



Identificación y enriquecimiento de un consorcio bacteriano en aguas y lodos residuales de origen doméstico para producir biopolímeros del tipo polihidroxialcanoatos PHA's: revisión documental

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, septiembre 2021



*Identificación y enriquecimiento de un consorcio bacteriano en aguas y lodos residuales
de origen doméstico para producir biopolímeros del tipo polihidroxialcanoatos PHA's:
revisión documental*

Andrea Díaz González

Asesora interna

Carolina Guzmán Luna PhD. en Microbiología y Biotecnología

Asesor externo

Iván Cabeza Rojas PhD. en Recursos naturales y Medio ambiente

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, septiembre 2021



Identificación y enriquecimiento de un consorcio bacteriano en aguas y lodos residuales de origen doméstico para producir biopolímeros del tipo polihidroxialcanoatos PHA's:
revisión documental

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORES _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, septiembre 2021

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado con todo mi amor a mi papito, quién ya no está conmigo, pero que desde el cielo me está acompañando, gracias por lo que forjaste en mí, por tu amor y tus conocimientos, “haré que te sientas orgulloso de mi papito”, a mi mamá, Sofi y Sergio, porque sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme llegar hasta este punto y acompañarme en todo momento.

A mi familia por estar siempre, por la paciencia, la compañía y el amor.

A mis asesores, la profesora Carolina Guzmán y el profesor Iván Cabeza por su compromiso y guía en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros.

Y por último, pero no menos importante, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, mi alma mater, el lugar donde me formé y en donde me dieron el impulso y el amor por esta carrera.

Tabla de contenido

	Pág
Resumen.....	10
Introducción.....	11
1. Antecedentes.....	12
2. Marco referencial.....	21
2.1 Polihidroxicanoatos.....	22
2.1.1 Estructura, propiedades y clasificación de los polihidroxicanoatos.....	23
2.1.2 Biosíntesis de los PHA's.....	24
2.1.3 Bacterias productoras de PHA.....	25
2.1.4 Producción de PHA's por cultivos puros.....	27
2.1.5 Producción de PHA por cultivos mixtos.....	27
2.1.6 Aplicaciones industriales de los PHA's.....	28
2.2 Aguas residuales.....	29
2.2.1 Aguas residuales domésticas.....	29
2.2.2 Lodos residuales domésticos.....	30
2.3 Marco conceptual.....	31
3. Diseño metodológico.....	33
3.1 Universo, población, muestra.....	33
3.1.1 Población.....	33
3.1.2 Muestra.....	33
3.2 Hipótesis, variables, indicadores.....	33
3.2.1 Hipótesis.....	33
3.3. Técnicas y procedimientos.....	33
3.3.1 Selección de artículos.....	33
4. Resultados	34
4.1 Análisis de las poblaciones microbianas halladas	34
4.1.1 Fuentes de aislamiento.....	34

4.1.2	Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas.	35
4.1.3	Identificación del gránulo de PHA	35
4.1.4	Bacterias acumuladoras de PHA.....	36
4.1.5	Porcentaje de acumulación de PHA en bacterias con potencial de producción.....	36
4.2	Estrategias de aclimatación de las bacterias.....	38
5.	Discusión.....	39
6.	Conclusiones.....	40
7.	Referencias.....	41

Lista de tablas

	Pág.
Tabla N°1. Propiedades físicas de PHA's y PP.....	23
Tabla N°2. Géneros bacterianos productores de PHA's	26
Tabla N°3. Principales nutrientes limitados para el favorecimiento de la producción de PHA en distintos microorganismos.	26
Tabla N°4. Producción de PHA's por varias bacterias.....	27
Tabla N°5 Producción industrial a nivel global de polihidroxicanoatos.	28
Tabla N°6 Áreas de aplicación de los polihidroxicanoatos.....	29
Tabla N°7 Fuentes de aislamiento de bacterias.....	34
Tabla N°8 Coloraciones para la identificación de gránulo de PHA.....	35
Tabla N°9 Bacterias acumuladoras de PHA y fuente de carbono utilizada.....	38

Lista de figuras

	pág.
Figura 1. Estructura química del PHA	22
Figura 2. Clasificación de los PHA's	23
Figura 3. Vías de síntesis de PHA's	25
Figura 4. Selección de artículos	34
Figura 5. Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas de aguas y lodos residuales.....	35
Figura 6. Bacterias acumuladoras de PHA's.....	36
Figura 7. Porcentaje de acumulación de PHA's en bacterias.....	37

Resumen



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Identificación y enriquecimiento de un consorcio bacteriano en aguas y lodos residuales de origen doméstico para producir biopolímeros del tipo polihidroxicanoatos PHA's:
revisión documental

Los polihidroxicanoatos son biopolímeros acumulados y almacenados por varios tipos de microorganismos en algunos casos bajo condiciones de crecimiento limitadas. Su importancia radica en que sus propiedades son similares a las de los plásticos de origen químico, pudiendo ser una solución a los problemas ambientales que los plásticos tradicionales ocasionan. Muchos países han centrado sus investigaciones en el desarrollo de métodos económicos y viables para la producción de este polímero con el fin de mejorar la calidad de vida de la población. Esta monografía está basada en artículos de investigación, revisiones, trabajos de grado y capítulos de libros enfocados en la producción de polihidroxicanoatos a partir de lodos y aguas residuales, abarcando desde la identificación de bacterias acumuladoras, hasta las estrategias de alimentación. En los resultados obtenidos se encontró que las bacterias Gram negativas tienen una mayor capacidad de acumulación de PHA, al igual que se observaron diferencias significativas en los porcentajes de acumulación, tomando en cuenta la fuente de carbono y las estrategias de alimentación.

Palabras clave: polihidroxicanoatos, consorcio, lodos, bacterias, acumulación.

Andrea Díaz González

Carolina Guzmán Luna, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Iván Cabeza Rojas, Universidad Santo Tomás de Aquino

03 de septiembre de 2021

Objetivos:

Objetivo general:

Analizar estudios relacionados con la identificación y el enriquecimiento de consorcios bacterianos provenientes de aguas y lodos residuales domésticos con capacidad de acumulación de polihidroxicanoatos.

Objetivos específicos:

Comparar metodologías para la selección de la población microbiana con potencial de acumulación de PHA's

Describir los métodos utilizados para la identificación del consorcio microbiano con potencial de acumulación de PHA's

Comparar los resultados encontrados en términos de eficiencia de producción de PHA's a partir de agua residual

Introducción

Según el programa ambiental de las Naciones Unidas se estima que el mundo consume cada año hasta cinco trillones de bolsas plásticas en su mayoría de polietileno, polímero de bajo costo derivado del petróleo, el cual demora en degradarse en el ambiente alrededor de 500 años. Unido a esto, la producción de plásticos a nivel mundial en 2018 fue alrededor de 360 millones de toneladas y solo alrededor del 9% de los residuos plásticos son reciclados. El problema de contaminación ambiental asociada a los plásticos ha tomado notoriedad debido a diversos estudios que puntualizan los efectos negativos que tiene sobre la biota de suelo y agua, además de los impactos asociados a su producción. Debido a esto, se han desarrollado diferentes alternativas sostenibles para suplir la demanda de productos plásticos, entre ellas la producción de polímeros a partir de materias primas renovables.

Estos plásticos biodegradables han sido desarrollados incorporando polímeros naturales en la formulación de los plásticos convencionales o por fermentaciones microbianas. En este último caso, los biopolímeros presentan una gran biodegradabilidad y biocompatibilidad y pueden tener múltiples aplicaciones en el campo clínico (ingeniería de tejidos, compuestos farmacéuticos) y en el área industrial (envolturas de alimentos), como ejemplos. Su degradación en el ambiente, por medio de polimerasas, resulta en la formación de agua y dióxido de carbono.

Estos polímeros obtenidos de forma biotecnológica se han conseguido a partir de diferentes residuos, uno de ellos son las aguas y lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales de origen doméstico.

Por esa razón la producción de PHA's ha tomado fuerza, ya que este presenta características similares a los plásticos convencionales, pero con una marcada ventaja y es que son biodegradables, biocompatibles y producidos por un alto porcentaje de bacterias. De esta forma el uso de biopolímeros resulta en una gran alternativa en beneficio al medio ambiente, ya que estos pueden reemplazar materiales de origen petroquímico.

1. Antecedentes

Los biopolímeros son sintetizados y catabolizados de forma natural por diferentes microorganismos, gran parte de estos son biodegradables y tienen superioridad sobre los plásticos comunes. Los polihidroxicanoatos (PHA's) son uno de los plásticos biodegradables más estudiados, y reconocidos por ser sintetizados en su totalidad de forma biológica, siendo usados como material de reserva en las células microbianas cuando estas están sometidas a estrés ¹ y durante su degradación no hay producción de desechos tóxicos ².

El primer hidroxialcanoato fue descubierto en 1926, por el biólogo e ingeniero agrícola Lemoigne, e identificado en *Bacillus megaterium* como poli 3-hidroxi butirato (P3HB)³. Se conocen diversas bacterias productoras de PHA's, entre las cuales se destacan los géneros de *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, entre otras⁴, las cuales se han utilizado en cultivo puro o en consorcios microbianos.

El uso de consorcios microbianos ha permitido avances importantes en el campo de la microbiología industrial y ambiental^{5, 6}. En el caso de la producción de PHA's se espera que estos cultivos mixtos realicen una mayor conversión de fuentes nutricionales y una mayor acumulación de este polímero.

