



**Factores fisicoquímicos que influyen en la producción de bioplásticos tipo PHA en
el género *Bacillus* spp**

Angie Daniela Ramirez Alvarez

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá, abril 2023**



**Factores fisicoquímicos que influyen en la producción de bioplásticos tipo PHA
en el género *Bacillus* spp**

Angie Daniela Ramirez Alvarez

Asesor

MSc Johanna Marcela Moscoso G.

Asesor Interno

MSc Jovanna Acero Godoy

Asesor Externo

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá, abril 2023



**Factores fisicoquímicos que influyen en la producción de bioplásticos tipo PHA
en el género *Bacillus* spp**

APROBADA _____

JURADOS _____

ASESORAS _____

Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa De Bacteriología

Trabajo De Grado

Bogotá, abril 2023

Agradecimiento

Sabiduría es el uso correcto del conocimiento

Quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios, fuente de todo el conocimiento

También quiero agradecer a mis padres por su apoyo, comprensión y sacrificio a lo largo de todos estos años, gracias a ustedes he llegado hasta aquí y me he convertido en lo que soy hoy en día.

Asimismo, quiero agradecer a mi hermano y amigos por su presencia constante y su apoyo a lo largo de esta etapa de mi vida.

Quiero expresar mi gratitud hacia la universidad por brindarme las herramientas necesarias para poder desarrollar este proceso, y por último a mis asesoras Johanna Marcela Moscoso y Jovanna Godoy por aceptar este reto junto conmigo, por guiar esta investigación y formar parte de esta etapa.

¡Gracias por todo!

Tabla de contenido

1. Resumen	6
2. Abstract	7
3. Introducción	8
4. Objetivo	9
4.1 Objetivo general	9
4.2 Objetivos específicos	9
3. Antecedentes	10
4. Marco teórico	14
4. 1 Plásticos convencionales	14
4.1.1 Historia	14
4.1.2 Clasificación del plástico	15
4.1.2.1 Origen	15
4.1.2.2 Estructura molecular	15
4.1.2.3 Respuesta termo-mecánica	16
4.1.3 Marco Legal	16
4. 2 Biopolímeros	17
4.2.1 Clasificación de los biopolímeros	18
4.2.2 Polihidroxialcanoatos (PHA)	19
4.2.2.1 Clasificación de PHA	20
4.2.2.2 Rutas de biosíntesis	21
4.2.2.3.2 Características genéticas de <i>Bacillus cereus</i>	25
4.2.2.4 Técnicas de detección, cultivo y caracterización del PHA	26
4.2.2.5 Fermentación para producir PHA	26
4.2.2.5.1 Fuentes de carbono alternativas	27
4.2.2.6 Extracción del PHA	27
4.2.2.7 Biodegradación del PHA	28
4.2.2.8 Aplicaciones del PHA	28
5. Diseño metodológico	30
5. 1 Tipo de estudio	30
5.2 Universo	30
7.097 artículos científicos o trabajos de grado en idioma inglés y español de la base de datos Nature, Oxford academic, Sage journals, Scopus, Taylor and Francis Group y Google Scholar relacionados con polihidroxialcanoatos (PHA) y género <i>Bacillus</i>	30
5.3 Población	30
5.4 Muestra:	30
5.5 Criterios de inclusión:	30
5.6 Criterio de exclusión:	30
5.7 Herramienta estadística:	31
6. Resultados	33
6.1 Condiciones fisicoquímicas	44
6.2 Rutas metabólicas y enzimas empleadas en <i>Bacillus</i> spp.	46

6.3 Fuentes de carbono alternativas.	48
6.4 Extracción y tratamiento de PHA	48
6.5 Limitaciones y beneficios de la producción de PHA	49
7. Discusión	52
8. Conclusiones	54
9. Referencias bibliográficas	55

1. Resumen

Los plásticos de origen petroquímico son usados deliberadamente y su demanda ha aumentado, lo que ha generado más residuos que afectan el medio ambiente debido a la demora en su degradación y emisión de toxinas. Estos residuos llegan a corrientes hídricas y causan daños en los animales.

Por eso, se han estudiado los PHA; plásticos biodegradables producidos por bacterias y hongos gracias a su metabolismo y genética. Uno de los microorganismos con esta capacidad es *Bacillus* spp. Estos biopolímeros son biodegradables y producen moléculas benéficas para el suelo, pero no son viables para la industria debido a sus altos costos de producción por requerir fuentes de carbono ricas en carbohidratos.

Se realizó una revisión sobre la producción de plásticos biodegradables a partir de diferentes fuentes de carbono por medio del *Bacillus* spp. Donde se describe el proceso metabólico y genético que realiza este microorganismo. Asimismo, la implementación de diferentes fuentes de carbohidratos alternativas como lo son residuos de la industria agrícola y alimentaria, para poder proporcionar alternativas sostenibles y que reduzcan costos a la industria de los plásticos. Tras la revisión bibliográfica de 53 artículos de diferentes bases de datos reconocidas, se concluye que el género *Bacillus* spp, tiene gran potencial variando las condiciones fisicoquímicas como la temperatura, pH, relación carbono nitrógeno y fuente de carbono fermentable con el que se desarrolle. Se ha registrado el uso de residuos industriales tales como aceite de canola y residuos de uva, como carbohidrato fermentable.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, polihidroxicanoatos (PHA), biopolímeros, gen de la PHA sintasa, plásticos petroquímicos

2. Abstract

Plastics of petrochemical origin are used deliberately and their demand has increased, which has generated more waste that affects the environment due to the delay in its degradation and the emission of toxins. These residues reach water currents and cause damage to animals.

For this reason, PHAs have been studied; biodegradable plastics produced by bacteria and fungi thanks to their metabolism and genetics. One of the microorganisms with this ability is *Bacillus* spp. These biopolymers are biodegradable and produce beneficial molecules for the soil, but they are not viable for the industry due to their high production costs as they require carbon sources rich in carbohydrates.

A review was carried out on the production of biodegradable plastics from different carbon sources by means of *Bacillus* spp. Where the metabolic and genetic process carried out by this microorganism is described. Likewise, the implementation of different sources of alternative carbohydrates such as residues from the agricultural and food industry, in order to provide sustainable alternatives that reduce costs to the plastics industry. After the bibliographic review of 53 articles from different recognized databases, it is concluded that the genus *Bacillus* spp has great potential by varying the physicochemical conditions such as temperature, pH, carbon nitrogen ratio and fermentable carbon source with which it develops. Industrial residues such as canola oil and grape residues have been reported for use as a fermentable carbohydrate.

Keywords: *Bacillus cereus*, polyhydroxyalkanoates (PHA), biopolymers, PHA synthase gene, petrochemical plastics

3. Introducción

Los plásticos convencionales se han desarrollado desde la antigüedad para poder solucionar diversos problemas que afectan a la humanidad. Por tal razón, las industrias se han dedicado al mejoramiento de estos productos, desarrollaron fórmulas que permiten obtener mayor volumen de plástico a un menor precio¹. Sin embargo, estos compuestos, por su origen sintético, su degradabilidad es cuestionada pues es demorada y al realizar este proceso generará partículas tóxicas para el medio ambiente². La inadecuada disposición de estos residuos en diversos ecosistemas puede alterarlos, ocasionando serios problemas y afectaciones en la flora y fauna.

Debido a esto, una gran cantidad de investigaciones se han desarrollado buscando alternativas sostenibles que puedan reducir los efectos del plástico y crear productos que puedan llegar a reemplazarlo. Los polihidroxicanoatos son uno de estos descubrimientos, donde se han encontrado microorganismos tales como bacterias pueden producirlo en su interior. Una de las grandes ventajas del polímero es su biodegradabilidad².

Los costos de producción de los polihidroxicanoatos a partir de microorganismos son elevados y los tiempos que conlleva la producción son extensos. Por ello, se han buscado alternativas sostenibles usando otras fuentes de carbohidratos no necesariamente sintéticos, como por ejemplo, los residuos de las industrias agrícolas y alimentarias, y poder reducir el costo de producción de estos bioplásticos³.

Bacillus spp es uno de los microorganismos más conocidos en la producción de polihidroxicanoatos. Por ello se estudiarán los factores fisicoquímicos que influyen en el crecimiento del microorganismo y la producción de bioplásticos tipo PHA en el género *Bacillus* spp³.

4. Objetivo

4.1 Objetivo general

Realizar una revisión sistemática sobre producción de plásticos biodegradables a partir de *Bacillus* spp. variando diferentes condiciones fisicoquímicas tales como la temperatura, el pH, la relación carbono nitrógeno y la fuente de carbono fermentable del medio.

4.2 Objetivos específicos

- Analizar la influencia de los factores fisicoquímicos en la producción de bioplásticos tipo PHA en el género *Bacillus* spp., mediante la investigación y el uso de diversas herramientas de literatura y tecnología.
- Describir el proceso metabólico y genético que lleva a cabo *Bacillus* spp para integrar diferente fuente de carbono, incluyendo las enzimas y vías metabólicas involucradas y las condiciones óptimas para su crecimiento.
- Analizar el proceso de aprovechamiento de fuentes de carbono para la producción de polihidroxicanoatos, incluyendo las etapas de extracción, purificación y transformación, así como los beneficios y limitaciones de este proceso para la producción sostenible de bioplásticos.

3. Antecedentes

La Federación de Sociedades Europeas de Microbiología¹ en 1992, menciona la producción de polihidroxicarboxilatos (PHA), los cuales son compuestos poliésteres producidos por microorganismos. El más estudiado y simple de los PHAs es el polihidroxibutirato (PHB). La ventaja de estos poliésteres es que se degradan en el suelo siendo beneficioso para futuros cultivos o plantas cercanas. Este polímero, como se mencionó anteriormente, es creado por microorganismos que pueden sintetizar bioplásticos; los cuales tienen la capacidad de almacenarlo dentro de sí mismo hasta un 80% más de su mismo peso.

En el año 2002 Borah², se dedicó a la optimización de condiciones nutricionales y ambientales para *Bacillus mycoides* con el objetivo de mejorar la producción de polihidroxibutirato. En este estudio Borah utilizó diferentes fuentes de carbohidratos fermentables para el microorganismo y así mismo sus diferentes condiciones químicas como suplementos de nitrógeno, sodio y la aireación. Se estableció que la disminución de producción de PHB se da por exceder el tiempo de incubación de las bacterias después de llegar a su fase de reposo, ya que usarán el PHB como fuente de energía y carbono. En esta investigación sus autores establecen tres funciones de gran importancia que cumple la fuente de carbono: es una fuente de carbono para la síntesis de biomasa, una fuente de energía para la biosíntesis y el mantenimiento celular, y como consecuencia, permite la polimerización de PHB. El uso de fuentes de nitrógeno promueve el rendimiento y la productividad de PHB, por tal razón se buscan diversas alternativas económicas y de calidad.

Moreno³, en el año 2006, estandarizó una técnica de recuperación de biopolímeros presentes en la bacteria *Pseudomonas putida*, por medio de hipoclorito de sodio y cloroformo. Estas sustancias buscan degradar el material celular y poder solubilizar el polímero, para así poder lograr una excelente extracción de éste. Dentro del artículo se estudia la calidad del plástico que se obtiene variando diferentes concentraciones de hipoclorito-cloroformo, temperatura y tiempos. Para poder obtener el 96% de pureza en el biopolímero se recomienda que la concentración de hipoclorito sea del 5.0% p/v, su tiempo de extracción sea 60 minutos a 60 °C para conservar su peso molecular.

En ese mismo año Madigan⁴, aisló microorganismos del género *Bacillus* spp de un lago, donde planteó como hipótesis la producción de plásticos usando melaza de soya como fuente de carbono fermentable para las bacterias. Cabe resaltar, que la producción de los plásticos que se han abordado a lo largo del proyecto no es de fácil implementación, ya que la materia prima suele ser muy costosa, razón por la cual, se estudian las posibilidades de usar restos vegetales industriales con disponibilidad de nitrógeno como glutamato, aspartato, glutamina y urea con el fin de reducir los costos. Madigan determinó que el tiempo de crecimiento de las bacterias es mínimo de 24 horas a pesar de las condiciones anóxicas, al momento de observar en el microscopio se evidencia presencia de esporas. Las especies de *Bacillus* aisladas, brindaron resultados superiores

al crecimiento de los cultivos registrados en la literatura por géneros utilizados a nivel industrial como lo es la bacteria *Alcaligenes* spp.

