas, L. M. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 6(4), 247-257.
- Li, R., Gu, L., Blank, L. M., Solem, C., & Lai, B. (2026). Electrifying food fermentations to promote sustainability. *Trends in biotechnology*, 44(2), 303-314.
- Liu, C. G., Xue, C., Lin, Y. H., & Bai, F. W. (2013). Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology advances*, 31(2), 257-265.

- Mahato, R. P., Kumar, S., & Singh, P. (2023). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable resources: A review on prospects, challenges and applications. *Archives of Microbiology*, 205(5), 172.
- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., & Yau, S. T. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports*, 5(1), 15713.
- Mitreă, L., Trif, M., Cătoi, A. F., & Vodnar, D. C. (2017). Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1, 3-PD and citric acid production. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 190.
- Modestra, J. A., Babu, M. L., & Mohan, S. V. (2015). Electro-fermentation of real-field acidogenic spent wash effluents for additional biohydrogen production with simultaneous treatment in a microbial electrolysis cell. *Separation and purification technology*, 150, 308-315.
- Mohiyaden, H. A., Sidek, L. M., & Hayder, G. (2019). The performance of attached and suspended growth process in integrated fixed activated sludge. *J. Eng. Sci. Technol*, 14(3), 1751-1763.
- Morales, I. (2014). Generación y caracterización de mutantes de rsmA en *Azotobacter Vinelandii*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/5053>
- Moreno, J., del Moral, A., & Ramos-Cormenzana, A. (1985). Cultivo de *Azotobacter vinelandii* en medios limitados en hierro y molibdeno. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 26(4), 227-237.
- Moreno-Pérez, M. P. A., Sánchez, Y. C., Durán, N. R., & Calderón, M. Á. K. (2026). El ABC de los contaminantes emergentes en la salud humana; guía rápida de comprensión en el siglo XXI. *Dilemas contemporáneos: Educación, Política y Valores*, 2(2)
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in biotechnology*, 34(11), 856-865.

- Moscoviz, R., Trably, E., & Bernet, N. (2018). Electro-fermentation triggering population selection in mixed-culture glycerol fermentation. *Microbial biotechnology*, 11(1), 74-83.
- Nafiu, S. A., Azeez, M. O., AlAqad, K. M., Olarewaju, T. A., Yerima, E. A., & Tanimu, A. (2025). Waste plastic management: Recycling and the environmental health nexus. *Cleaner Materials*, 15, 100291.
- Nishio, K., Kimoto, Y., Song, J., Konno, T., Ishihara, K., Kato, S., & Nakanishi, S. (2014). Extracellular electron transfer enhances polyhydroxybutyrate productivity in *Ralstonia eutropha*. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(1), 40-43.
- ONU. (2024). Informe de los objetivos de desarrollo sostenible 2023: edición especial. Naciones Unidas (ONU).
- OMS. (2022). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva. Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Osman, W. N. A. W., Rosli, M. H., Mazli, W. N. A., & Samsuri, S. (2024). Comparative review of biodiesel production and purification. *Carbon Capture Science & Technology*, 13, 100264.
- Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Cambios en la distribución de masas moleculares de alginato, viscosidad del caldo y morfología de *Azotobacter vinelandii* cultivado en matraces de agitación. *Apply Microbiol Biotechnol.* 48, 510–515.
- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo, A., & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64(1), 39–47.
- Qian, K., Wang, L., Teng, J., & Liu, G. (2025). Strategies and technologies for sustainable plastic waste treatment and recycling. *Environmental Functional Materials*.
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis revisiting the electrical route for microbial production. *Nature reviews microbiology*, 8(10), 706-716.

Ren, F. R., Liu, X. Y., Ji, L. L., Lou, Z. X., & Yuan, X. (2024). The emission reduction effect of industrial wastewater in the pilot city policy of water ecological civilization. *Ecological Indicators*, 159, 111702.

Rosenbaum, M. A., & Franks, A. E. (2014). Microbial catalysis in bioelectrochemical technologies: status quo, challenges and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(2), 509-518.

Secretaría de economía. (2001). Norma mexicana NMX-AA-030/2-SCFI-2011 Análisis de agua - determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba - parte 2 - determinación del índice de la demanda química de oxígeno – método de tubo sellado a pequeña escala

Secretaría de economía. (2016). NORMA MEXICANA NMX-AA-034-SCFI-2015. Análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba.

Secretaría de economía. (2016). NORMA MEXICANA NMX-AA-008-SCFI-2016. Análisis de agua- medición del pH en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- método de prueba.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2021). *NOM-001-SEMARNAT-2021*, Que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores propiedad de la nación. Diario Oficial de la Federación.

Schievano, A., Sciarria, T. P., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., & Pant, D. (2016). Electro-fermentation—merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends in biotechnology*, 34(11), 866-878.

Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., & Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource technology*, 186, 89-96.