Identificación de las bacterias acumuladoras de PHA's

La síntesis de PHA's en forma de gránulos al interior del citoplasma, sirve como reserva de carbono y energía para diferentes especies bacterias ⁷. Estos gránulos pueden verse al microscopio realizando diferentes tinciones.

En cuanto a las técnicas de laboratorio utilizadas para la identificación de este polímero la interior del microorganismo, Spiekermann *et al* ⁸, utilizó azul Nilo A y rojo Nilo para detectar ácidos polihidroxicanoicos (PHA's) y ácido 3-valerato. Evaluaron géneros Gram negativos como *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* y

Ralstonia eutropha y géneros Gram positivos como *Bacillus megaterium* y *Rhodococcus ruber*, entre otras bacterias. Los colorantes fueron incorporados en el medio de cultivo y el crecimiento de las bacterias se produjo en presencia de estos. Esto permitió una estimación del PHA durante el experimento y así hacer una discriminación entre cepas PHA-negativas y PHA-positivas.

Huang *et al*⁹ estudió la diversidad y la productividad de bacterias acumuladoras de PHA's presentes en lodos activados de una planta de aguas residuales domésticas. Para el aislamiento de las bacterias, realizó una siembra en superficie de lodo e incubó durante 24 horas a 30°C. Las bacterias productoras fueron teñidas con Sudán negro para luego realizar el análisis molecular que permitiría establecer el género y la presencia del gen *phaC*. Se encontró que aproximadamente el 90% de las colonias aisladas presentaban el gen, lo que indica que un gran porcentaje de las bacterias encontradas acumularon PHA, siendo *Ralstonia* la que presentó un mayor porcentaje de acumulación (41.2%).

En 2013, Ciesielski *et al*¹⁰, caracterizaron los consorcios microbianos productores de PHA presentes en un lodo activado proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. El experimento se realizó a escala de laboratorio en un reactor de lote secuencial (SBR) con un volumen de operación de 5 L. El proceso fue dividido en tres fases: crecimiento de la biomasa, síntesis de PHA en condiciones limitadas de amoníaco y consumo de PHA como fuente de carbono endógena. La mayor concentración de PHA se vio en la fase II alcanzando un 29,7% de peso seco. Las bacterias aisladas fueron identificadas mediante la secuenciación del gen ARNr 16s, encontrando cuatro microorganismos: *Comamonas aquatica*, *Bacillus thuringens*, *Caulobacter fusiformis* y *Aeromonas hydrophila*.

En el año 2014, Mikkili *et al*¹¹, aislaron cepas con alto potencial de acumulación de PHB de una muestra de suelo de aguas residuales. Se identificaron 17 colonias bacterianas con características morfológicas diferentes, de las cuales seis dieron positivo a la coloración Negro Sudán (referenciadas como: 2, 4, 5, 9, 11 y 16). Después del proceso de extracción (centrifugación y liofilización) y la cuantificación de polihidroxibutirato (PHB)

después de 48 horas a 37 grados Celsius, la cepa número 11 presentó la producción más alta de PHB (45.9%).

En 2016 Mohd *et al.*¹², aislaron 23 cepas de corrientes salobres. Para detectar los gránulos de PHA, se realizó una tinción con Sudán negro B a las bacterias productoras de este polímero. Posteriormente, se realizó una confirmación con la tinción azul Nilo a 20 cepas en las que observaron gránulos lipídicos. De la tinción con azul Nilo, solo 10 cepas presentaron la capacidad de producir PHA y 2 fueron identificadas como fuertes productoras de PHA (S1 y L1). En el análisis de PCR se encontró que las cepas S1 y L1 pertenecen a *Pseudomonas sp.* La cepa L1 fue prometedora para la producción de PHA ya que acumuló PHA en aproximadamente un 88,3%. Los PHA's fueron identificados como poli-3-hidroxibutirato (P-3HB).

Lam *et al.*¹³, en el 2017, estudiaron siete cepas de bacterias con capacidad productora de PHA (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas huttiensis*, *Yersinia frederiksenii*, *Aeromonas ichthiosmia* y *Sphingopyxis terrae*) aisladas de varias plantas de tratamiento de residuos en Hong Kong. En los biorreactores inoculados con cultivos puros se obtuvo un rendimiento de 84 mg PHB/g en *Aeromonas ichthiosmia* y 69 mg PHB/g en *Bacillus cereus*. Las eficiencias más altas de PHB se incrementaron en un 55% cuando se inoculó *B. pumilus*.

Crognale *et al.*¹⁴, analizaron la dinámica poblacional bacteriana de una comunidad microbiana mixta (MMC) seleccionada en una planta piloto productora de polihidroxialcanoato (PHA) a partir de la fermentación de fracción orgánica de residuos urbanos y lodos activados de depuradora. Al secuenciar el gen ARNr 16s arrojó una gran variedad de bacterias acumuladoras de PHA que operaron con sustratos reales y sin un control de temperatura. Los cambios en los ácidos grasos volátiles (AGV), en el alimento y la variación de temperatura afectaron la dinámica de las bacterias acumuladoras de PHA durante la operación de la planta. El mayor contenido de PHA se asoció a una MMC que comprende principalmente especies de *Hydrogenophaga*.

Sruamsiri *et al*⁵, en el 2020, enriqueció un cultivo microbiano mixto en condiciones de *feast / famine* utilizando un SBR con acetato como fuente de carbono. El cultivo microbiano mixto pudo acumular un contenido máximo de PHA's de 32,3% (gPHA / gMLSS). La comunidad microbiana analizó utilizando secuenciación del gen 16sr RNA. Los resultados mostraron Alphaproteobacteria (13,26% de secuencias totales), Betaproteobacteria (51,37% de secuencias totales) y Gammaproteobacteria (23,44% de secuencias totales). El género *Thauera* tuvo el mayor crecimiento, representando el 48,88% de la totalidad. La detección de los microorganismos acumuladores de PHA se hizo por medio de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) y un colorante fluorescente, azul de Nilo A. *Thauera* sp constituyó el 80,3% del total de células acumuladoras de PHA.

Giraldo *et al*⁶, en el 2020, identificaron bacterias de dos plantas de tratamiento de aguas residuales industriales en Manizales, estas muestras se cultivaron en medio de sales minerales utilizando glucosa como fuente de carbono en presencia de Rojo Nilo. Las bacterias positivas para la fluorescencia rojo-naranja se traspasaron a medio nutritivo y se les realizó PCR, se confirmó la identidad de 12 de las 24 cepas positivas para PHA, las cuales son prometedoras para dicha producción.

Enriquecimiento de los consorcios bacterianos para aumentar la producción de PHA: aclimatación expresada como acumulación y rendimiento

Además, del tipo de microorganismo, la producción de PHA's está condicionada a parámetros fisicoquímicos como el pH, la concentración de macronutrientes y el tiempo de retención hidráulica, entre otras variables.

De forma general, el proceso de producción de PHA's se puede dividir en tres etapas: una fermentación acidogénica, un enriquecimiento de un cultivo acumulador de PHA's, y la acumulación del polímero de interés^{17, 18,19}.

Esta biosíntesis puede ser favorecida con un exceso de carbono y una limitación de un macronutriente (fósforo o nitrógeno), una limitación con un aceptor de electrón terminal

(por ejemplo, oxígeno) o generando un ambiente de festín y hambruna (*feast and famine*, por sus siglas en inglés) donde los microorganismos experimentan una fuente de carbono soluble sin ninguna limitación de nutriente¹⁸. Entre los precursores más comunes para esta biosíntesis está la glucosa, la fructosa y ácidos orgánicos como ácido acético y propiónico. Estos sustratos determinan la estructura de este polímero incluyendo polihidroxibutirato (PHB), polihidroxivalerato (PHV) y poli-4-hidroxibutirato (P4HB)²⁰.

En una investigación realizada por Coats *et al*¹, se utilizó un consorcio microbiano mixto nativo proveniente de un reactor anaerobio presente en una planta de tratamiento de aguas residuales municipales para la síntesis de PHA. Se realizó una fermentación con un SBR el cual fue operado bajo un esquema anaerobio/aerobio. La síntesis de PHA ocurrió principalmente durante el período aeróbico y siguió un patrón de *feast- famine* (festín-hambruna), consiguiendo una producción del 25% del polímero.

Chua *et al*²² en el 2003, evaluaron la producción de PHA a partir de lodos activados de aguas residuales municipales mediante tres factores operacionales (concentración de pH, acetato, y tiempo de retención del lodo-TRS por sus siglas en inglés). Se encontró que lodos suplementados con acetato podrían acumular PHA hasta un 30% del peso seco, frente a un 20% de acumulación en los lodos sin suplementar. En cuanto al tiempo de retención se evidenció que los lodos con tiempo de retención de 3 días tuvieron mejor capacidad que los lodos con TRS de 10 días. El valor de pH influyó en el comportamiento, en un pH entre 6 y 7 se observó una baja producción de PHA, mientras que a pH de 8 y 9 hubo una alta estimulación en su producción.

Jia *et al*³ (2013), investigaron la dinámica de la síntesis de PHA por un consorcio microbiano en una fermentación simulada con lodo en exceso. El máximo contenido y rendimiento de PHA que se obtuvo con 62,43% del peso seco y 0.71 g/L. El líquido fermentado en presencia de un alto porcentaje de ácidos grasos volátiles favorece un alto contenido de PHA, sin embargo, concentraciones superiores al 30% de carbohidratos y proteínas tienen efecto negativo en la acumulación del PHA, pero promueve el crecimiento celular.