En el año 2008, González⁵, realiza el aislamiento de *Bacillus* obtenido de aguas marinas el cual tiene la capacidad de sintetizar PHA. Asimismo, explica las características y las condiciones necesarias tanto para la producción de biomasa, como la producción del polímero (sacarosa, glucosa, peptona y extracto de levadura). Al momento de realizar la extracción de bioplástico intracelular, implementa dos métodos diferentes; por medio de extracción por solventes y extracción química por digestión, donde recomienda el uso de solventes para no alterar la producción de polímeros, en cuanto a la concentración de nitrógeno se observó un mejor crecimiento a una concentración 1.0 g/L.

En el año 2013, González et al⁶ explica el proceso de síntesis de poliésteres por algunos microorganismos los cuales se sintetizan de manera intracelular como reserva de carbono y de energía. Dentro de los polímeros obtenidos está el ácido hidroxialcanoico (producido por bacterias, arqueas y microalgas). En las investigaciones se logró observar el crecimiento de gránulos, los cuales se formarán en el citoplasma de dichas bacterias, sin embargo, existen condiciones que determinarán la cantidad de producción de estos gránulos de PHA al interior de la célula. Este tipo de plástico biodegradable es respuesta a necesidades de la industria biomédica, agricultura, productos higiénicos y empaques. Actualmente, en latinoamérica, México y Brasil son pioneros en la utilización de este plástico gracias a la empresa Biocycle.

Pradhan⁷ en el año 2014, separa en dos grupos las bacterias productoras de PHA según su alimentación, el primer grupo son aquellas que requieren limitaciones de nutrientes esenciales como *C. necator* o *Protomonas extorquens* y el segundo son aquellas que no requieren limitaciones en su nutrición como una cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*, *E. coli* recombinante y *Bacillus cereus*. Este último fue aislado de residuos de la ciudad de Rourkela en la India. *B. cereus* se sembró utilizando distintas fuentes de carbono como dextrosa, lactosa, sacarosa, maltosa, fructosa y galactosa por 3 días a 37°C a 150 r.p.m en un agitador rotatorio. Posteriormente extrajo el PHA con hipoclorito de sodio y se utilizaron diferentes técnicas de caracterización como espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (XRD). Al tener estos resultados, se menciona que este plástico es quebradizo y sugiere la combinación con otros polímeros para poder mejorar su calidad. Se pudo evidenciar, que la implementación de la maltosa como fuente de carbono generó mayor producción de biomasa y bioplástico, respectivamente 0,097g/2 ml y 0,563g/100 ml.

En el año 2015, Lemos⁸ especifica los beneficios de los polihidroxialcanoatos, ya que se posicionan a nivel industrial debido a su variedad farmacéutica, biomedicina, de alimentos, embalaje, entre otras., por tal razón se escoge al momento de empaque diversos productos. Estos biopolímeros se desarrollan de manera intracelular en microorganismos, medio de un proceso denominado polimerización de ácidos hidroxialcanoatos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoato), con el

grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster; de ahí que reciben el nombre de biopolíesteres. Establece cómo a partir de las variaciones en la cadena lateral o el radical se van a presentar variaciones en sus características y con ello se genera una clasificación.

En ese mismo año Muhammadi⁹, afirma que el PHA será la nueva generación de polímeros, en este escrito la autora explica la estructura de este polímero, la detección de bacterias que pueden producir el plástico, la diversidad que se encuentran en estas bacterias, la síntesis, la formación *in vitro* e *in vivo* de estos gránulos, la estructura, sus diversos métodos de extracción, la biodegradabilidad, sus propiedades físicas y también como podría sustituir los plásticos de origen petroquímico en las diversas industrias.

Posteriormente, en el año 2019, Mohammed¹⁰, aisló bacterias de un vertedero de plásticos y a partir de ellas produce polímeros intracelulares. Dentro de sus objetivos estuvo evaluar el aislamiento de las bacterias productoras de PHA y confirmar la acumulación de plástico intracelular por medio del uso de tinciones como es el negro de Sudan y la coloración con azul de Nilo y rojo de Nilo, identificar y caracterizar las bacterias utilizando pruebas bioquímicas y 16rRNA y por último evaluar su eficiencia como fuente de carbono, para así mismo poder extraer el polímero. En esta investigación se pudo aislar bacterias del género *Bacillus* sp. BPPI-14 y *Bacillus* sp. BPPI-19 usando D-fructosa, glucosa, melaza, D-ribosa y glicerol puro como fuente de carbono, obteniendo de la glucosa $49.5 \pm 2.79\%$ de polihidroxialcanoatos y con una $49.5a \pm 2.79\%$ de productividad de polihidroxialcanoatos.

Bhagowati¹¹ publicó en 2015. Donde menciona que el poli- β -hidroxibutirato es una reserva de lípidos intracelulares que acumulan muchas bacterias. *Bacillus cereus* SE-1 aislada del suelo, mostró más células acumuladoras de PHB que *Bacillus* sp. marino. SE-1. Por lo tanto, mezclar PHB con otros polímeros mejora económicamente sus propiedades mecánicas. Durante este estudio, se utilizó almidón termoplástico para aumentar las propiedades mecánicas de la muestra de PHB. Mezclar PHB con otros polímeros beneficiará su reducción de costos, además de mejorar sus propiedades termoplásticas.

En el año 2021 Andler¹² publica, en el cual explica el proceso para la producción de bioplástico por medio de la bacteria *Bacillus cereus*, usando residuos de uvas como fuente de carbono. A lo largo del artículo, se desarrolla el proceso de incubación de la bacteria ya que primero realizó la hidrólisis del orujo de la uva para incubar las bacterias por 72 horas con fuentes de carbohidrato hidrolizado, otras directamente con el residuo vegetal y otra fue cultivada con glucosa como cultivo control. Explica el método de extracción de polímeros el cual fue hipoclorito cloroformo. Se realizó cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para realizar un análisis cualitativo del PHB extraído, se logró una concentración celular de $7,86 \text{ g L}^{-1}$ y una concentración de PHB de $4,03 \text{ g L}^{-1}$, donde se confirma la presencia de PHB metanolizado en las muestras analizadas.

En Singapur, Addagada L¹³ en el 2022, menciona una prometedora alternativa que ofrecen los biopolímeros para reducir la contaminación ambiental causada por los residuos plásticos. Resalta su naturaleza similar al caucho y características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, ecológicas, renovables y producidas biológicamente las cuales son una gran ventaja. A pesar de que el alto costo de producción y bajo rendimiento pueden limitar su producción a gran escala, por ende numerosos investigadores están trabajando en la utilización de fuentes de carbono basadas en residuos o subproductos y en la explotación de microorganismos genéticamente modificados para resolver estos problemas o modificaciones a los medios y condiciones de cultivo, por ellos indica dos factores imprescindibles para poder desarrollar esta biotecnología, como es la proporción de carbono a nitrógeno (C:N) y al glicerina cruda presente en el medio de cultivo.

4. Marco teórico

4.1 Plásticos convencionales

Los plásticos son derivados del petróleo, que pueden ser moldeados por condiciones químicas y físicas gracias a las macromoléculas que lo componen, como se observa en la figura 1. Aunque en la antigüedad eran producidos por medio de fuentes naturales. En el transcurso del tiempo, se desarrollaron diferentes métodos para lograr realizar la producción a escala y diversificar sus usos, con características más tenaces¹⁴. La unión de la calidad, variedad y bajos precios generó un incremento en la demanda de este producto alrededor del mundo. Tal ha sido, que se puede encontrar en la mayor cantidad de objetos y lugares que se usa en la vida diaria como envases de productos de aseo personal, implementos de cocina, bolsas, entre otros usos¹⁵.

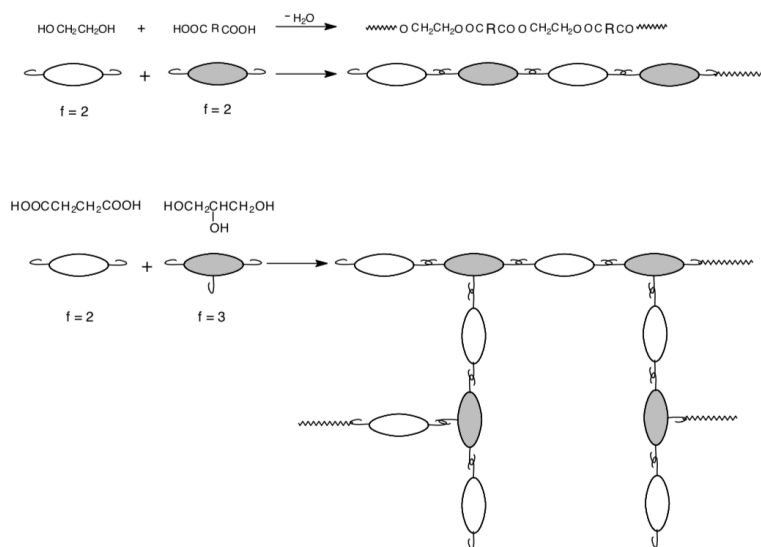


Figura 1: Estructura de los polímeros en función de la funcionalidad de los monómeros.

Fuente: Carrasquero FL. 2005

4.1.1 Historia

Los polímeros desde la antigüedad se han estado estudiando con el fin de poder dar soluciones a las necesidades de los humanos. El látex fue descubierto por pueblos americanos y usado para la creación de pelotas, esto atrajo las miradas de los europeos y países del primer mundo. Tras el descubrimiento de la vulcanización se desarrolló la industria del caucho y a lo largo del siglo XIX se dieron los descubrimientos de la nitrocelulosa, el colodión, el celuloide y la dinamita. En el siglo XX, ocurrieron avances importantes como la reacción entre el fenol y el formaldehído para poder dar lugar a la resina termoestable, donde los científicos creyeron que los polímeros eran agregados moleculares y

tenían como resultado fuerzas de atracción las cuales mantenían unidos los componentes¹⁶.

En la década de los 30's el científico Du Pont Wallace Hume Carothers logra obtener la primera fibra sintética denominada Nylon y desde ese punto hubo una aceleración en los descubrimientos e investigaciones orientadas a la síntesis del plástico¹⁶.

4.1.2 Clasificación del plástico¹⁸

Los polímeros se han estudiado en tal medida que han permitido tener toda una gama de características para escoger dependiendo de su origen y sus usos. Como se puede resumir en el mapa conceptual de la figura 2.

4.1.2.1 Origen¹⁷

- **Naturales:** Son todos aquellos que provienen directamente de un reino vegetal o animal, por ejemplo: la seda, la lana, el algodón, la celulosa, el almidón, el caucho natural como el látex, entre otros.
- **Sintéticos:** Son aquellos que son producidos por el hombre y derivados del petróleo, carbón o gas natural.
- **Semisintéticos:** Se definen como los polímeros que son el resultado de una mezcla entre polímeros sintéticos y biológicos

4.1.2.2 Estructura molecular¹⁷

Los polímeros son uniones de monómeros que posteriormente formarán macromoléculas y según sus enlaces se podrá clasificar en:

- **Lineal:** Está formado por cadenas largas de macromoléculas no ramificadas y tiene el mismo tipo de unión, son consideradas cadenas principales de donde se derivan las cadenas secundarias.
- **Ramificadas:** Son las cadenas laterales que están conectadas a la cadena principal.
- **Entrecruzadas:** Es el producto de la formación de enlaces covalentes entre cadenas principales adyacentes en diferentes posiciones.
- **Homopolímeros:** Se definen como la unión de monómeros que lo constituyen son iguales.
- **Copolímeros o heteropolímeros:** Se clasifica así a la unión de dos o más monómeros diferentes.

4.1.2.3 Respuesta termo-mecánica¹⁸

La respuesta termomecánica de un plástico está relacionada con su comportamiento ante cambios de temperatura y cargas mecánicas aplicadas. Este fenómeno está directamente influenciado por la estructura química y la morfología del plástico.