- Tomczak, W., Żak, S., Kujawska, A., & Szwast, M. (2025). The Use of Crude Glycerol as a Co-Substrate for Anaerobic Digestion. *Molecules*, 30(17), 3655.
- Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., & Segura, D. (2020). The modification of regulatory circuits involved in the control of polyhydroxyalkanoates metabolism to improve their production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 386.
- Vessa, B., Perlman, B., McGovern, P. G., & Morelli, S. S. (2022). Endocrine disruptors and female fertility: a review of pesticide and plasticizer effects. *F&S Reports*, 3(2), 86-90.
- Vidal-Álvarez, M. (2018). Tratamiento de aguas residuales en México: problemáticas de salud pública y oportunidad de uso de ecotecnologías sustentables. *Rinderesu*, 3, 41-58.
- Virdis, B., Hoelzle, RD, Marchetti, A., Boto, ST, Rosenbaum, MA, Blasco-Gómez, R., & Villano, M. (2022). Electro-fermentation: sustainable bioproductions directed by electricity. *Biotechnology Advances*, 59, 107950.
- Wang, H., Li, H., Lee, C. K., Nanyan, N. S. M., & Tay, G. S. (2024). A systematic review on utilization of biodiesel-derived crude glycerol in sustainable polymers preparation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 261, 129536.
- Wang, B., Wang, Y., & Wang, S. (2021). Improved water pollution index for determining spatiotemporal water quality dynamics: Case study in the Erdao Songhua River Basin, China. *Ecological Indicators*, 129, 107931.
- WaterAid. (2020). El intratable problema de las aguas residuales. Estudio de la operatividad de las plantas de tratamiento de aguas residuales en los países de ingresos bajos y medianos. Notas de políticas. Londres: WaterAid. Recuperado el 02 de febrero del 2025.
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471-482.

- Xafenias, N., Anunobi, M. O., & Mapelli, V. (2015). Electrochemical startup increases 1, 3-propanediol titers in mixed-culture glycerol fermentations. *Process Biochemistry*, 50(10), 1499-1508.
- Yang, F., Hanna, M. A., & Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 13.
- Yang, F., Wang, D., Zhao, L., & Wei, F. (2021). Efficiency evaluation for regional industrial water use and wastewater treatment systems in China: a dynamic interactive network slacks-based measure model. *Journal of Environmental Management*, 279, 111721.
- Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., & Murata, K. (2015). Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. *Bioengineered*, 6(4), 209-217.
- Yoshida, N., Takase, R., Sugahara, Y., Nambu, Y., & Hashimoto, W. (2022). Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen. *Scientific reports*, 12(1), 8032.
- Zheng, T., Li, J., Ji, Y., Zhang, W., Fang, Y., Xin, F., & Jiang, M. (2020). Progress and prospects of bioelectrochemical systems: electron transfer and its applications in the microbial metabolism. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 10.
- Zhu, M., Wang, J., Yang, X., Zhang, Y., Zhang, L., Ren, H., ... & Ye, L. (2022). A review of the application of machine learning in water quality evaluation. *Eco-Environment & Health*, 1(2), 107-116.
- Zurub, R. E., Bainbridge, S., Rahman, L., Halappanavar, S., El-Chaâr, D., & Wade, M. G. (2024). Particulate contamination of human placenta: Plastic and non-plastic. *Environmental Advances*, 17, 100555.

9. ANEXOS

Cuadro 51 Análisis de varianza realizado para evaluar el efecto del área superficial de los electrodos, la concentración de rojo neutro y el voltaje aplicado, así como sus posibles interacciones, sobre la producción de P3HB.

Fuente	MC				Valor F	Valor p
	GL	SC	Ajust.	Ajust.		
Área superficial (cm ²)	1	0.09583	0.095828	21.13	0.000	
RN (μM)	2	0.10136	0.050678	11.18	0.000	
Voltaje (V)	2	0.34522	0.172612	38.07	0.000	
Área superficial (cm ²)*RN (μM)	2	0.25647	0.128236	28.28	0.000	
Área superficial (cm ²)*Voltaje (V)	2	0.03635	0.018173	4.01	0.027	
RN (μM)*Voltaje (V)	4	2.60483	0.651209	143.62	0.000	
Área superficial (cm ²)*RN (μM)*Voltaje (V)	4	0.72679	0.181698	40.07	0.000	
Error	36	0.16323	0.004534			
Total	53	4.33009				

Cuadro 16 Prueba Tukey para el área superficial de los electrodos

Área superficial (cm ²)	N	Media	Agrupación
195.96	27	1.74589	A
65.32	27	1.66164	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 17 Prueba Tukey para la concentración de rojo neutro (RN)

RN (μM)	N	Media	Agrupación
87.5	18	1.74947	A
175.0	18	1.71625	A
0.0	18	1.64557	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 18 Prueba Tukey para el voltaje (V)

Voltaje (V)	N	Media	Agrupación
0.75	18	1.80897	A
1.50	18	1.68704	B
0.00	18	1.61527	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.