En el 2014 Sakai *et al*⁴, estudia el potencial de acumulación de PHA. Se tomaron nueve muestras de lodos activados de PTAR municipales mediante diversos procesos de tratamiento biológico. El experimento se realizó en lotes de 24 horas alimentados con acetato en condiciones aeróbicas y limitadas en nitrógeno y fósforo donde se observó que el contenido de PHB del lodo activado aumentó de 0-1.3% a 7.9-24%. Los resultados muestran que los lodos activados provenientes de las PTAR pueden acumular hasta el 20% peso seco de PHA sin enriquecimiento. El potencial de acumulación de PHA del lodo activado varió dependiendo de las condiciones operacionales de la PTAR. Además, el número de genes de *phaC* puede ser un indicador del potencial de acumulación de PHA.

En 2016 Liu *et al*²⁵, investigaron la influencia de diferentes patrones de suministro de oxígeno en el rendimiento de poli-β-hidroxi-butirato-PHB y la diversidad de la comunidad bacteriana. Se utilizaron reactores de lote secuencial anaeróbica-aeróbica (SBR₁) y *feast-famine* (F/F) (SBR₂) para el cultivo de lodos activados y la producción de PHB. Las comunidades microbianas mixtas se recolectaron y se analizaron después de 3 meses de cultivo. El rendimiento máximo de PHB fue 64% peso seco en SBR₁ y 53% peso seco en SBR₂.

En el análisis molecular de ARNr 16S se observaron nueve filos bacterianos en el SBR₁ y cuatro en el SBR₂, por lo que el SBR₁ resultó ser más estable para la acumulación del PHB. Entre los filos identificados en el reactor SBR₁ están *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria/Cloroplasto*, *Gemmatimonadetes* y *Nitrospirae*. Por otra parte, los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacteria* fueron identificados en el reactor SBR₂.

En 2016, Inoue *et al*²⁶, aislaron 114 cepas bacterianas de muestras de lodo activado obtenidos de un reactor de secuenciación en *batch* a escala de laboratorio y de dos PTAR de agua residuales. La detección por PCR de los genes *phaC* reveló que el 15% de los aislamientos poseían el gen. Los cuales tuvieron similitud con los genes *phaC* de α- y

β -Proteobacteria y Actinobacteria. Los experimentos de producción de PHA en condiciones aeróbicas y limitadas en nitrógeno mostraron que el 68% de las bacterias aisladas fueron capaces de producir PHA a partir de al menos uno de los seis sustratos utilizados (acetato, propionato, lactato, butirato, glucosa y glicerol). Las caracterizaciones genotípicas y fenotípicas revelaron que el 75% de las bacterias del lodo activado tenían potencial de producción de PHA.

Fradihno *et al*²⁷, evaluaron la probabilidad de usar un régimen permanente de *feast* (fiesta) para seleccionar un cultivo mixto fotosintético con capacidad de acumular PHA. El cultivo fue enriquecido en un ambiente iluminado y con un aporte constante de acetato, lo cual garantizaba el *feast*. Se logró un porcentaje máximo de acumulación de PHA del 60%, el valor más alto alcanzado en su momento comparándolo con estudios anteriores utilizando cultivos mixtos fotosintéticos. Se evidenció en esta estrategia un crecimiento del consorcio microbiano de forma simultánea a la acumulación del polímero.

Más adelante, en el 2018 Munir *et al*⁸, utilizaron co-cultivos puros para identificar el potencial de producción de PHA. Los investigadores utilizaron ácidos grasos volátiles (ácido propiónico y ácido acético) y glucosa como fuente de carbono para evaluar las cepas de *Pseudomonas sp.* ST2 y *Bacillus sp.* CS8 en co-cultivo. Por separado, se obtuvo una producción del 34% por *Pseudomonas sp.* y 24% por *Bacillus sp.* Sin embargo, al combinarse y suministrar una fuente de carbono (glucosa y ácido propiónico) se obtuvo un 35% de PHA. Adicionalmente, obtuvieron co-polímeros en lugar de homopolímeros con mejores propiedades.

En el 2019, se propone un nuevo protocolo para la extracción de PHA'S en cultivos microbianos mixtos por Manina *et al*²⁹, en donde la capacidad de acumulación de PHA del CMM se seleccionó en un SBR alimentado con un efluente que simula las aguas residuales. El mayor rendimiento del polímero se obtuvo al usar NH_4 -Laurato, se tuvieron en cuenta otros factores como lo fue el pretratamiento con NaClO y ácido láurico. Las mejores condiciones para la extracción de PHA de MMC resultaron ser: un

pretratamiento con NaClO a 85 ° C, seguido de un tratamiento con ácido láurico en una relación ácido láurico a biomasa de 2:1.

En el 2020 una investigación llevada a cabo por Lorini *et al*^{β0}, evaluó dos métodos de estabilización para preservar la cantidad de PHA's producida por un consorcio microbiano mixto: secado térmico y acidificación húmeda. Al finalizar la etapa de acumulación se concluyó que ambos conducen a una inhibición total de la biomasa y a la estabilización del PHA. Sin embargo, solo la acidificación de la biomasa rica en PHA permitió recuperar un polímero de alto peso molecular (370–424 kDa).

Sabapathy *et al*^{β1}, en el 2020, estudiaron de la síntesis de PHA a partir de CMM a través de un proceso de 3 etapas utilizando materias primas de corrientes de desechos o modelos que las imitan. Se hizo énfasis en criterios individuales aireación, sustrato y parámetros de bioprocesos para comprender su efecto en la mejora de la producción general de PHA. Adicionalmente, Gracia *et al*^{β2}, evaluaron la producción de AGV mediante digestión anaeróbica de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipal. Un diseño experimental fue construido para determinar las condiciones que favorecen la producción de AGVs. El diseño logró tres variables independientes: la carga orgánica (6 gVS / L y 4 gVS / L), valores de pH de 9.0, 10.0 y 11.0, y una temperatura de 25 ° C. Los resultados del estudio muestran que el lodo activado es apto para producir AGVs; También se puede utilizar como fuente de carbono para la síntesis de biopolímeros.

Por otra parte, Colombo *et al*^{β3}, en 2020, investigó la adición de tensoactivos no iónicos como pretratamientos para extraer PHA de un CMM procedente de residuos agroindustriales fermentados. El uso de estas sustancias permitió un aumento del 50% respecto al rendimiento sin pretratamiento y cercano al que se realiza con cloroformo (63%). El polímero que se extrajo se caracterizó y analizó arrojando un PHA de alta pureza (mayor al 90%).

Peréz- Zabaleta *et al*³⁴, estudiaron un proceso que redujera costos en la producción de polihidroxicanoatos. Estos fueron acumulados por cultivos mixtos utilizando efluentes ricos en ácidos grasos volátiles de corrientes residuales, se comprobó que estos ácidos fueron consumidos en su totalidad obteniendo un rendimiento de 43,5% de PHA, filos como *Proteobacterias*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* dominaban la comunidad bacteriana.

2. Marco referencial

En el mundo existen diferentes tipos de plásticos con múltiples aplicaciones, estos plásticos son clasificados dependiendo su estructura química y el proceso químico al que son sometidos, entre estos encontramos: el polietileno de alta densidad (PE-HD) y el polietileno de densidad media (PE- MD) o también conocidos como polietilenos de alta y media densidad respectivamente, este tipo de plásticos son utilizados en la fabricación de juguetes, botellas y artículos para el hogar; el PVC o también denominado Policloruro de Vinilo, es el material más utilizado para la construcción de tuberías; el polipropileno (PP) es utilizado para la fabricación de recipientes para almacenamiento de comidas, entre otros como el Tereftalato de Polietileno (PET), Poliuretano reticulado(PUR) y el Poliestireno (PS) . Sin embargo, los plásticos de base biológica son una alternativa para mitigar el impacto ambiental que genera la disposición excesiva de residuos de plástico³⁵.

Latinoamérica poco a poco se ha ido sumando al tema de bioplásticos, algunos países buscan que las industrias propongan alternativas de producción que permitan seguir usando plástico, sin causar gran impacto en el medio ambiente. Se han obtenido bioplásticos a partir de residuos de cacao, de plátano, almidón de semillas de mango y papa³⁶.

En Colombia en el año 2016 se lanzó una resolución que busca crear un uso racional de bolsas plásticas “Por la cual se reglamenta el uso racional de bolsas plásticas y se adoptan otras disposiciones”, resolución No. 0660 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible ³⁶. Adicionalmente, la ley 080 de 2019 del Congreso de la República de Colombia, menciona: “Por medio de la cual se establecen medidas tendientes a la reducción de la producción y el consumo, de los plásticos de un solo uso en el territorio nacional, se regula un régimen de transición para reemplazar progresivamente por alternativas reutilizables, biodegradable u otras cuya degradación no genere contaminación, y se dictan otras disposiciones”³⁷.

Los plásticos de base biológica pueden tener como origen o productos intermediarios los siguientes materiales: glicerol, biodiesel, ricino e hidroxialcanoatos provenientes de

diferentes fuentes de aceite, residuos, bioetanol, ácido succínico y ácido láctico presentes en materias primas ricas en azúcares, como el maíz, la caña de azúcar o sustancias poseen celulosa, como el pasto. Otras sustancias como el ácido acético se encuentran en estudio para evaluar su potencial en la generación de bioplásticos³⁸.