- **Termoplásticos:** son polímeros que molecularmente están formados por cadenas lineales y de alto peso molecular. Por ello, al momento de aplicar calor al polímero tiene características plásticas, es decir se deforma; pero no se modifican sus enlaces moleculares. De tal manera que son plásticos que se pueden volver a dar diferentes formas sinnúmero de veces. Por ejemplo los polietilenos (PE), polipropileno (PP), poliéster (PET), poliamida o nylon (PA).
- **Termorrígidos:** Son polímeros termoestables que han sido sometidos a un proceso llamado degradación, que por diferentes métodos los cuales generan interrupciones entre los enlaces covalentes producen los radicales libres, este proceso causa la unión entre cadenas adyacentes formando una especie de malla y esto los hace más resistentes; estos plásticos no puedan ser reprocesados. Por ejemplo poliuretano, y algunos tipos de resinas.
- **Elastómeros:** son aquellos polímeros que cuentan con estructura molecular lineal o reticular, estos forman cadenas largas las cuales son ordenadas de manera en la que se enrollan entre sí, en caso de que se genere una fuerza de un agente externo estas cadenas se extiende de manera que brindan elasticidad, pero cuando se elimina la fuerza del agente externo vuelve a su forma inicial de manera instantánea. No se pueden derretir o cambiar su estado físico debido a su composición. Por ejemplo el caucho o las siliconas.

4.1.3 Marco Legal

Colombia contaba con un retraso en políticas públicas que protejan al medio ambiente frente a su disposición y limiten la fabricación y el uso de plásticos de origen petroquímico. En 2018, se presentó un proyecto de ley el cual buscaba regular la fabricación, comercialización y distribución de elementos de un solo uso para el consumo de alimentos y bebidas, con el fin de reducir el impacto negativo que generan estos productos en los ecosistemas acuáticos y el medio ambiente en general. Donde el derecho al medio ambiente ha sido vulnerado por el uso de plásticos de un solo uso. También menciona cómo diferentes actores del medio ambiente se ven afectados por el mal uso de estos productos¹⁹. En el año 2022 se aprobó la ley 2232²⁰, la cual tiene por objeto resguardar la salud de los ciudadanos y del goce del medio ambiente. Se establecen medidas para reducir la producción y consumo de plásticos de un solo uso. En este documento legal se mencionan diferentes sustituciones graduales para poder adoptar alternativas sostenibles, también se establecen tiempos para poder eliminar su uso y especifican en qué lugares no se puede hacer uso de plásticos de un solo uso.

4.2 Biopolímeros

Se trata de plástico producido a partir de materias primas renovables o de origen orgánico. Por ello, al finalizar su vida útil algunos se suelen convertir en materia orgánica, su tiempo de degradación es corto y además de ello puede generar nutrientes. El tratamiento de los plásticos convencionales como el soplado, extrusión e inyección suelen ser usados en estos. La demanda de estos plásticos ha sido impulsada ya que al poder degradarse disminuye la producción de residuos por los humanos. No obstante, por sus diferentes formas de producción su valor tiende a incrementar un poco, en contraposición, brinda soluciones ecológicas. Se debe tener en cuenta que los biopolímeros se clasifican según su forma de síntesis^{1,22,22}.

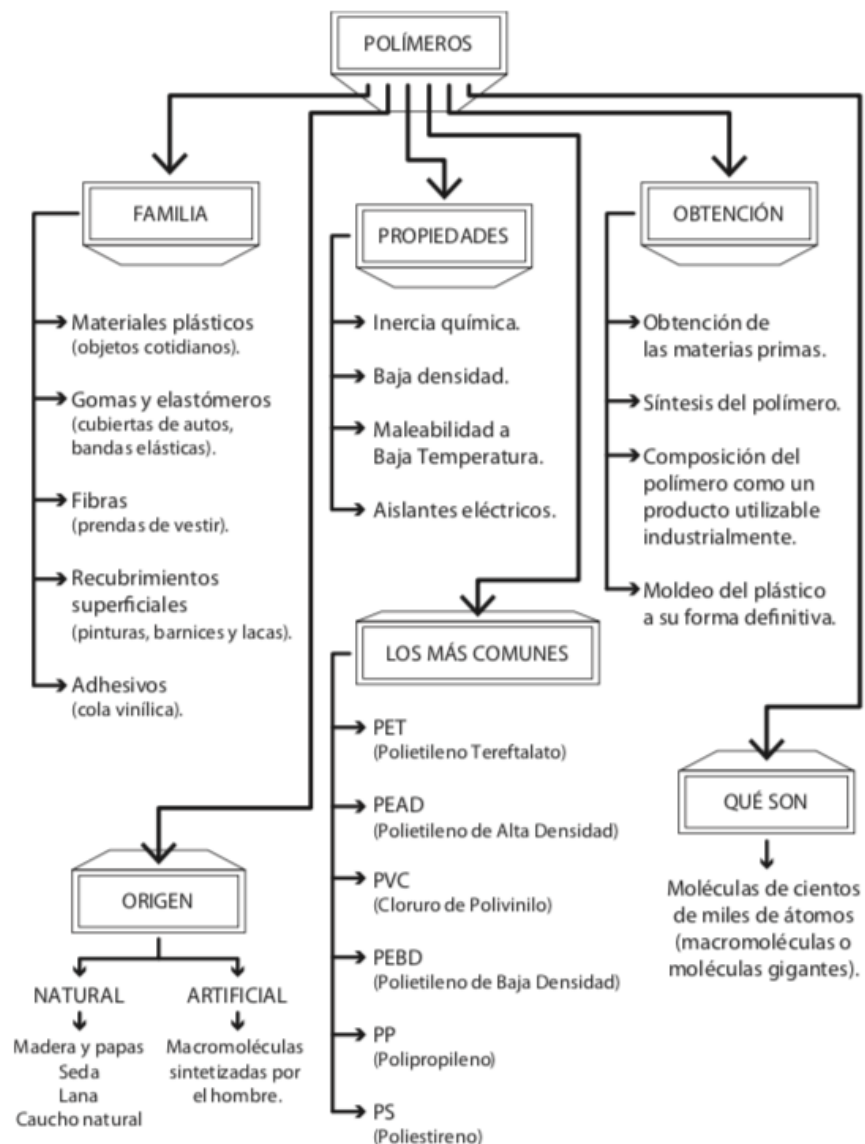


Figura 2: Clasificación de los polímeros.

Fuente: Carrasquero FL. 2005

4.2.1 Clasificación de los biopolímeros

- **Polímeros bio quimiosintéticos²¹:** los monómeros son sintetizados naturalmente y químicamente se polimerizan. Un ejemplo de ellos es el *Poli(ácido láctico) (PLA)*, el cual es un plástico sintético termoplástico, producido a partir del ácido láctico por fermentación anaerobia de substratos que tengan carbono ya sea de monosacáridos como la glucosa o polisacáridos como el almidón. Estas moléculas (PLA) son producidas por bacterias y hongos gracias a un proceso denominado polimerización por condensación, el cual utiliza temperaturas mayores de 12 °C o catalizadores químicos²², esto con el fin de obtener polímeros de bajo peso molecular. El PLA se caracteriza porque sus propiedades mecánicas son buenas en comparación con otros polímeros termoplásticos (PET). Gracias a ello, es usado en envases de grasas y aceites; también es usado en aplicaciones biomédicas gracias a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Este producto es altamente biodegradable⁶, en condiciones controladas como temperatura y humedad una película de P3HB se demora 5 días en degradar el 90%,(produciendo dióxido de carbono y agua), sin producir moléculas cancerígenas⁶.
- **Polímeros biosintéticos:** Son los plásticos que se desarrollan en el interior de las células bacterianas como reserva de energía. Su proceso de unión de monómeros y polimerización se dan en el citoplasma, necesitan una modificación química y/o física para poder mejorar su estructura, propiedades térmicas o mecánicas. Es totalmente biodegradable y presenta degradación enzimática o hidrolítica sin producir desechos tóxicos para el ambiente⁹.
- **Polímeros naturales modificados:** son aquellos que están formados por una mezcla entre polímeros obtenidos a partir del almidón o la celulosa y plásticos convencionales con el fin de reforzar sus funciones entre sí y mejorar su proceso de biodegradación. Desafortunadamente, estos biopolímeros no suelen ser biodegradables, ya que hay microorganismos que tiene la capacidad de degradar el almidón o la celulosa lo cual ayuda en la reducción del tiempo de degradación parcial, ya que los productos de la degradación del almidón o de la celulosa son recalcitrantes y pueden estar en el medio ambiente por períodos largos del tiempo⁶.

4.2.2 Polihidroxialcanoatos (PHA)

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros compuestos por ácidos hidroxialcanoatos (ver figura 3), algunas bacterias, arqueas y microalgas acumulan en el interior de su citoplasma rodeados de una monocapa de fosfolípidos, como material de reserva con el propósito de usar después como fuente de carbono y de energía¹, como se observa en la figura 4. Esto es un efecto de la polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos por las enzimas polimerasas y despolimerasas, las cuales mediante la condensación del grupo carboxilo de un monómero con un grupo hidroxilo de la

siguiente molécula formando un enlace éster, como evidencia en la imagen 3. Una de las condiciones por las cuales se sintetiza PHA en la bacteria es en respuesta a una limitación de elementos importantes para su supervivencia como lo son el nitrógeno, el potasio, el magnesio, el azufre o el oxígeno. El gránulo de PHA que se desarrolla en el interior de la célula está compuesto por una membrana de fosfolípidos donde se encuentran las enzimas de polimerasas y despolimerasas. En diferente literatura, afirman que el número de gránulos por célula se define en el en las etapas de acumulación y cuando la producción de este polímero alcanza cerca del 80% del peso celular se detiene (figura 5), por lo cual se puede afirmar que se evidencia restricciones físicas que impiden a la bacteria acumular mas plástico, sin importar que aun tenga disponibilidad de sustrato y la actividad enzimática esté activa^{6, 24}.

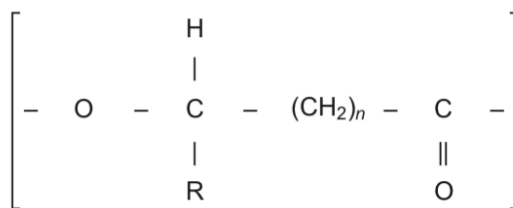


Figura 3: Estructura general de los PHA

Fuente: Lemos AC, Mina A. 2015

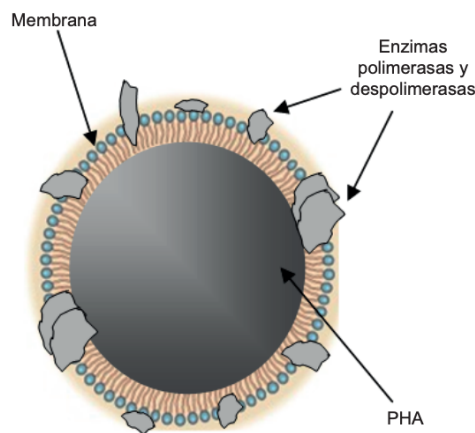


Figura 4: Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente. Se aprecia la membrana que lo rodea en la que se encuentran enzimas polimerasas y despolimerasas

Fuente: Lemos AC, Mina A. P 2015

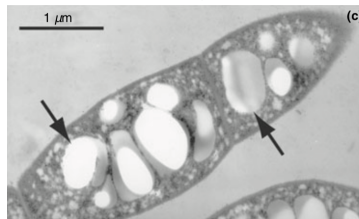


Figura 5: Micrografía electrónica de transmisión de sección delgada a través de una célula en división cultivada aeróbicamente en rafinosa. Obsérvese las inclusiones de PHA (flechas).

Fuente: Full TD, Jung DO, Madigan MT. 2006

La degradación aeróbica del PHA puede conducir a la mineralización completa de CO₂ y agua, y su degradación anaerobia podría generar metanol y posteriormente vender como combustible²³.

La implementación de estos plásticos, como ya lo mencionamos, son los costos¹ de la materia prima ya que inicialmente se usaba glucosa pura como fuente de carbono y los procesos de extracción y purificación del polímero por diversos métodos solían ser dispendiosos. Por tal razón, con el tiempo se ha propuesto implementar el uso de biomasa con alta presencia de carbohidratos como fuente de carbono fermentable para estos microorganismos²⁵.

4.2.2.1 Clasificación de PHA

Los PHA se pueden clasificar de acuerdo al tamaño de su cadena molecular. Sin embargo, es importante tener en cuenta que pueden presentar homopolímeros y copolímeros dependiendo la fuente de carbono y el microorganismo que esté en estudio²⁶. Como se observa en la figura 6.