2.1 Polihidroxicanoatos

Los PHAs son un grupo amplio de polímeros termoplásticos lineales, que hacen parte de los bioplásticos de base biológica²⁹. Son producidos por algunas bacterias, arqueas y microalgas que lo acumulan intracelularmente, para ser usados como fuentes de carbono y energía. La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos por acción de enzimas intracelulares, ocurre por medio de la condensación del grupo carboxilo de un monómero, con el grupo hidroxilo del siguiente, dando lugar a un enlace éster³⁹. En la mayoría de los casos este polímero se acumula bajo condiciones de estrés y con limitaciones de nutrientes como fósforo, nitrógeno u oxígeno, pero con exceso de fuentes de carbono⁴⁰

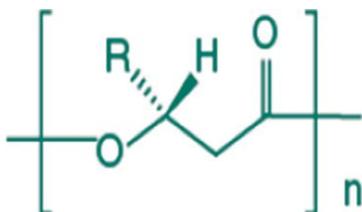


Figura 1. Estructura química del PHA⁴⁹.

2.1.1 Estructura, propiedades y clasificación de los polihidroxicanoatos

Los PHAs se forman por la acción de enzimas intracelulares y se acumulan en el citoplasma microbiano en forma de gránulos, estos gránulos se encuentran rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y des polimerasas³¹. La presencia de una capa de lípidos en la superficie del gránulo que es acorde con el carácter hidrofóbico del PHA, ya que confiere estabilidad al gránulo dentro del ambiente hidrofílico del citoplasma celular⁴¹. Los PHAs tienen un alto grado de polimerización con un rango de cristalinidad que oscila entre el 60 y 80%, son activos, isostáticos e

insolubles en agua. Estas características aumentan su competitividad con el propileno y otros plásticos derivados del petróleo⁴² (ver tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas de polihidroxicanoatos y polipropileno.

Parámetros	PHAMCL	PHASCL	PP
T _m (°C)	61	177	176
T _g (°C)	-36	2	-10
Cristalinidad (%)	30	70	70
Elongación (%)	300	5	400

Fuente: Castillo⁴

En base al número de átomos de carbono que van de 4-14, estructuralmente los PHAs se clasifican: cadena corta (3-5 átomos de carbono), cadena media (6-14 átomos), también pueden haber PHA'S mixto, es decir compuestos de monómeros de cadena corta y media (ver figura 2). Dependiendo de la composición monomérica, estos también se pueden clasificar en homopolímeros y heteropolímeros⁴³.

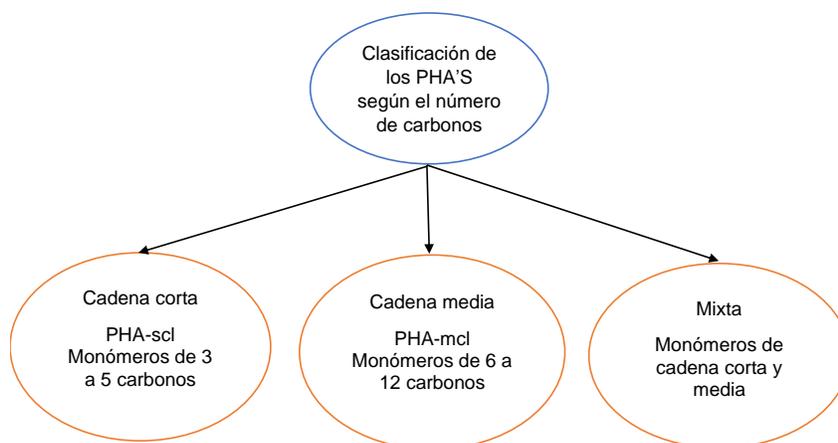


Figura 2. Clasificación de los polihidroxicanoatos³⁶.

El poli 3-hidroxbutirato y la mayoría de los PHA's de cadena corta son rígidos y se rompen al estirarse. Los PHA's de cadena media son los únicos biopolímeros sintetizados por microorganismos. Los materiales constituidos por PHA's de cadena media son lo suficientemente flexibles, además de tener una baja tasa de cristalización⁴⁴.

2.1.2 Biosíntesis de los PHA's

Los polihidroxicanoatos se acumulan y se sintetizan en los microorganismos, cuando estos entran en fase estacionaria de crecimiento, estos se acumulan dependiendo de las fuentes de carbono que se suministran y las limitaciones de algunos nutrientes como oxígeno, fósforo y nitrógeno. Estos se encuentran en los microorganismos de forma intracelular, los PHA pueden alcanzar hasta un 90% del peso seco de la célula^{45, 46}. Es por esto que las vías de síntesis de PHA que suministran monómeros a la PHA sintasa son las responsables de las estructuras finales del polímero, a su vez la composición de los monómeros va a depender de la fuente de carbono utilizada. Se han descrito tres vías de síntesis (ver figura 3). La vía I es la más conocida. En esta los monómeros de 3-hidroxiacetil-CoA se generan por medio de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA por acción de la enzima β -cetotiolasa, y luego la acetoacetil-CoA reductasa actúa sobre la acetoacetil-CoA para convertirla en 3-hidroxiacetil-CoA, al finalizar la PHA sintasa polimeriza el 3-hidroxiacetil-CoA para producir PHB. La vía II utiliza productos del ciclo de la β -oxidación utilizando ácidos grasos como fuente de carbono, estos se convierten primero en enoil-CoA, posteriormente este se transforma en 3-hidroxiacetil-CoA por acción de una enoil-CoA hidratasa. La vía III se enfoca en generar monómeros a partir de la síntesis de PHA, usando fuentes de carbono simples y asequibles, como glucosa, sacarosa y fructosa. En esta vía es de vital importancia la enzima hidroxiacil-acil-CoA transferasa, ya que esta transformará el hidroxiacil-ACP en hidroxiacil-CoA para sintetizar el PHA^{47, 48}.

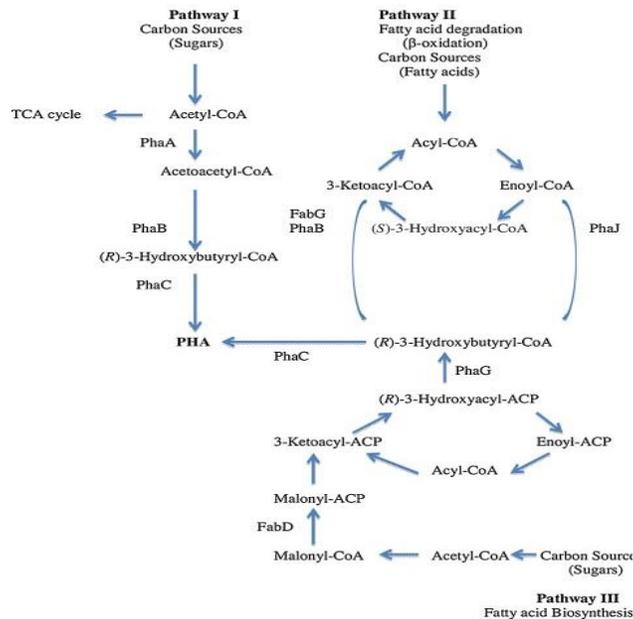


Figura 3. Vías de síntesis de PHA⁴⁷.

2.1.3 Bacterias productoras de PHA

Se han descrito diversos géneros de bacterias productoras de PHA (Tabla 2). Aunque el primer descubrimiento de producción de PHA se hizo en *Bacillus megaterium*, otras bacterias como *Ralstonia eutropha* han venido tomando protagonismo⁴⁹.

Tabla 2. Géneros bacterianos productores de polihidroxicanoatos.

<i>Acinetobacter</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Gamphospheria</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Lamproedia</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Stella</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Thioespedia</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Xanthobacter</i>
	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Zoogloea</i>

Fuente: Braunegg, et al³⁵

La elección de microorganismos para la producción a gran escala del polímero varía dependiendo de los factores de síntesis del polímero. En el primer grupo se requiere la limitación de nutrientes como fósforo, nitrógeno, azufre, magnesio y oxígeno para sintetizar PHA en exceso de fuente de carbono (Tabla 3). El segundo grupo puede acumular polímeros en cantidades altas durante la fase de crecimiento⁵⁰.

Tabla 3. Principales nutrientes limitados para el favorecimiento de la producción de PHA en distintos microorganismos.

Microorganismo	Nutriente limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	Nitrógeno
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	
<i>Ralstonia eutropha</i>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Pseudomonas sp.</i>	Magnesio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxígeno
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	
<i>Rhizobium ORS571</i>	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Fósforo
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
<i>Caulobacter crescentus</i>	
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	

Fuente: Lemos Ac, Córdoba A⁵¹. Adaptada por: autores, octubre 2020

La producción de varios PHA's utilizando cepas naturales y recombinantes junto con sus fuentes de carbono se pueden ver en la siguiente tabla (Tabla 4)

Tabla 4. Producción de PHA por varias bacterias

Microorganism	Carbon source	PHA	PHA content (%w/v)	References
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconate	PHB	46-85	Liebergesell et al. (1994)
	Propionate	PHB	26-36	
	Octanoate	PHB	38-45	
<i>Bacillus megaterium QMB1551</i>	Glucose	PHB	20	Mirtha et al. (1995)
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinants	Molasses	PHB	65	Zhang et al. (1994)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 1267	Fructose/methanol	PHB	30	Ackermann and Babel (1997)
<i>M. extorquens</i> (ATCC55366)	Methanol	PHB	40-46	Borque et al. (1995)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia and castor oil	PHA	20-30	Eggink et al. (1995)
<i>P. denitrificans</i>	Methanol	P(3HV)	0.02	Yamane et al. (1996)
	Pentanol	P(3HV)	55	
<i>P. oleovorans</i>	Glucanoate	PHB	1.1-5.0	Liebergesell et al. (1994)
	Octanoate	PHB	50-68	
<i>P. putida</i> GPp104	Octanoate	PHB	14-22	Liebergesell et al. (1994)
<i>P. putida</i>	Palm kernel oil	PHA	37	Tan et al. (1997)
	Lauric acid	PHA	25	
	Myristic acid	PHA	28	
	Oleic acid	PHA	19	
<i>P. putida</i> BM01	11-Phenoxyun-decanoic acid	5POHV	15-35	Song and Yoon (1996)
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucose	PHB	40	Takeda et al. (1995)

Fuente: Reddy et al⁵²

2.1.4 Producción de PHA's por cultivos puros

El uso de cepas recombinantes hace más efectiva la producción de PHA's, ya que estas cuentan con capacidad de crecimiento rápido, alta densidad celular y habilidad de usar sustratos a un costo bajo y sencillos procesos de purificación del biopolímero, pero la alta concentración celular, la necesidad de alimentación constante sumado al elevado costo del proceso puede generar un impacto desafortunado en el proceso de producción. Algunas de las cepas utilizadas son *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp*⁵³.

2.1.5 Producción de PHA por cultivos mixtos

Los cultivos mixtos se definen como poblaciones bacterianas de composición indefinida, la cual depende de las condiciones impuestas en el sistema biológico. El uso de este cultivo ha tomado mayor interés debido a su menor costo de producción y el uso de sustratos económicos como por ejemplo las aguas residuales y residuos agroalimentarios. Esta tecnología se basa en la selección natural por competencia con otros microorganismos. La producción de PHA por cultivos mixtos no requieren de esterilización de los reactores y las bacterias se adaptan a la complejidad de materias primas presentes en los residuos, estos también tienen el potencial de producir grandes cantidades de PHA⁵³.

Los cultivos mixtos no almacenan carbohidratos como PHA sino como glucógeno. A través de fermentación acidogénica se pueden obtener ácidos grasos volátiles (AGVs) para ser utilizados por cepas mixtas para producir PHA. Son varios los métodos que se han utilizado para lograr la síntesis de PHA, entre los cuales están proceso anaeróbico-aeróbico, procesos de fermentación, cultivo por lotes y continuo, y alimentación aeróbica dinámica. Estos procesos en general están basados en la limitación de nutrientes esenciales para la síntesis del polímero. La alimentación aeróbica dinámica tiene dos fases; la primera fase lleva a cabo la provisión del sustrato (*feast*), mientras que la segunda limita los sustratos (*famine*)^{53,54}.

2.1.6 Aplicaciones industriales de los PHA's

Varias empresas a nivel global trabajan actualmente con polihidroxicanoatos (ver tabla 5).

Tabla 5. Producción industrial a nivel global de polihidroxicanoatos.

Compañía	País/Región	Año de apertura	Producto	Referencia
Novamont	Italia	1989	PHA	https://www.novamont.com/
Bio-on	Italia	2007	PHA	http://www.bio-on.it/
Avantium	Holanda	2000	FDCA y PEF	https://www.avantium.com/our-company/
Tecnar	Alemania	NA	PHA	https://www.tecnar.de/en/
Kaneka	Japón	1949	PHBH	https://www.kaneka.co.jp/en/
Navigate Corporation	República Checa	2015	P3HB	https://www.navigate.com/
Metabolix	Woburn,	1992	PHB, PHA	https://bioplasticsnews.com/metabolix/
	Massachusetts			
Danimer Scientific	Bainbridge,	2007	mcl-PHA	https://danimerscientific.com/
	Georgia			
Rodenburg biopolymer	Holanda	2000	PHA	http://biopolymers.nl/
Global polymers			Bio-PE, Bio-PP, Bio-PET, PBS, PHA, PBAT.	http://www.globalpolymerscorp.com/
	Tailandia	NA		
Terra Verdae Bio Works Inc	Canadá	NA	PHA	https://terraverdae.com/
Vinmar	NA	1978	PHA	https://www.vinmar.com/
Ecomann Biotechnology Co., Ltd	China	2008	PHA	http://ecomann.sx-gear.com/
Newlight Technologies, LLC.	Estados Unidos	2007	PHA	https://news.bio-based.eu/supplier/newlight-t
TianAn Biopolymer	China	2000	PHBV	http://www.tianan-enmat.com/

Fuente: Sabapathy *et al*³¹. Adaptada por: autores, octubre 2020.

Dadas las características mencionadas anteriormente de biocompatibilidad y biodegradabilidad en la siguiente tabla (ver tabla 6) se presentan algunas de las aplicaciones de los PHA's

Tabla 6. Áreas de aplicación de los polihidroxicanoatos

Área	Aplicaciones
Biomédica	Implantes quirúrgicos, ingeniería de válvulas cardíacas, partes de huesos.
Farmacéutica	Encapsulación de medicamentos
Empaques y envases	Empaques y envases para alimentos
Veterinaria	Encapsulación de medicamentos para animales.
Agrícola	Encapsulación de fertilizantes
Ambiental	Fabricación de bolsas, artículos desechables, pañales biodegradables y remediación de áreas impactadas por derrames de petróleo
Industrial	Síntesis de polímeros

Fuente: dos Santos *et al*⁵⁵. Adaptada por autores, agosto 2021.

2.2 Aguas residuales

Las aguas residuales, además de ser un subproducto de tratamiento de las aguas “negras”, son consideradas como fuente para la producción de bioplásticos. El agua residual está compuesta de componentes físicos, químicos y biológicos; es una mezcla de materiales orgánicos e inorgánicos suspendidos o disueltos⁵⁶.

Según Alvaréz G, “las aguas residuales son aquellos volúmenes del recurso hídrico que han sido aprovechados en el desarrollo de actividades humanas tales como las domésticas, agropecuarias o industriales y que en tal virtud han desmejorado sus condiciones de calidad, lo que representa un peligro e impide que se realicen usos posteriores o actividades de reúso, salvo que previamente sean sometidas a un proceso de tratamiento para la recuperación de unos estándares mínimos de calidad que se establezcan en la normatividad”. El reúso de aguas residuales en Colombia se ha desarrollado en la resolución 1207 del 2014 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible⁵⁷.

2.2.1 Aguas residuales domésticas

Son aguas originadas en los hogares o instalaciones comerciales. Están compuestas por materia fecal y aguas de lavado y limpieza. La carga contaminante presente en estas aguas está compuesta por microorganismos patógenos (la mayoría de estos están presentes en el aparato digestivo del ser humano, entre ellos, enterobacterias y estreptococos fecales), materia orgánica, sólidos, jabones, fósforo y nitrógeno^{58, 59}.

2.2.2 Lodos residuales domésticos

Los lodos residuales son materia orgánica, rica en nutrientes, que resultan del tratamiento de las aguas residuales domésticas. Cuando son tratados y procesados estos residuos pueden tener diferentes usos.

El tratamiento de las aguas residuales tiene como principal objetivo eliminar patógenos excretados. Dependiendo del tratamiento se pueden generar lodos espesados, lodos primarios, lodos activados, lodos digeridos, lodos secundarios, lodos estabilizados⁶⁰.

2.3 Marco conceptual

Ácidos grasos volátiles (AGVs): ácidos grasos con cadenas de menos de seis carbonos.

Aireación: renovación continua de aire

Biomasa: materia orgánica usada como fuente energética.

Cepas: población de microorganismos pertenecientes a la misma especie y que comparten características similares

Cristalización: proceso por el cual se transforma un líquido, un gas o una solución, en un conjunto de cristales sólidos.

Feast/famine: festín/ hambruna

Fermentación: transformación que sufren ciertas materias orgánicas bajo la actuación de enzimas segregadas por microorganismos.

Heteropolímero: polímero formado por dos o más tipos de monómeros diferentes.

Homopolímero: polímero formado por monómeros idénticos

Lodos: desechos residuales sólidos o semi-sólidos restantes cuando el líquido se elimina durante el tratamiento de residuos.

Polímero: sustancia compuesta por moléculas de cadena larga en la que está presente la unidad estructural básica.

Pre-tratamiento: primer proceso de acondicionamiento de aguas.

Reactor anaerobio: equipo usado para tratar sustratos con alto contenido de sólidos.

Sustrato: molécula sobre la que actúa una enzima.

3. Diseño metodológico

3.1 Universo, población, muestra

3.1.1 Población

Artículos científicos sobre producción de polihidroxicanoatos

3.1.2 Muestra

Artículos científicos y capítulos de libro sobre producción de polihidroxicanoatos a partir de aguas y lodos residuales.

3.2 Hipótesis, variables, indicadores

3.2.1 Hipótesis

Se han descrito consorcios microbianos capaces de utilizar los ácidos grasos volátiles presentes en lodos y aguas residuales de origen doméstico para producir biopolímeros polihidroxicanoatos.

3.3. Técnicas y procedimientos

Selección de artículos científicos

Se seleccionaron artículos, capítulos de libro y trabajos de grado, para el desarrollo de este análisis documental

Para la revisión de literatura científica relacionada con la identificación y selección de un consorcio microbiano con potencial para producir biopolímeros del tipo polihidroxicanoatos PHA'S se consultaron las siguientes bases de datos: *Nature International Journal Of Science, Mendeley, Oxford Academics Journal, Scopus, Elsevier,*

ScienceDirect y *Springerlink* sin límite de ventana de observación y sin discriminación del país de origen.