- **PHA de cadena corta (PHA-scl):** es aquella que está compuesta por monómeros que tienen de 3 a 5 átomos de carbono. Son polímeros termoplásticos, es decir que pueden ser moldeables, los integra copolímeros para poder ser más versátiles.
- **PHA de cadena media (PHA-mcl):** está compuesta por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono, se denominan también amorfos lo que le da una clasificación de elastómero
- **PHA mixtos:** está compuesto por monómeros de cadenas cortas y cadenas media. una reducida población de bacterias tiene la capacidad de poder producir este.

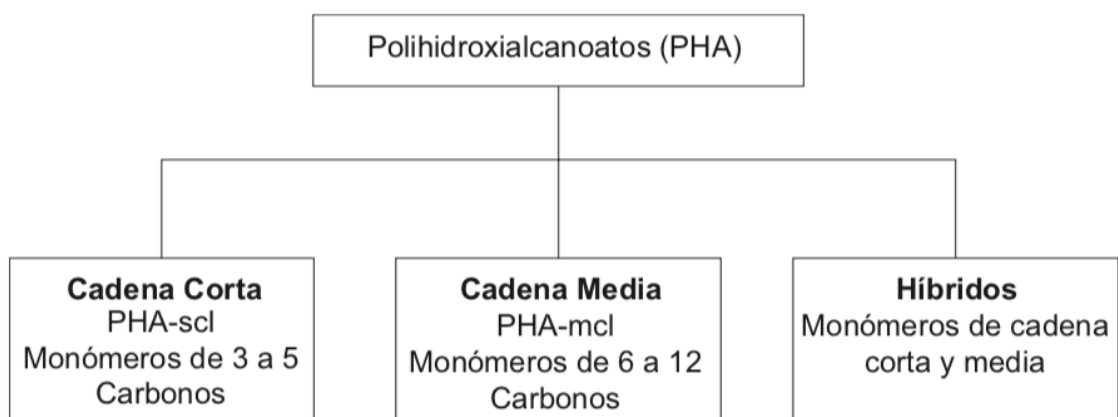


Figura 6: Clasificación de los PHA según su composición monomérica

Fuente: Lemos AC, Mina A. Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. 2015

4.2.2.2 Rutas de biosíntesis

La síntesis de PHA en bacterias está asociada con múltiples genes y rutas metabólicas, en las cuales la presencia de Acetil-CoA es crucial para la obtención de (R)-hidroxialcanoil-CoA. La elección de la ruta metabólica depende de la maquinaria enzimática y del sustrato utilizado, siendo los azúcares y los ácidos grasos las fuentes de carbono más comunes (Figura 7). Las principales enzimas que participan en la síntesis de PHA son *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaG* y *phaJ*²⁵. Lo más importante al momento de realizarse la síntesis del polímero, es el destino de la acetil-CoA, donde se puede usar como sustrato para la síntesis del P3HB o ser oxidada en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Este proceso es dependiente de las condiciones ambientales y especialmente de la limitación de oxígeno, ya que puede aumentar la relación de NADH/NAD. La citrato sintetasa y la isocitrato deshidrogenasa se inhibe por el NADH y por tal razón no entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, por lo cual es transformada a acetoacetil-CoA por la 3-cetotiolasa que a su vez es inhibida por CoA. Los microorganismos que tienen la capacidad de producir PHA de cadena corta normalmente solo pueden producir este tipo de PHA, sin embargo en caso de desarrollar microorganismos recombinantes se podrían obtener PHA de cadena corta, media e híbridas. diferentes autores relacionan la formación de PHA como un sumidero de poder reductor de las bacterias, lo cual actúa como un regulador redox en el interior de la célula.(Figura 8)

En la producción de PHA de cadena media genéticamente, están presentes los genes en el operon *phaC1zC2D*, los cuales codifican para la producción de dos polimerasa, una despolimerasa y la proteína PhaD. Las polimerasas tienen la función de catalizar la condensación de PHA de varios derivados de 3-hidroxiacil-CoA con cadenas entre 6 y 14 carbonos²⁸. Los intermediarios presentes en este proceso se obtienen por medio de una B-oxidación o por medio de otras rutas metabólicas se pueden generar los monómeros (Figura 9). La concentración de la enzima PHA sintetitaza en el sustrato juega un papel importante al momento provisionar 3-hidroxiacil-CoA tioesterasa la ruta metabólica, ya que esta enzima determina la masa molecular y la composición del biopolíester, que también se puede afectar por la presencia de despolimerasa, esterases y lipasas específicas que hidrolizan el polímero que ya ha sido acumulado, dentro de los factores que influyeron está el nivel de expresión de la proteína de PHA sintasa activa²⁹. El potencial metabólico del microorganismo y la especificidad de sustrato de la PHA sintetasa influyen estrictamente en la composición del PHA ya que se debe realizar la promoción de (R) 3-hidroxiacil-CoA tioésteres a partir de la de fuente de carbohidrato usado^{6,26,29}.

4.2.2.3 Microorganismos productores de PHA

Las bacterias más conocidas por esta características son *Ralstonia eutropha*, *Rhodobacter spp*, *Azospirillum spp*³¹, *Azotobacter spp*³², *Methylocystis spp*³³, *Leptothrix spp*³⁴, *Pseudomonas spp*³, *Rhizobium spp*, entre otras^{28,30,35}.

Bacillus megaterium, fue la primera bacteria productora de PHA descubierta en 1926 por Maurice Lemoigne, pero al pasar de los años la investigación de este tema ha sido mucho más profunda al punto que se han determinado más de 300 bacterias capaces de producir PHA. Sin contar que también se estudia que algunos hongos también tengan esta capacidad. En las bacterias no solo se limita a un tipo de bacteria, es decir que tanto bacterias Gram negativas y Gram positivas tienen estas características. Al tener gran variedad de bacterias productoras, también aumenta la variedad en cada plástico producido por ellas. Actualmente se realizan investigaciones para realizar mejoras genéticas o desarrollar microorganismos recombinantes para poder mejorar la producción, rapidez y eficiencia de este producto³⁰.

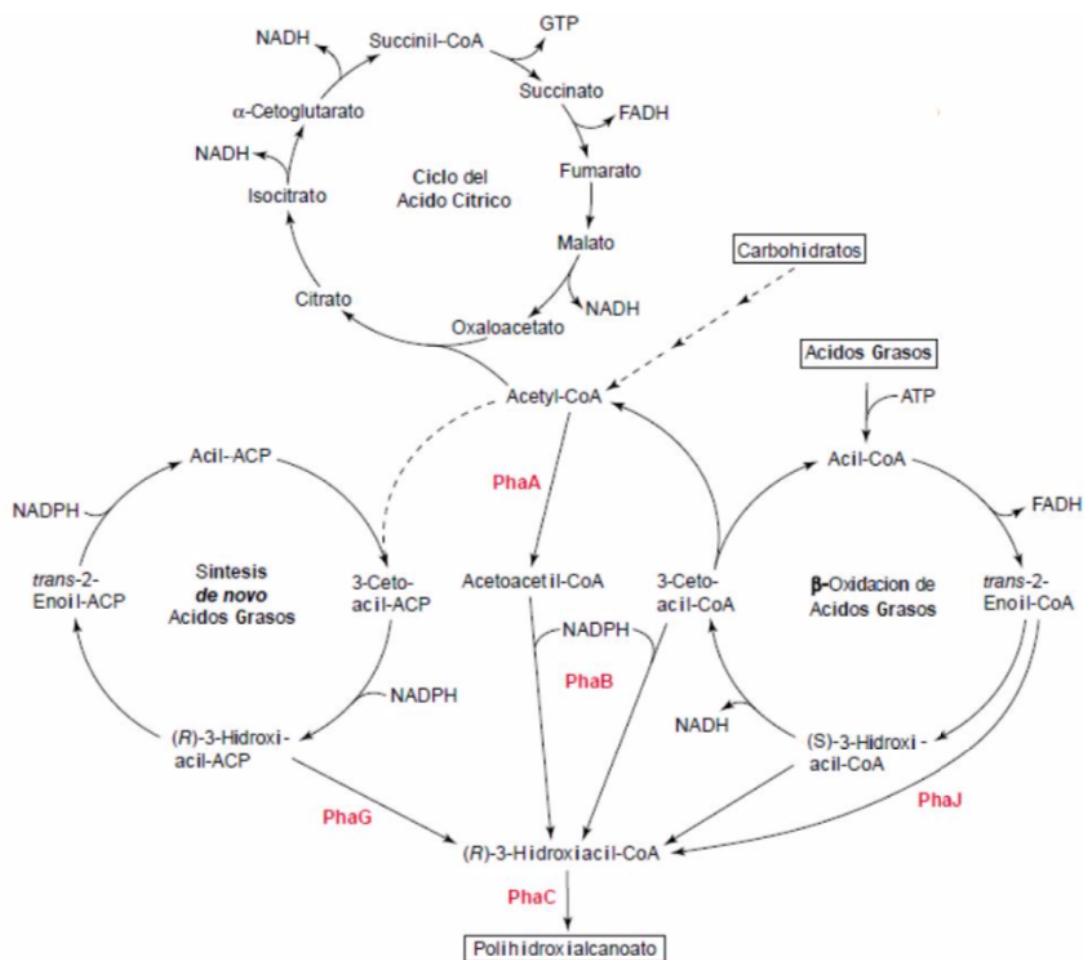


Figura 7: Biosíntesis de PHAs.

Abreviaciones: PhaA, 3-cetotiolasa; PhaB, (R)-3-cetoacil-CoA reductasa (para la biosíntesis de PHB, la enzima es acetoacetyl-CoA reductasa); PhaC, PHA sintasa o polimerasa; PhaG, (R)-3-hidroxiacil ACP: CoA transacilasa; PhaJ, (R)-específica enoil-CoA hidratasa. PhaC, específica para monómeros enantioméricos en la configuración [R].

Fuente: Otero-Ramírez ID. Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA's) en el departamento de Nariño, 2019

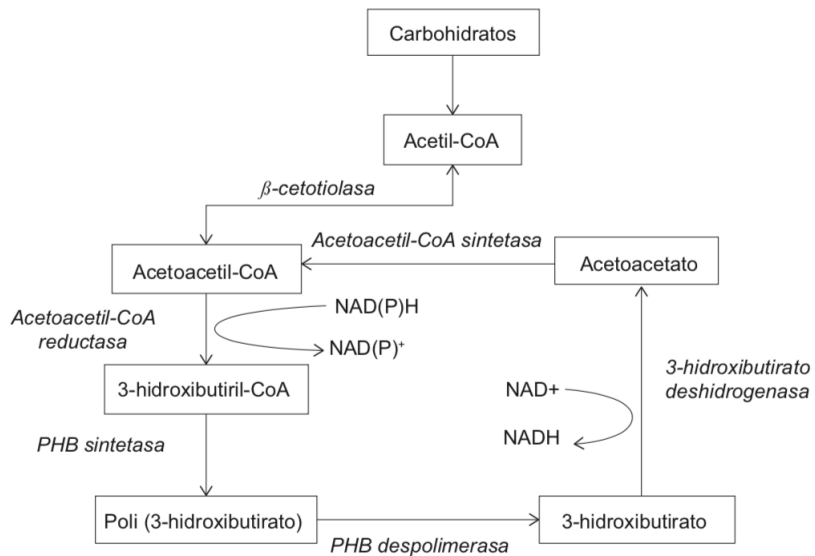


Figura 8: Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas implicadas en el proceso