- Criterios de inclusión: producción biotecnológica de PHA's, producción de PHA's a partir de lodos y aguas residuales, conversión de AGVs para producir PHA's, reúso de agua residuales
- Criterios de exclusión: producción de PHA's a partir de residuos agroindustriales y de alimentos.

4. Resultados

Para el análisis se realizó la búsqueda de artículos científicos habiendo consultado las bases de datos mencionadas anteriormente. Los artículos se seleccionaron independientemente del país, lugar o sitio de investigación (ver figura 4).

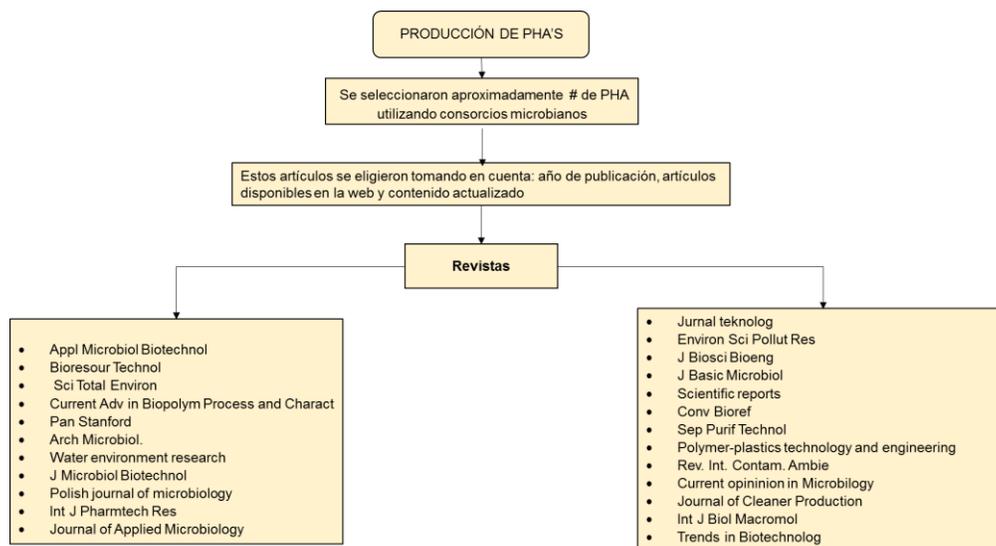


Figura 4. Selección de artículos

4.1 Análisis de las poblaciones microbianas halladas.

A lo largo de las investigaciones realizadas fue de gran importancia identificar los potenciales microorganismos productores de PHA's

4.1.1 Fuente de aislamiento

Las bacterias encontradas en estos hallazgos se obtuvieron de diferentes fuentes de aislamiento (ver tabla 7).

Tabla 7. Fuentes de aislamiento de bacterias

Fuente de aislamiento	Referencias
Aguas residuales industriales	Sruamsiri <i>et al</i> ¹⁵ , Giraldo <i>et al</i> ¹⁶
Aguas residuales domésticas o municipales	Chua <i>et al</i> ²² , Perez-Zabaleta <i>et al</i> ³⁴ , Coats <i>et al</i> ¹

Lodos activos de aguas residuales domésticas o municipales	Huang et al ⁹ , Liu et al ²⁵ , Ciesielski et al ¹⁰ , Sakai et al ²⁴ , Inoue et al ²⁶ , Gracia et al ³² , Crognale et al ¹⁴
Suelos de aguas residuales	Mikkili et al ¹¹
Corrientes salobres	Mohd et al ¹²
Aguas y lodos residuales sintéticos	Manina et al ²⁹ , Jia et al ²³
Aguas residuales de origen desconocido	Munir et al ²⁸

Fuente: autores, agosto 2021

4.1.2 Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas

La identificación microscópica por medio de la coloración de Gram da un acercamiento a las características de las bacterias halladas en las fuentes de aislamiento, de un total de 25 artículos se encontró que el 83% de los aislamientos son bacterias Gram negativas y el 17% Gram positivas (ver figura5).

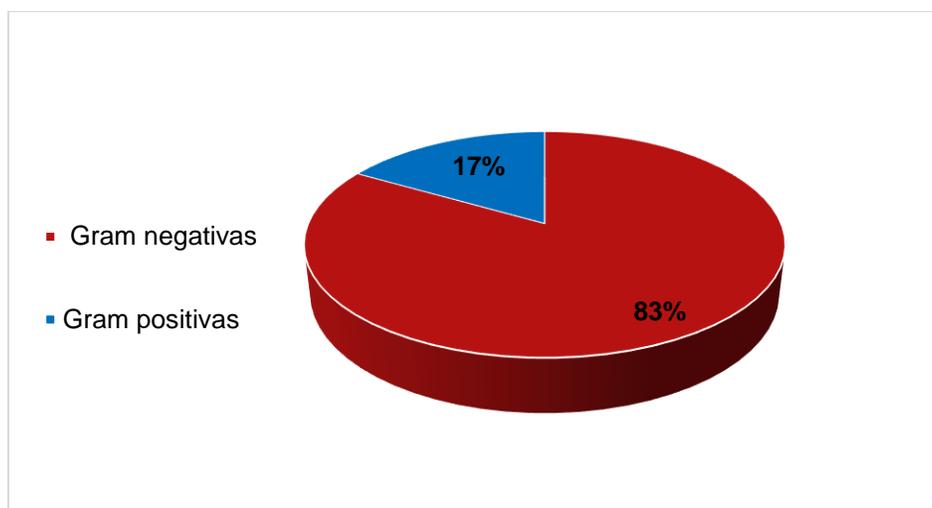


Figura 5. Porcentaje de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas de aguas y lodos residuales citados en los artículos revisados

4.1.3 Identificación del gránulo de PHA

Las colonias seleccionadas fueron teñidas con diferentes coloraciones para identificar si estas poseían el gránulo de PHA (ver tabla 8)

Tabla 8. Coloraciones para la identificación de gránulo de PHA

Técnicas de identificación de gránulos PHA	Referencias
Negro Sudán A	Huang et al ⁹ , Mikkili et al ¹¹ , Mohd et al ¹²

Azul Nilo	Spiekermann <i>et al</i> ⁸ , Mohd <i>et al</i> ¹²
Rojo Nilo	Spiekermann <i>et al</i> ⁸ , Giraldo <i>et al</i> ¹⁶

Fuente: autores, 2021

4.1.4 Bacterias acumuladoras de PHA

Existen varias bacterias acumuladoras de PHA, en los estudios citados en este documento se encontraron los géneros expuestos en la siguiente figura (ver figura 6)