Fuente: Lemos AC, Mina A. 2015

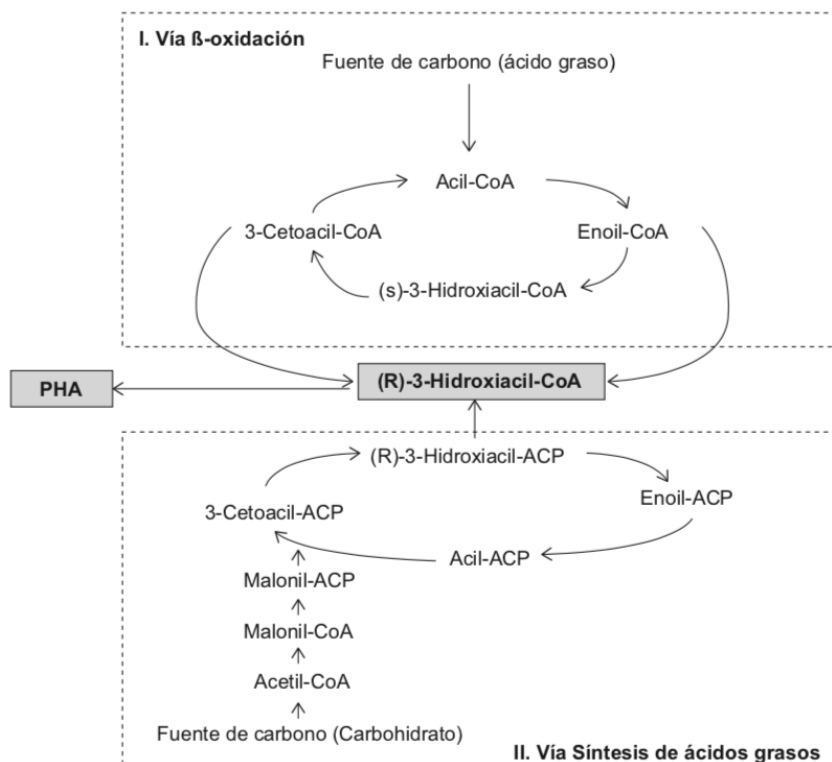


Figura 9: Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en Pseudomonas. Se presenta la vía a partir de ácidos grasos y a partir de carbohidratos

Fuente: Lemos AC, Mina A. 2015

4.2.2.3.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria que pertenece al género *Bacillus* spp, en el microscopio se observa como una bacilo gram positivo, anaerobio facultativo con motilidad, tiene la capacidad de producir esporas termotolerantes³⁶. Es de importancia clínica e industrial, ya que puede llegar a ser altamente virulenta para el ser humano, se puede ingerir por medio de alimentos que no han tenido un tratamiento térmico. Para evitar la contaminación por este microorganismo, se recomienda cocinar la comida por encima de los 50 °C. Este es un microorganismos que tiene la capacidad de sintetizar plástico biodegradable, ya que acumula en su citoplasma gránulos de PHA, sus cadenas son lineales y de bajo peso molecular ya que la energía de este microorganismo también es repartida para la producción de esporas. El polímero se da en condiciones de estrés es decir cuando tiene limitaciones en sus nutrientes esenciales. El bioplástico producido por *Bacillus cereus* tiene semejanza al plástico de origen petroquímico¹¹.

Para su proceso de crecimiento de PHA se han desarrollado diferentes investigaciones para poder determinar la viabilidad del uso de otras fuentes de carbono fermentable a partir de biomasa lignocelulósica, que se define como los desechos agrícolas, industriales y forestales que significan una potencial fuente de carbono renovable, además por sus procesamiento previo puede disponer de cantidades potenciales de azúcares reductores¹².

Es importante tener en cuenta, que las bacterias gram positivas tienen la presencia de una pared celular más gruesa y se requiere mayor energía y procedimientos más robustos para la extracción del PHA⁶.

4.2.2.3.2 Características genéticas de *Bacillus cereus*

En la producción y síntesis de PHA en bacterias se involucran tres enzimas reguladoras³⁷. Estas enzimas incluyen β -cetotiolasa, acetoacetyl-CoA reductasa y PHA sintasa/polimerasa, codificadas por *phbA*, *phbB* y *phbC*, respectivamente³⁸. La D(-)-3-hidroxi-butiril-CoA se forma cuando la reductasa interactúa con la enoil-CoA hidratasa o la epimerasa, o ambas. Por lo tanto, la presencia del gen *phbB* en ambos aislados sugiere que el grupo de genes *phb* media en la producción de PHA en ellos³⁹.

- Acumulación de precursores: La síntesis de PHA en *Bacillus cereus* comienza con la acumulación de precursores metabólicos como los ácidos grasos. Los ácidos grasos se sintetizan en las células a partir de moléculas de acetyl-CoA por la acción de enzimas como la acetyl-CoA carboxilasa y la acil-CoA sintetasa. Las acil-CoA sintetasas convierten los ácidos grasos en sus respectivos acil-CoA, que son sustratos para la polimerización de PHA.
- Polimerización: La polimerización de los monómeros de PHA se lleva a cabo por la acción de una enzima denominada poli(3-hidroxialcanoato) sintasa (PHAS). En *Bacillus cereus*, PHAS está codificado por el gen *phaC*, que forma parte del operón *pha* y contiene otros genes implicados en la síntesis de PHA,

como phaR, phaP y phaZ. PHAS utiliza acil-CoA como sustrato para catalizar la formación de enlaces de éster entre monómeros para generar cadenas de PHA.

- Acumular y almacenar: Una vez sintetizado, el PHA se almacena en gránulos intracelulares y se acumula en las células como almacenamiento de energía y carbono. Este proceso en *Bacillus cereus* está regulada por varios genes, incluidos los genes phaR y phaP. La proteína PhaR actúa como represor de la expresión génica del operón pha, mientras que la proteína PhaP es responsable de la formación y estabilización de las partículas PHA⁴⁰.

4.2.2.4 Técnicas de detección, cuantificación y caracterización del PHA

Desde la antigüedad, se utilizaba el colorante negro de Sudan B ya que es lipofílico, donde los colorantes se mezclan con lípidos celulares y los tiñen. De manera posterior, se desarrollan tinciones con mayor afinidad y especificidad en compuestos de naturaleza lipídica, como lo es el azul Nilo A este es un colorante simple el cual permite diferenciar los diferentes tipos de grasa y ésteres de colesterol frente a ácidos grasos libres y fosfolípidos, este genera una fluorescencia naranja a una longitud de onda de 460 nm. La coloración Rojo nilo es una opción ideal para poder observar las inclusiones intracelulares, donde también se observa una fluorescencia de amarilla a dorada o de rosa a roja, dependiendo la longitud de onda.

Otros métodos son la espectrofotometría (FT-IR), método gravimétrico, espectrofotometría, cromatografía de gases, cromatografía iónica, cromatografía de gases acoplada a masas, cromatografía de filtración en gel, calorimetría diferencial de barrido y resonancia magnética nuclear^{6,37}.

4.2.2.5 Fermentación para producir PHA

Dentro del proceso de fermentación se dividen en dos tipos de microorganismos ya que las condiciones del medio de cultivo varían. Dentro del primer grupo se encuentran los microorganismos que requieren la limitación de un nutriente esencial, como el nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio y oxígeno, así generar el PHA por un exceso de fuente de carbohidratos. Para este tipo de bacterias se realiza en dos etapas, donde en la primera etapa no se limitan nutrientes hasta obtener la concentración de biomasa deseada y posteriormente se realiza la segunda etapa donde se promueve la síntesis de PHA manteniendo las limitaciones de las sustancias esenciales, durante esta etapa no se espera crecimiento de biomasa sino acumulación intracelular del polímero. En algunos casos solo basta la presencia de glucosa para continuar con la síntesis de PHA o en las bacterias producen PHA de manera más eficiente cuando uno de los nutrientes está limitado, pero no completamente consumido.

El segundo grupo de bacterias son aquellas que pueden lograr la producción de PHA en altas cantidades, de manera que el lote solo sea alimentado en una sola etapa, esta acumulación de polímeros se da en la fase de crecimiento^{2,6,41, 42, 43}.

- Relación Carbono nitrógeno (C/N)

La relación carbono-nitrógeno es una de las relaciones más importantes para entender cómo los organismos interactúan con su entorno. Los organismos utilizan diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para sintetizar compuestos orgánicos esenciales para su crecimiento y supervivencia. La relación C/N también puede afectar la calidad de los suelos y la disponibilidad de nutrientes para las plantas. Además, la relación C/N puede variar en diferentes entornos y en diferentes momentos, lo que puede afectar el crecimiento y la reproducción de los organismos. Por lo tanto, comprender la relación C/N es esencial para comprender las interacciones en los ecosistemas y la producción de alimentos²⁷. La formación de glutamato a partir del oxoglutarato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos conecta el metabolismo del nitrógeno y del carbono, permitiendo la síntesis de moléculas orgánicas que contienen tanto nitrógeno como carbono. Sin embargo se ha encontrado que en situaciones de bajos niveles de oxígeno, el excedente de la fuente de carbono que no se utiliza puede ser almacenado como PHA en el interior de la célula^{5,42}.

4.2.2.5.1 Fuentes de carbono alternativas

La utilización de bacterias para producir PHA a partir de residuos vegetales industriales es una solución prometedora para reducir los altos costos de la biotecnología. Los subproductos agrícolas y forestales, así como los de la industria alimentaria y de biocombustibles, se están utilizando como fuentes de carbono alternativas para la síntesis de PHA. Este enfoque sostenible no solo reduce los costos de producción, sino que también contribuye a disminuir la cantidad de residuos generados, lo que es un paso importante hacia la producción de plásticos biodegradables y la mitigación de la contaminación ambiental¹³.

Al comprender que bacterias pueden desarrollar diferentes vías metabólicas productoras de PHA dependiendo la enzima que presentes, se puede establecer o postular una variedad de residuos industriales como fuentes de carbono ya sean compuestos por carbohidratos propios o ácidos grasos^{29, 44}. Por ejemplo, aceite de canola, aceites usados de palma, melaza de remolacha, subproductos de lácteos, caña de azúcar, residuos de uva, glucosa¹², oligosacáridos de melaza de soja⁴, mucílago de café³⁴, lodos residuales⁴³, entre otros^{45,46,47,48,49, 50}.

4.2.2.6 Extracción del PHA

La extracción de PHA es uno de los pasos más importantes, sin embargo, también es uno de los procesos que generan mayor costo al momento de producir PHA y la estandarización de métodos son variables dependiendo tanto el microorganismo que está en estudio y el tipo de PHA que se haya producido¹.

Unos de los más usados son por medio de hidrocarburos clorados tales como cloruro de metileno, cloroformo, triclorometano o dicloroetano, suele ser usado para la extracción de PHA de cadena corta. Sin embargo, un inconveniente que hay es la viscosidad del

PHB ya que está por encima del 5% (p/v) lo que dificulta la eliminación de restos celulares. En cuanto a los PHA de cadena media son solubles en un rango más amplio, esta técnica es costosa, por tal razón no es de preferencia en las industrias.

Se ha indagado en otras opciones como lo son el etilen o propilen carbonato o métodos donde por medio de la ruptura de las celular por hipoclorito de sodio ya que este puede digerir componentes celular diferentes al polímero y con ayuda del cloroformo solubiliza los gránulos liberados y de tal manera lo protege de la actividad degradativa. El tiempo, la temperatura y concentración de estos compuestos deben ser estandarizados según el microorganismo usado¹.

Otra alternativa en la que se ha estudiado es uso de enzimas como lisozima, alcalasa y fosfolipasas que combinadas con elementos que tiene actividad superficial pueden degradar los componentes celulares distintos al polímero, sin embargo su desventaja en la baja pureza que tendría el producto³

4.2.2.7 Biodegradación del PHA

Gracias a la composición monomérica de los PHA es altamente susceptible a la biodegradación. Estos pueden ser degradados por una amplia gama de microorganismos, hasta el punto de producir dióxido de carbono, agua o metano, en diferentes condiciones tanto aerobias como anaerobias, sin la formación de sustancias tóxicas. El tiempo de degradación es variable, las temperaturas mesofílicas son las ideales para poder llevarse a cabo este proceso, debido a que aumenta la biodisponibilidad y solubilidad de estos productos haciéndolos más sensibles al ataque enzimático permitiendo una rápida degradación. Un método altamente estudiado es el compostaje⁶.

4.2.2.8 Aplicaciones del PHA

El alto peso molecular de los PHA han logrado entrar a competir en el mercado de plásticos donde está muy posicionados los plásticos sintéticos, no obstante, estos polímeros al ser manejables como un polímero de origen petroquímico ha podido llegar a abordar múltiples esferas de la industria. Es por ello que es candidato para la industria de empaques, medicina, farmacia, agricultura, alimentos y como materia prima para la producción de pinturas. Suelen ser usados como recipientes para envasar el shampoo, productos alimenticios, productos de cuidado personal, productos desechables (pañales) y cubiertos desechables. Uno de sus productos se suele usar como látex fibroso para recubrir el papel o cartón. En la agricultura no requiere un alto grado de purificación y por esta razón pueden facilitar su extracción. En la industria de alimentos si puede reemplazar el PET, puede usarse recubierta para quesos^{26,48, 51}.

El descubrimiento de este biopolímero significa un gran hito y un avance a las industria biomédica ya que son biocompatibles con los tejidos del ser humano. Un ejemplo de su aplicación es la sustitución de hilos de sutura, sustitutos pericárdicos y sistemas de liberación de medicamentos, ya que al momento de ser implantado este material en el

cuerpo se hidroliza en metabolitos compatibles. También son usados como material osteosíntesis de fijación para estimular la formación del hueso^{6,8,51, 52}.

5. Diseño metodológico

5.1 Tipo de estudio

Revisión documental de tipo descriptivo y analítico. Se tuvieron en cuenta los artículos de investigaciones y decretos publicados desde el año 1992 hasta el año 2023, las palabras claves usadas para la búsqueda se realizó en español como en inglés:

Palabras claves usadas: *Bacillus*, polihidroxicanoatos, biopolímeros, gen de la PHA sintasa

Bases de datos consultadas: Nature, Oxford academic, Sage journals, Scopus, Taylor and Francis Group y Google Scholar

5.2 Universo

7.097 artículos científicos o trabajos de grado en idioma inglés y español de la base de datos Nature, Oxford academic, Sage journals, Scopus, Taylor and Francis Group y Google Scholar relacionados con polihidroxicanoatos (PHA) y género *Bacillus*

5.3 Población

500 artículos científicos o trabajos de grado relacionados con posibles alternativas donde se limita a la producción de PHA a partir de microorganismos (Bacterias)

5.4 Muestra:

53 artículos científicos o trabajos de grado donde producen plásticos biodegradable de origen microbiano en especial con microorganismos que pertenecen al género *Bacillus*, que además hacen uso de fuentes de carbono alternativas y posibles mejoras tanto genéticas como en el medio de cultivo (físicoquímicas) para la síntesis del PHA.

5.5 Criterios de inclusión:

- Implementan el uso de microorganismos para producción de PHA.
- Producción de PHA de origen microbiano con fuentes de carbono alternativas .
- Mejoramiento de condiciones genéticas o físicoquímicas a los microorganismos para lograr mayor producción de bioplásticos.
- Aislamiento de microorganismos de diferentes ecosistemas.

5.6 Criterio de exclusión:

- Uso de plantas para producción de PHA

5.7 Herramienta estadística:

- Google sheets
- Excel

La consulta de los artículos de investigación se realizó en las bases de datos mencionadas, entre los años 2020 y 2023. (Tabla 1)

Tabla 1: Primera filtración

Bases de datos	Promedio de número de artículos encontrados
Nature Oxford academic Sage journals Scopus Taylor and Francis Group Google Scholar	7.097

Elaboración: Ramírez A, 2023

Para la segunda filtración se tuvo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, obteniendo así el número de artículos encontrados de la base de datos aplicando los filtros respectivos de esta para así cumplir con todos los criterios. (Tabla 2)

Tabla 2: Segunda filtración

Bases de datos	Promedio de número de artículos encontrados
Nature Oxford academic Sage journals Scopus Taylor and Francis Group Google Scholar	500

Elaboración: Ramírez A, 2023

Posteriormente, en la última filtración se ejecutó la revisión y lectura detallada y minuciosa de los resultados obtenidos mediante la base de datos. Se pudo notar que la base de datos no era lo suficientemente específica para los criterios fijados, ya que se incluían artículos sobre plásticos de origen sintético que se han podido degradar, bacterias, plantas o bacterias que no son tan comunes para la implementación de esta práctica o identificación de plástico producido sin detallar el proceso de obtención del PHA.

Por último, para obedecer con los criterios acordados, la revisión se ejecutó con 50 artículos que fueron elegidos, teniendo en cuenta su importancia, trascendencia y aporte que pudieron conferir a la revisión.

6. Resultados

Se llevaron a cabo revisiones y análisis de 50 documentos, con información que data desde 1992 hasta 2023, para obtener una amplia comprensión de los plásticos de origen petroquímico, los polihidroxicanoatos y sus derivados, los microorganismos productores de biopolímeros del género *Bacillus* spp., las diferentes alternativas de fuentes de carbono, así como las técnicas de extracción y los diversos usos de estos productos. En la tabla 3 se organizó la bibliografía recopilando el título, tema, autor, idioma, año y país para así poder ofrecer información más estructurada y accesible al lector.

En la Figura 10 se observa que el 23 % de los artículos analizados corresponden a la producción de PHA por medio de microorganismos diferentes al género *Bacillus* y también el 23 % de los documentos corresponden a la producción de bioplásticos haciendo el uso de fuentes de carbono alternativas, lo que indica que la unión de microorganismos capaces de sintetizar PHA y fuentes de carbono alternativas están altamente relacionadas para poder desarrollar esta tecnología. El 19% de los artículos revisados presentan diferentes condiciones fisicoquímicas en las que se puede desarrollar *Bacillus* spp para lograr producir este producto natural, los artículos relacionados con la producción de PHA con microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* es de 9%, el mismo porcentaje que las referencias bibliográficas que dan contexto sobre los plásticos de origen petroquímico. La suma de los artículos que tienen relación con las características, historia, condiciones, biodegradabilidad incluso aplicación de PHA corresponde al 11%; el porcentaje más bajo está asignado al marco legal con el 4% ya que son muy pocas las participaciones de los entes de control en la industria productora de plástico.

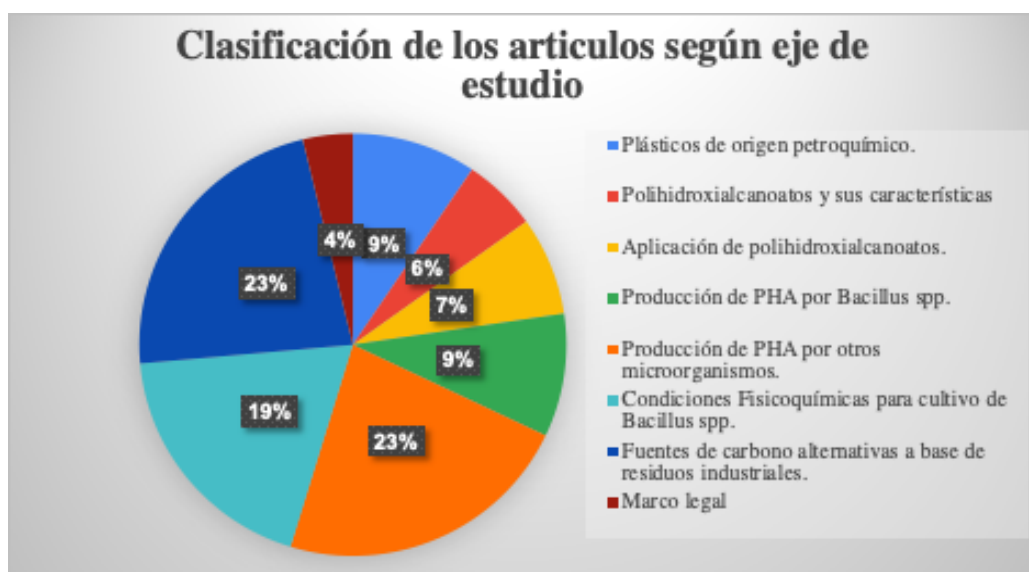


Figura 10: Clasificación de los artículos según el eje de estudio

Elaboración: Ramírez A. 2023

Tabla 3. Ejes principales del documento de acuerdo al título, tema, autor año, país e idioma.

TÍTULO	TEMA	AUTOR	AÑO	PAÍS	IDIOMA
Production of polyhydroxyalkanoates by <i>Azotobacter vinelandii</i> UWD in beet molasses culture	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Edmonton A.	1992	Canadá	Inglés
The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in <i>Bacillus mycoides</i> RLJ B-017	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Borah B, Thakur P, Nigam J.	2002	Estados Unidos	Inglés
Bioplásticos: una alternativa ecológica.	Polihidroxialcanoatos y sus características.	Almeida A, Ruiz J, Lopez N, Pettinari M.	2004	Argentina	Español
Fundamentos de polímeros	Plásticos de origen petroquímico.	López F.	2005	Venezuela	Español
Cloning and expression of the PHA synthase genes <i>phaC1</i> and <i>phaCIAB</i> into <i>Bacillus subtilis</i>	Producción de PHA por medio de <i>Bacillus</i> spp.	Wang Y, Ruan L, Chua H, Hoi-Fu P.	2006	China	Inglés

Production of poly-beta-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing <i>Bacillus species</i>	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Full T, Jung D, Madigan M	2006	Estados Unidos	Inglés
Recuperación de poli-b-hidroxihexanoato-octanoato sintetizado por <i>Pseudomonas putida</i> mediante el uso de dispersiones hipoclorito-cloroformo	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Moreno N, Malagón D, Cortázar J, Espinosa A.	2006	Colombia	Español
Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Ruiz B, Campos J, Barba N.	2008	México	Español
Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in <i>Bacillus cereus</i> SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Valappil S, Rai R, Bucke C, Roy I.	2008	Reino Unido	Inglés
Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género <i>Bacillus</i> de origen marino	Producción de PHA por medio de <i>Bacillus</i> spp.	Gonzalez M.	2008	México	Español

Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de <i>Bacillus subtilis</i>	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Farfán M.	2008	México	Español
Applications and societal benefits of plastics	plásticos de origen petroquímico.	Andrady A, Neal A	2009	Estados Unidos	Inglés
Detección de gránulos de polihidroxicanoatos en la cepa USBA 355 <i>Tistlia consotensis</i>	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Blanco K.	2010	Colombia	Español
Producción de poliésteres biopoliméricos (pha) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Gonzalez J, Pozo C	2011	España	Español
Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Lopez C, Alba J, Gracida J, Perez F.	2011	México	Inglés
FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel <i>Bacillus</i> sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Shah K.	2012	Reino Unido	Inglés

Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Gonzalez Y, Meza J, Gonzalez O, Cordova J.	2013	México	Español
Biopolímeros: avances y perspectivas	Aplicación de polihidroxicanoatos	Valero E, Ortegón Y, Uscategui Y.	2013	Colombia	Español
Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (pha's) en el departamento de Nariño	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Otero I, Fernandez P.	2013	Colombia	Español
Dinámica de los gránulos de polihidroxicbutirato durante el ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i> .	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Salinas A.	2013	México	Español
Identificación de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Sánchez S,Marín M,Mora A,Yepes M	2013	Colombia	Español
Obtención de poli-3-hidroxicbutirato (p3hb) a partir de la extracción de pectina del mucílago de café con <i>Streptomyces</i> sp. Aislados de suelos de Boyacá (Colombia).	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Gonzalez M.	2014	Colombia	Español

Optimization and characterization of bioplastic produced by <i>Bacillus cereus</i> SE1	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Pradhan S.	2014	India	Inglés
Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review	Polihidroxiálcanoatos y sus características.	Giin-Yu T, Chia C, Ling L, Liya G, Lin W.	2014	Singapur	Inglés
Polihidroxiálcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial	Aplicación de polihidroxiálcanoatos	Lemos A, Mina A	2015	Colombia	Español
Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by <i>Bacillus</i> spp.	Producción de PHA por medio de <i>Bacillus</i> spp.	Bhagowati P, Pradhan S, Dash H, Das S	2015	Estados Unidos	Inglés
Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications	Polihidroxiálcanoatos y sus características.	Muhammadi, Shabina, Muhammad, Hameedd	2015	Pakistan	Inglés
Aislamiento de hongos con potencial para sintetizar polihidroxiálcanoatos (PHAs) a partir de grasas y aceites en aguas residuales	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Pintor S	2016	Colombia	Español

Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos	Aplicación de polihidroxicanoatos	Álvarez L	2016	españa	Español
Extracción y caracterización estructural de un pha, obtenido de residuos de cáscaras de yuca y piña mediante procesos de fermentación; y su aplicación en la fabricación de fibras por electrospinning.	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Vega O	2016	Colombia	Español
Bacterias productoras de polímeros para su utilización como plásticos biodegradables	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Ibáñez M	2017	España	Español
Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables	Plásticos de origen petroquímico.	Segura D, Noguez R Espín G	2017	México	Español
GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in <i>Azotobacter vinelandii</i>	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Trejo A, Moreno S, Cocotl M, Espin G	2017	Estados Unidos	Inglés
Contaminación por residuos: Islas de plásticos	Plásticos de origen petroquímico.	Socas M.	2018	España	Español