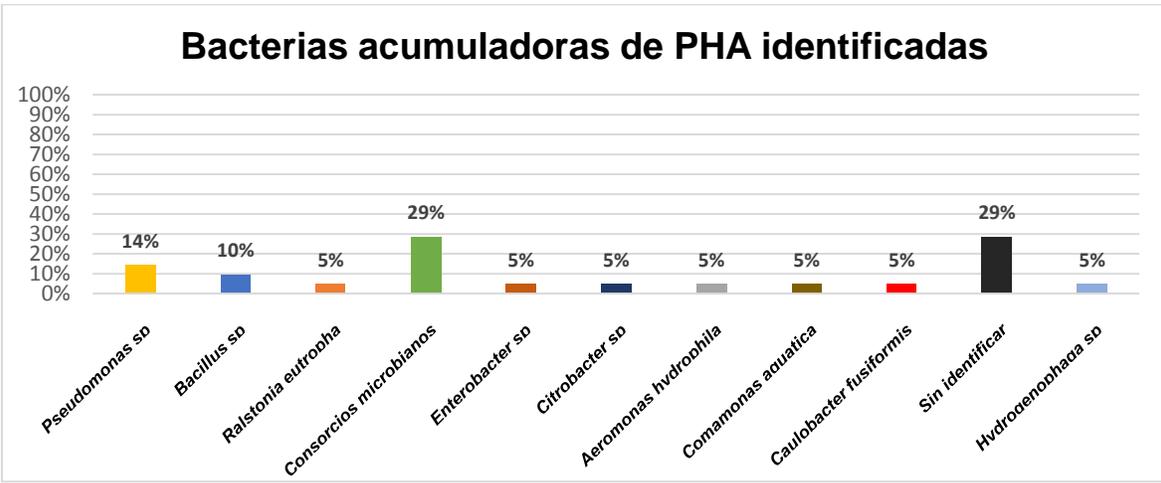


Figura 6. Bacterias acumuladoras de PHA

4.1.5 Porcentaje de acumulación de PHA en bacterias con potencial de producción

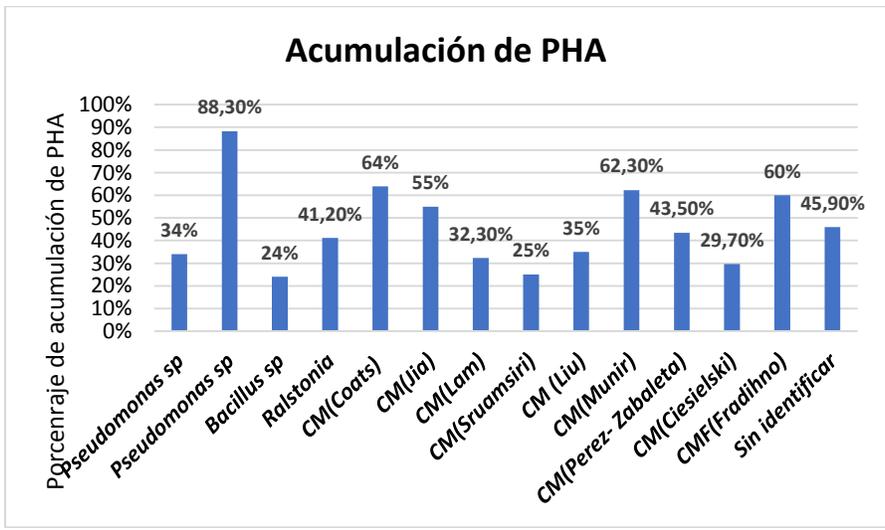


Figura 7. Porcentaje de acumulación de PHA en bacterias

CM: Consorcio microbiano
 CMF: Cultivo mixto fotosintético

4.2 Estrategias de aclimatación de las bacterias

Tabla 9. Bacterias acumuladoras de PHA y fuente de carbono utilizada

Bacterias	Fuente de carbono	Estrategias de alimentación	PHA (%)	Referencias
<i>Pseudomonas sp ST2</i>	Ácidos grasos volátiles	No aplica	34%	Munir <i>et al</i> ²⁸ , 2018
<i>Pseudomonas sp</i>	No aplica	No aplica	88,30%	Mohd <i>et al</i> ¹² , 2016
<i>Bacillus sp CS8</i>	Ácidos grasos volátiles	No aplica	24%	Munir <i>et al</i> ²⁸ , 2018
<i>Ralstonia sp</i>	No aplica	No aplica	41,20%	Huang <i>et al</i> ⁶ , 2012
Consortio microbiano	No aplica	Feast/famine	25%	Coats <i>et al</i> ¹ , 2007
Consortio microbiano	Ácidos grasos volátiles	Feast/famine	62,30%	Jia <i>et al</i> ²³ , 2013
Consortio microbiano	No aplica	No aplica	55%	Lam <i>et al</i> ¹³ , 2017
Consortio microbiano	Acetato	Feast/famine	32,30%	Sruamsiri <i>et al</i> ¹⁵ , 2020
Consortio microbiano	No aplica	No aplica	64,00%	Liu <i>et al</i> ⁵ , 2016
Consortio microbiano	Ácidos grasos volátiles	No aplica	35%	Munir <i>et al</i> ²⁸ , 2018
Consortio microbiano	Ácidos grasos volátiles	No aplica	44%	Perez- Zabaleta <i>et al</i> ³⁴ , 2021
Consortio microbiano	No aplica	No aplica	29,70%	Ciesielski <i>et al</i> ¹⁰ , 2013
Consortio microbiano	Acetato	Aeróbica/anaeróbica	7.9-24%	Sakai <i>et al</i> ²⁴ , 2014
Cultivo mixto fotosintético	Acetato	Feast	60%	Fradihno <i>et al</i> ²⁷ , 2017
Sin identificar	No aplica	No aplica	45,90%	Mikiili <i>et al</i> ¹¹ , 2014

Fuente: autores, agosto 2021

5 Discusión

La gran mayoría de bacterias encontradas en las investigaciones realizadas son Gram negativas (83%), coincidiendo con los resultados preliminares obtenidos por el grupo de investigación, donde el 96% de las bacterias aisladas son Gram negativas.

El uso del colorante Sudán Negro resulta adecuado para la detección de gránulos de PHA, los cuales se observaron de color negro o gris^{9, 11,12}. Sin embargo, existen otros colorantes con mayor afinidad y especificidad como el azul Nilo A y Rojo Nilo. Con éstos reactivos los gránulos de PHA son reconocidos por una fluorescencia naranja^{8, 12,16}, pero no son completamente efectivos para la selección, porque los colorantes pueden formar cuerpos fluorescentes con compuestos afines a los biopolímeros como son las inclusiones lipídicas⁸.

Varios autores coinciden en que la fuente de carbono influye directamente sobre la cantidad del PHA. Entre las fuentes de carbono más utilizadas está los ácidos grasos volátiles y el acetato (ver tabla 9)

El uso de estrategias como *feast/famine* ha permitido una mejora en la acumulación del polímero^{21, 23,13}, entre algunas de las modificaciones que han utilizado está un régimen de un solo *feast* permanente que resulta en una ventaja significativa al no requerir aireación, Fradihno *et al*⁷.

El uso de carbohidratos y proteínas no favorecen a la acumulación de PHA's, pero si al crecimiento celular. Se debe buscar un equilibrio entre el crecimiento celular y la acumulación del polímero para obtener un alto rendimiento.

En cuanto a la identificación del gen *phaC*, investigadores asiáticos, Huang *et al*⁹, Sakai *et al*⁴ e Inoue *et al*⁶ analizaron este gen, en Colombia, se realizó un estudio el cual tenía como fin identificar y analizar la organización y las secuencias de cada uno de los genes que conforman el cluster productor de sintasa tipo II, en una cepa nativa colombiana *Pseudomonas fluorescens* S1602⁶¹.

6 Conclusiones

Teniendo en cuenta los artículos revisados hasta el momento, se mencionan las siguientes conclusiones:

- El uso de las técnicas de tinción siguen siendo útiles para demostrar la presencia de gránulos de reserva de PHA's.
- La estrategia de selección de las fuentes nutricionales (carbono, nitrógeno y fosforo) así como la determinación del sustrato limitante que permita promover el crecimiento celular y favorecer la acumulación del polímero.
- El uso de consorcios microbianos ha sido la alternativa de modelo bacteriano más utilizada para la producción de polímeros de forma eficiente
- La mayoría de ensayos experimentales a partir del tratamiento de aguas residuales de origen doméstico han utilizado como materia prima lodos activados.

7 Referencias

1. Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnol Adv* [Internet].2007 [citado 26 de agosto de 2021]; 25:148-175. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975006001443>
2. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng* [Internet].2010 [citado 26 de agosto de 2021]; 110: 621-632. Disponible en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389-1723\(10\)00252-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389-1723(10)00252-5)
3. Castillo DA. Efecto del gen *fadH1* en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por *Pseudomonas putida*. [Microbiólogo industrial]. Sao Pablo: Pontificia Universidad Javeriana; 2008. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8224/tesis219.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Lanz A. Bioprospección y aislamiento de bacterias productoras de poli (β -hidroxibutirato) de un tapete microbiano. [Maestro en ciencias]. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2006. Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/140>
5. Kleerebezem R, Van Loosdrecht. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr Opin Biotechnol* [Internet].2007 [citado 26 de agosto de 2021]; 18:207-212. Disponible en: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958-1669\(07\)00057-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958-1669(07)00057-2)
6. Dionisi D, Silva I. Production of ethanol, organic acids and hydrogen: an opportunity for mixed culture biotechnology? *Rev Environ Sci Biotechnol* [Internet]. 2007 [citado 26 de agosto de 2021]; 15:213-242. Disponible en: <https://abdn.pure.elsevier.com/en/publications/production-of-ethanol-organic-acids-and-hydrogen-an-opportunity-f>

7. Lee S. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. Trends in Biotechnol [Internet]. 1996 [citado 20 de agosto de 2021]; 14:431-438. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0167779996100615>
8. Spiekermann, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister, Steinbüchel. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Arch Microbiol. [Internet]. 1999 [citado 12 octubre de 2020]; 171: 73-80. Disponible en: DOI: 10.1007/s002030050681
9. Huang Y. Detection of Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria from Domestic Wastewater Treatment Plant Using Highly Sensitive PCR Primers. J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2012 [citado 12 octubre de 2020]; 22(8):1141-1147. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1111.11040>
10. Ciesielski S, Pokoj T, Mozejko J, Klimiuk E. Molecular identification of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from enriched microbial community. Polish journal of microbiology [Internet]. 2013 [citado 14 octubre de 2020]; 62(1):45-50. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/247153995>
11. Mikkili I, Karlapudi A, Venkateswarulu TC, Babu D, Nath SB, Kodaly VP. Isolation and Identification of PolyHydroxyButyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample. Int J Pharmtech Res [Internet]. 2014 [citado 14 octubre de 2020]; 10(4):1065. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/278021439>
12. Mohd Zain NA, Ali Zargoun LM, Elias NF, Abdul-Wahab MF, Suhaimi MS. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAS) producing bacteria from brackish stream. Jurnal teknolog [Internet]. 2016 [citado 14 octubre de 2020]; 78(7). Disponible en: DOI: 10.11113/jt. v78.4493

13. Lam W, Wang Y, Ling P, Chan S, Tsang Y, Chu H, et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *Environmental Technology* [Internet]. 2017 [citado 03 de agosto de 2021]; 38:1779-1791. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09593330.2017.1316316>
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09593330.2017.1316316>
14. Crognale S, Tonanzi B, Valentino F, Majone M, Rossetti S. Microbiome dynamics and phaC synthase genes selected in a pilot plant producing polyhydroxyalkanoate from the organic fraction of urban waste. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019 [citado 18 de julio 2020]; 689:765-773. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969719330645>
15. Sruamsiri D, Thayanukul P, Suwannasilp BB. In situ identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Scientific reports* [Internet]. 2020 [citado 16 octubre de 2020]; 10(1):3752. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60727-7>
16. Giraldo J, Castaño J, Rivera F. Bacteria from industrial waste: potencial producers of polyhydroxyalkanoates (PHA's) in Manizales, Colombia. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2020 [citado 03 de agosto de 2021]; 192:1-8. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10661-020-08461->
17. Amulya K, Jukuri S, Mohan V. Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. *Bioresour Technol* [Internet]. 2015 [citado 20 de agosto de 2021]; 188:231-239. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852415000905>
18. Dionisi D, Majone M, Papa V, Beccari M. Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnol Bioeng* [Internet].