Producción de phb en <i>Azotobacter vinelandii</i> op, utilizando orujo de uva como fuente de carbono a distintas razones carbono/nitrógeno	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Nuñez Y	2019	Chile	Español
An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from <i>Bacillus</i> sp. BPPI-14 and <i>Bacillus</i> sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill	Producción de PHA por medio de <i>Bacillus</i> spp.	Mohamed S, Lopamudra R	2019	Estados Unidos	Inglés
Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Cardona A, Mora A, Marín M	2019	Colombia	Español
Bioprospección de bacterias obtenidas de suelo y su aplicación potencial en la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs)	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Araya V	2019	Colombia	Inglés
Effects of chemical oxygen demand concentration, pH and operation cycle on polyhydroxyalkanoates synthesis with waste sludge	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Liu Y, She Z, Gao M	2019	Estados Unidos	Inglés

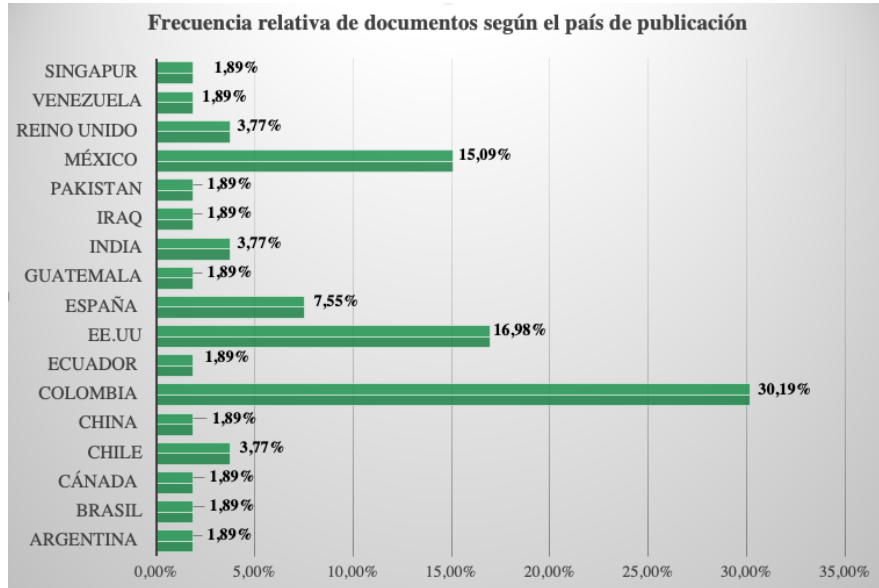
Estimación de parámetros cinéticos de un cultivo mixto microbiano basado en bacterias acumuladoras de pha, procedentes de un sistema de lodos activados	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Pedraza A,Poveda D	2020	Colombia	Inglés
Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by <i>Bacillus cereus</i> using grape residues as sole carbon source	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Andlera R, Pinoa V, Moyaa F, Sotoa E, Valdésb C, Andreeße C	2021	Chile	Inglés
Obtención de polihidroxitirato (phb) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel"	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Astudillo M.Olmedo L	2021	Ecuador	Español
Production and characterization of poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in wheat starch wastewater and its potential for nanoparticle synthesis	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Neda S, Davood Z, Mehrdad A,	2021	Brasil	Inglés

Systems Based on Biobased Thermoplastics: From Bioresources to Biodegradable Packaging Applications	Aplicación de polihidroxicanoatos	Morinval A, Averous L	2021	EE.UU	Inglés
Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biopolímeros a partir de efluentes industriales	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Villota G, Gonzales K, Marulanda M, Fernando N, Steffanny V, Ocampo L, Castañeda L, Giraldo C, Rodriguez N	2022	Colombia	Español
Selección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos a partir de un prototipo para la automatización del ciclo feast-famine	Condiciones fisicoquímicas para cultivo de <i>Bacillus</i> spp.	Aragon F, Martinez C	2022	Colombia	Español
La evolución regulatoria de plásticos de un solo uso en Colombia	Marco legal	Orjuela K	2022	Colombia	Español
Ley 2232 de 2022	Marco legal		2022	Colombia	Español

Producción de PHA por bacterias aisladas del estado de Nuevo León, México.	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Lopez O	2022	México	Español
Producción de plásticos biodegradables a partir de bacterias de hábitats salinos aisladas de la Laguna de Ayarza	Fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales.	Álvarez G	2022	Guatemala	Español
Study of the Fermentation Conditions of the <i>Bacillus cereus</i> Strain ARY73 to Produce Polyhydroxyalkanoate (PHA) from Glucose	Producción de PHA por medio de <i>Bacillus</i> spp.	Yasin A, Mayaly I.	2021	Iraq	Inglés
Microbial polyhydroxyalkanoates (phas): a brief overview of their features, synthesis, and agro-industrial applications	Producción de PHA por medio de otros microorganismos.	Addagada L, Pathak P, Kashif M, Ranjan R	2022	India	Inglés
Fossil fuel is the common denominator between climate change and petrochemical exposures, and effects on women and children's health	Plásticos de origen petroquímico.	Trowbridge J, Goin D, Abrahamsson D, Sklar R, Woodruff T.	2023	Estados Unidos	Inglés

Elaboración: Ramírez A, 2023

Figura 11: Frecuencia relativa de documentos según el país de publicación



Elaboración: Ramirez A. 2023

En la figura 11, se observa la frecuencia relativa de documentos según el país de publicación. Donde el país del cual se pudo obtener más información es Colombia, con un aporte del 30% de diferentes documentos. Es de gran importancia notar esto ya que nos expone que el tema de producción de plásticos biodegradables a partir de microorganismo ha sido un tema de investigación. Esto demuestra que las diferentes industrias productoras de plástico, al aliarse con la ciencia, podrían generar nuevas oportunidades de mercado para estos productos y así generar la transición de plásticos sintéticos a soluciones sostenibles, tal como lo propone la ley 3222 del 2022. Cabe resaltar, que esta problemática y solución se está abordando a nivel global ya que se obtuvo información de los diferentes continentes.

6.1 Condiciones fisicoquímicas

- Efectos según la concentración de fuente de carbono

Se analizó el comportamiento de la bacteria con diferentes concentración de glucosa, para poder comprender el comportamiento de esta y su relación con la producción de PHA. Donde se evidencio según Yasin *Et al* , que los cultivo que tenían concentraciones del 2 % de glucosa obtuvieron un recuento celular de $2,2 \times 10^9$ células/ml y el rendimiento de PHA de fue 1,78 g/L lo que representa el 49% del peso de la biomasa celular⁶. Transversalmente se observó que los medios que estaban preparados con una concentración del 8% de glucosa, se observó a las 48 horas, $2,4 \times 10^9$ células/ml pero sin producción de PHA. La disminución de producción de plástico se evidencio a medida que se incrementa la producción de glucosa²⁰. Es por ello que se puede dar una explicación de que las concentraciones más altas de azúcar pueden inhibir el cultivo, disminuir sus tasas metabólicas y afectar la capacidad del aislado para producir PHA. (Figura 12A)

- Efectos según el pH inicial.

En el estudio realizado, se investigó la respuesta del aislado *B. cereus* a diferentes niveles de pH. El cultivo se llevó a cabo a pH 5, 7 y 9, utilizando la temperatura óptima de 35°C durante un período de 96 horas.

Los resultados mostraron que la cepa *B. cereus* alcanzó su máxima producción de PHA en pH 7, en los días 48 y 96 horas, obteniéndose 2,65 g y 2,74 g respectivamente. Sin embargo, al aumentar el pH a 9, se observó una disminución en la producción de PHA, obteniéndose 0,48 g y 0,44 g en 48 horas y 96 horas respectivamente.

Por otro lado, se observó que al disminuir el pH a 5, la cepa *B. cereus* no produjo PHA. Esto sugiere que esta cepa prefiere un pH neutro para su crecimiento y producción de PHA, aunque también es capaz de producirlo en menor cantidad en un medio alcalino (pH 9), en contraste con un medio ácido. (Figura 12 C)

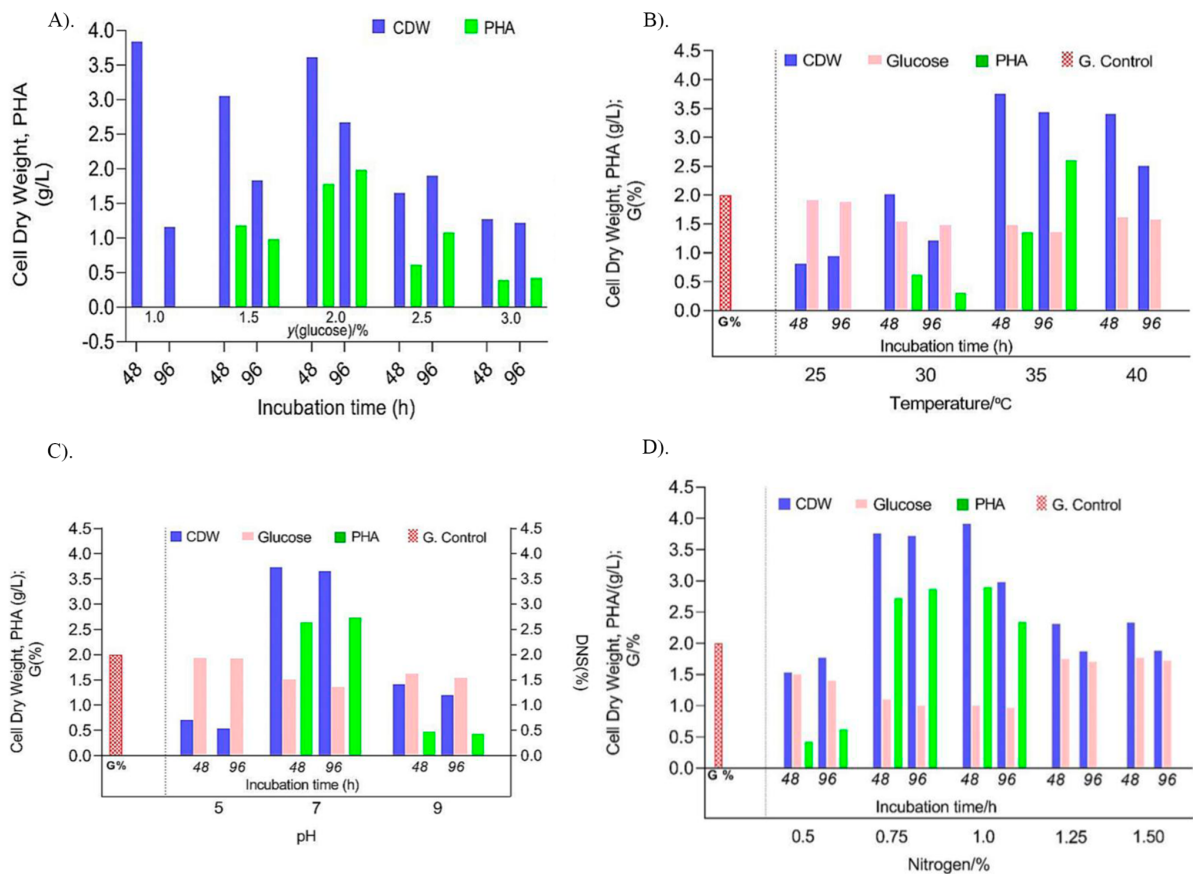


Figura 12: Variación en condiciones físico-químicas, valores de producción de PHA A) Concentración de glucosa optimizada, rendimiento de PHA por 48 y 96 h, B) Diferentes temperaturas 25, 30, 35 y 40 °C, glucosa 2 % (p/v). C) pH 5, 7 y 9 a temperatura favorita 35 °C y glucosa 2% (p/v) D) Concentraciones de nitrógeno preferidas (0,75 y 1,0%) para la producción de PHA por *B. cereus*

Fuente: Yasin. A. 2021

- Efectos según el temperatura

Se observó que la producción de PHA fue notable en un rango de temperatura de 30 a 35 °C. Se destaca que la temperatura óptima para obtener la máxima producción de PHA fue de 35 °C, alcanzando un contenido de 2,61 g/L con un impresionante porcentaje de PHA del 76% después de 96 horas de incubación. Además, se observó que se consumió aproximadamente el 1,36% de la glucosa en este ensayo.