2004[citado 20 de agosto de 2021]; 85:569-579. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.10910>

19. Serafim L, Lemos P, Torres C, Reis M, Ramos A. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromol Biosci* [Internet]. 2008 [citado 20 de agosto de 2021]; 8:55-366. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.200700200>
20. Madison L, Huisman G. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 1999[citado 26 de agosto de 2021]; 63:21-53. Disponible en:<https://journals.asm.org>
21. Coats ER, Loge FJ, Wolcott MP, Englund K, McDonald AG. Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Municipal Wastewater Treatment. *Water environment research*. [Internet]. 2007 [citado 12 octubre de 2020]; 79(12):2396-2403. Disponible en: DOI: 10.2175/106143007X183907.
22. Chua A, Takabatake H, Satoh H Mino T. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research* [Internet]. 2003[citado 03 de agosto de 2021]; 37: 3602-3611. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135403002525>
23. Jia Q, Wang H, Wang X. Dynamic synthesis of polyhydroxyalkanoates by bacterial consortium from simulated excess sludge fermentation liquid. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013 [citado 21 de agosto de 2021]; 140:328-336. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852413007293?via%3Dihub>
24. Sakai K, Miyake S, Iwama K, Inoue D, Soda S, Ike M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA-accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants. *Journal of Applied*

Microbiology [Internet]. 2014 [citado 14 octubre de 2020]; 118(1):255-266. Disponible en: DOI:10.1111/jam.12683.

25. Liu C, Liu D, Qi Y, Zhang Y, Liu X, Zhao M. The effect of anaerobic–aerobic and feast–famine cultivation pattern on bacterial diversity during poly- β -hydroxybutyrate production from domestic sewage sludge. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2016 [citado 14 octubre de 2020]; 23(13):12966-12975. Disponible en: DOI 10.1007/s11356-016-6345-6
26. Inoue D, Suzuki Y, Uchida T, Morohoshi J, Sei K. Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2016 [citado 14 octubre de 2020]; 121(1):47-51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.04.022>
27. Fradinho J, Reis M, Oehmen A. Beyond feast and famine: Selecting a PHA accumulating photosynthetic mixed culture in a permanent feast regime. *Water res* [Internet]. 2016 [citado 21 de agosto de 2021]; 105:421-428. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135416306996?via%3Dihub>
28. Munir S, Jamil N. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production in bacterial co-culture using glucose and volatile fatty acids as carbon source. *J Basic Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 15 octubre de 2020]; 58(3):247-254. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jobm.201700276>
29. Manina G, Presti D, Montiel G, Suarez ME. Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresour Technol* [Internet]. 2019 [citado 15 octubre de 2020]; 282. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.037>
30. Lorini L, Martinelli A, Pavan P, Majone M, Valentino F. Downstream processing and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by mixed microbial culture (MMC) and organic urban waste as substrate *Biomass Conv Bioref* [Internet]. 2020 [citado 16 octubre de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00788-w>

31. Sabapathy PC, Devaraj S, Meixner K, Anburajan P, Kathirvel P, Ravikumar Y, et al. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresour Technol* [Internet]. 2020 [Citado 16 octubre de 2020]; 306. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
32. Gracia J, Mosquera J, Montenegro C, Acevedo P, Cabeza I. Volatile Fatty Acids Production from Fermentation of Waste Activated Sludge. *Bioresour Technol* [Internet]. 2020 [citado 17 octubre de 2020]; 79: 217-221. Disponible en: DOI: 10.3303/CET2079037
33. Colombo B, Pereira J, Martins M, Torres-Acosta MA, Dias ACRV, Lemos PC, et al. Recovering PHAs from mixed microbial biomass: using non-ionic surfactants as a pretreatment step. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2020 [citado 17 octubre de 2020]; 253. Disponible en: DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117521
34. Perez- Zabaleta M, Atasoy M, Khatami K, Eriksson E, Cetecioglu Z. Bio-based conversion of volatile fatty acids from waste streams to polyhydroxyalkanoates using mixed microbial cultures. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021 [citado 03 de agosto de 2021]; 323. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420318782>
35. Braunegg G, Bona R, Koller M. Sustainable Polymer Production. *Polymer-plastics technology and engineering*. [Internet]. 2004 [citado 17 octubre de 2020]; 43(6):1779-1974. Disponible en: <https://doi.org/10.1081/PPT-200040130>
36. Heredia J. Bioplastique SAS plan de negocios. *Ciencia Unisalle* [Internet]. 2018 [citado 31 de agosto de 2021]. Disponible: <https://ciencia.lasalle.edu.co>
37. Colombia. Congreso de la Republica de Colombia. Ley 0819 de 2019 [Internet]. Congreso de la Republica de Colombia. 2019 [Citado 04 de noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.andi.com.co/Uploads/PL%20080-19%20Plasticos.pdf>
38. Bergsma G, de Graaff L, Nusselder S, Odegard I. Biobased plastics in a circular economy. In *Policy suggestions for biobased and biobased biodegradable plastics*. Holanda; 2017

[Citado 17 octubre de 2020]. Disponible en:
https://www.cedelft.eu/publicatie/biobased_plastics_in_a_circular_economy/2022

39. González Y, Meza JC, González O, Córdova JA. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Rev. Int. Contam. Ambie [Internet]. 2013 [Citado 17 octubre de 2020]; 29(1):77-115. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007
40. Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. Current opinion in Microbiology [Internet]. 2010 [Citado 17 octubre de 2020]; 13:321-326. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>
41. Álvarez L. Bioplásticos y obtención de polihidroxicanoatos. [Grado en farmacia]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2016. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/54517/BIOPL%C3%81STICOS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
42. Valero MF, Ortigón Y, Uscategui Y. Biopolímeros: avances y perspectivas. Dyna [Internet]. 2013 [Citado 17 octubre de 2020]; 181:171-180. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v80n181/v80n181a19.pdf>
43. Kumar M, Rathour R, Singh R, Sun Y, Pandey A, Gnansounou E, et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. Journal of Cleaner Production [Internet]. 2020 [Citado 17 octubre de 2020]; 263. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>
44. Steinbuchel A. Production of rubber-like polymers by microorganisms. Current opinion in Microbiology [Internet]. 2003 [Citado 17 octubre de 2020]; 6(3):261-270. Disponible: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00061-4)
45. Costa SS, Miranda AL, de Moraes MG, Costa JAV, Druzian JI. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. Int J Biol Macromol [Internet]. 2019 [Citado

25 octubre de 2020]; 131:536-547. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.099>

46. Talan A, Kaur R, Tyagi R, Drogui P. Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: Sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts. *Bioresour technol* [Internet]. 2020 [Citado 25 octubre de 2020]; 11. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100496>

47. Chen G, Hajnal I, Wu H, Lv L, Ye J. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* [Internet]. 2015 [Citado 27 octubre de 2020]; 33(10):565-574. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.007>

48. Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016 [Citado 27 octubre de 2020]; 89:161-174. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>

49. González MG. Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino. [Maestro en ciencias]. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2008. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/288/1/gonzalez_m.pdf

50. Ben M. Producción de polihidroxicanoatos a partir de agua residual de la industria cervecera. [Doctora en química]. La Coruña: Universidad da Coruña; 2015. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=49117>

51. Lemos AC, Mina A. Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador técnico* [Internet]. 2015 [Citado 27 octubre de 2020]; 79: 93-101. Disponible en: DOI: 10.23850/22565035.139.

52. Reddy C, Ghai R, Rashmi, Kalia V. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol*[Internet]. 2003 [citado 31 de agosto de 2021]; 87: 137-146. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12765352/>
53. Mendoza RR. Obtención de polihidroxialcanoatos a partir del suero lácteo por cultivos microbianos mixtos. [Doctor en química fundamental y ambiental]. La Coruña: Universidad de la Coruña; 2017. Disponible en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/20354>
54. Pakalapati H, Chang C, Show PL, Arumugasamy SK, Lan JC. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2018 [Citado 27 octubre de 2020]; 126(3):282-292. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016>
55. Dos Santos A, Dalla L, Hidalgo A, Tomaz M. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ing cien* [Internet]. 2017 [citado 30 de agosto de 2021]; 13:269-298. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v13n26/1794-9165-ince-13-26-00269.pdf>
56. Mara D, Ayres R, OMS. Análisis de aguas residuales para su uso en agricultura: manual de técnicas parasitológicas y bacteriológicas de laboratorio. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 1997 [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41996>
57. Alvaréz G. El reuso de aguas residuales en Colombia. 2017 [citado 31 de agosto de 2021]: 189-232.
58. Zambrano CX. Clasificación de aguas negras. [Maestro en ciencias especialista en producción agrícola]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 1994. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/4660/1/1080063779.PDF>

59. Torres EW. Proyecto de una planta de tratamiento de aguas residuales domesticas para reúso del agua en la agricultura; 2003. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19121/Capitulo2.pdf>
60. Carr R, Strauss. Water Quality: Guidelines, Standard and Health. World Health Water Series [Internet]. 2001[citado 31 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.co>
61. Serrano J. Determinación del cluster (phaC1, phaZ, phaC2, phaD, phaF, phaI) asociado con la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) sintasa tipo II en una cepa nativa colombiana / Determination of cluster (phaC1, phaZ, phaC2, phaD, phaF, phaI) associated with the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase type II in a Colombian native strain[Maestría en Ciencias- Microbiología]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2010. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/6770/juliethyadiraserranoriano.2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y>