Sin embargo, cuando la temperatura se elevó a 40 °C, no se detectó ninguna producción de PHA. A pesar de esto, la cepa aún pudo crecer con un peso seco celular de 3,41 g/L y 2,51 g/L a las 48 y 96 horas, respectivamente. Estos resultados sugieren que tener un mayor peso celular no necesariamente se traduce en un aumento en la producción de PHA. (Figura 12 B)

- Efectos según la concentración de carbono/nitrógeno:

Es de suma importancia las concentraciones de nitrógeno en el medio ya que son las responsables de crear un equilibrio con el carbono y poder lograr una producción óptima de biopolímeros y garantizar un crecimiento celular. Se observó que se obtuvo una mayor producción de PHA cuando se utilizaron concentraciones de nitrógeno del 0,75% y 1% (p/v). En particular, se alcanzaron concentraciones de PHA de 2,87 g/L (con un porcentaje de PHA del 77%) y 2,34 g/L (con un porcentaje de PHA del 79%) respectivamente. Por otro lado, una baja concentración de nitrógeno del 0,5% (p/v) disminuyó la producción de PHA y limitó la cantidad de PHA acumulado en la biomasa. Estos resultados indican que concentraciones de nitrógeno por encima de la media (0,5-1% p/v) redujeron la producción de PHA. (Figura 12 D)

6.2 Rutas metabólicas y enzimas empleadas en por *Bacillus* spp.

Para sintetizar polihidroxicanoatos (PHA), *Bacillus* utiliza la ruta de degradación de carbohidratos. Esta ruta metabólica descompone los carbohidratos y produce acetil-CoA como resultado final. La cetotiolasa, la acetoacetil-CoA reductasa y la PHA sintasa son algunas de las enzimas que participan en el proceso de síntesis de PHA. La conversión de acetoacil-CoA en acetil-CoA es catalizada por la cetotiolasa; la reductasa de acetoacetil-CoA reduce el acetoacil-CoA a (R)-hidroxialcanoil-CoA; y finalmente, la sintasa de PHA polimeriza los monómeros de (R)-hidroxialcanoil-CoA, lo que da como resultado la formación de PHA. (Figura 13)

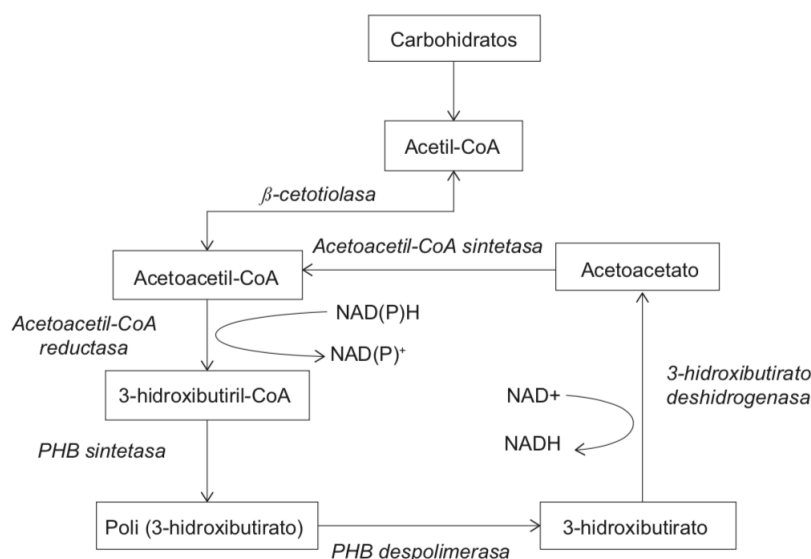


Figura 13: Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de PHB a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas implicadas en el proceso

Fuente: Lemos AC, Mina A. 2015

La ruta de degradación de carbohidratos depende principalmente de las enzimas *phaA*, *phaB* y *phaC*. Estas enzimas catalizan reacciones importantes que llevan a la síntesis de PHA.

La enzima cetotiolasa participa en la primera etapa de la ruta I. Cataliza la rotura de la acetil-CoA en dos moléculas de acetato, que luego se pueden usar como sustrato para la síntesis de PHA. Otra enzima crucial en esta ruta es la acetoacetil-CoA reductasa. Convertir el acetoacetil-CoA en (R)-hidroxialcanoil-CoA es su trabajo. Este es el monómero precursor esencial para la síntesis de PHA. Dado que determina la disponibilidad de (R)-hidroxialcanoil-CoA, esta enzima actúa como un paso limitante en la producción de PHA. Las demás enzimas son usadas en las diversas rutas metabólicas y cumplen una función en la síntesis de PHA, en la siguiente tabla explica las diferentes funciones y características de las enzimas necesarias. (Tabla 4)

Tabla 4: Enzimas utilizadas en el proceso de producción de PHA, su función y rutas en las que trabaja

Enzima	Función	Ruta Metabólica
phaA (β-cetotiolasa)	Cliva β-cetoacil-CoA en dos moléculas de acetil-CoA	Ruta I
phaB (acetoacetil-CoA reductasa)	Reduce acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxitiril-CoA	Ruta I Ruta II

phaC (PHA sintasa)	Polimeriza los monómeros de (R)-hidroxialcanoil-CoA en un biopolímero de PHA	Ruta I Ruta II Ruta III
phaG (proteína transportadora de 3-hidroxiacil-acil Coenzima A transferasa)	Transporta 3-hidroxialcanoil-CoA desde la β -oxidación al sitio de síntesis de PHA	Ruta II
phaJ (enoil-CoA hidratasa)	Hidrata los enoil-CoA a 3-hidroxialcanoil-CoA	Ruta II

Elaboración: Ramírez A, 2023

6.3 Fuentes de carbono alternativas.

Dentro de los ejes de estudio, se encuentra de manera predominante la producción de PHA de otros microorganismos y fuentes de carbono alternativas a base de residuos industriales, lo cual expone gran cantidad de posibilidades para poder desarrollar modelos que permitan sintetizar PHA de manera sostenible llevando a cabo programas de biorremediación, reducción de huella de carbono y mitigar la producción de residuos por parte de las industrias agrícolas y alimentarias, dándole una segunda oportunidad.

En la tabla 5 se clasifica según las cepas más usadas, medios de cultivos modificados, la el contenido de PHA y la productividad de (g/kg/h); los dos últimos parámetros son de alta importancia ya que a partir de ellos se pueden tomar decisiones en cuanto a ser usado por la industria. Se debe tener en cuenta que los microorganismos usados a lo largo de los artículos analizados suelen ser del mismo género y especie sin embargo presentan modificaciones genéticas. *Pseudomonas fluorescens* obtuvo mayor concentración de PHA es la con un porcentaje del este biopolímero en la célula con el 70 %, con un 0.304 g/kg/h . La velocidad de crecimiento de *Bacillus* spp, desarrolla su fase exponencial entre las 4 a 27 horas de incubación, ya el tiempo después, se registra como fase estacionaria⁵³

Tabla 5: Resumen de estudios que informan la producción de PHA por cultivo batch.

Cepa	Tipo de PHA	Medio de cultivo	Contenido de PHA (%)	Productividad (g/kg/h)
<i>Bacillus cereus</i> M5	PHB	Melaza de remolacha (5% p/v)	38,5	0,007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PHB	Licor de caña de azúcar + glutamato + sales	70	0,23
<i>C. necator</i>	PHB	Aceite vegetal + sales + trazas de metales	79-81	0,04-0,05
<i>E. coli</i> recombinante	PHB	Xilosa + hidrolizado de soja	73,9	0,073
<i>Azotobacter vinelandii</i>	PHBV	Líquidos de residuos porcinos diluidos + glucosa + sales + trazas de metales	58,3	0,304
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	PHA con monómeros C4-C14	Sebo + sales+ trazas de melaza	15,1	0,003
<i>C. necator</i>	PHB	Residuos sólidos de soja suplementados con melaza	39,1	0,082

Elaboración:Nuñez AN.

6.4 Extracción y tratamiento de PHA

Unos de los más usados son por medio de hidrocarburos clorados tales como cloruro de metileno, cloroformo, triclorometano o dicloroetano, suele ser usado para la extracción de PHA de cadena corta. Sin embargo, un inconveniente que hay es la viscosidad del PHB ya que está por encima del 5% (p/v) lo que dificulta la eliminación de restos celulares. En cuanto a los PHA de cadena media son solubles en un rango más amplio, esta técnica es costosa, por tal razón no es de preferencia en las industrias.

Se ha indagado en otras opciones como lo son el etilen o propilen carbonato o métodos donde por medio de la ruptura de las celular por hipoclorito de sodio ya que este puede digerir componentes celular diferentes al polímero y con ayuda del cloroformo solubiliza los gránulos liberados y de tal manera lo protege de la actividad degradativa. El tiempo, la temperatura y concentración de estos compuestos deben ser estandarizados según el microorganismo usado¹.

Otra alternativa en la que se ha estudiado es uso de enzimas como lisozima, alcalasa y fosfolipasas que combinadas con elementos que tiene actividad superficial pueden degradar los componentes celulares distintos al polímero, sin embargo su desventaja en la baja pureza que tendría el producto³

En la Figura 12 se especifica el proceso de producción de biopolímeros, se registra en la literatura diferentes métodos de extracción de plástico, tales como solventes enzimáticos, reacciones químicas, uso de enzimas que lisan la membrana celular, sin embargo el más usado es extracción química con cloroformo e hipoclorito, ya que se ha demostrado que aumenta el valor de la pureza con un 95 % comparado con los demás metodos³. En cuanto al procesamiento del plástico del polímero, se puede manejar como plásticos de origen petroquímico y destinar su uso en la industria biomédica o fabricación de material de uso común.

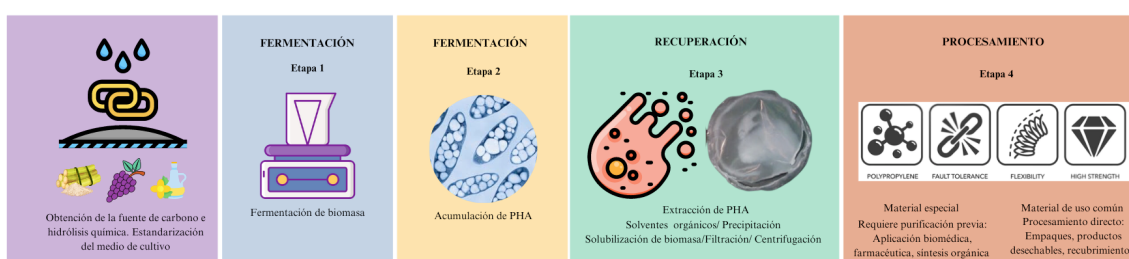


Figura 14: Esquema general de producción de PHA, en el que se indican las características de los procesos de fermentación, recuperación y procesamiento del polímero según su uso final

Elaboración: Ramirez A

6.5 Limitaciones y beneficios de la producción de PHA

La producción de polihidroxialcanoatos (PHA) como una alternativa sostenible a los plásticos convencionales ha despertado un gran interés. Sin embargo, hay varias limitaciones en su

comercialización que han obstaculizado su adopción a gran escala¹². El alto costo de producción, la inestabilidad de las propiedades termomecánicas y la escasez de suministros de monómeros son algunas de estas limitaciones. Se han realizado grandes esfuerzos para abordar estos problemas y encontrar soluciones para superar estas limitaciones, así como para promover la producción y aplicación exitosa de PHA²⁴.(Tabla 6)

Tabla 6: Limitaciones y soluciones al producir PHA por medio de *Bacillus* spp.

Limitaciones	Soluciones
Alto costo de producción debido a la demanda de energía, esterilización complicada, aireación intensiva y costoso procesamiento posterior ¹	- Uso de bacterias extremófilas combinadas con ingeniería metabólica y biología sintética para abordar los desafíos de producción ³⁵
Baja conversión de sustratos de carbono en productos PHA ¹⁷	- Desarrollo de enfoques de ingeniería para aumentar la conversión de sustratos de carbono en PHA ³
Propiedades termomecánicas inestables debido a pesos moleculares y estructuras inestables ²⁹	- Investigación en la actividad de la PHA sintasa y suministro de monómeros para mejorar la estabilidad de las propiedades termomecánicas ⁴⁵

Los polihidroxialcanoatos (PHA) tienen muchas ventajas. Estos biopolímeros son una alternativa sostenible al plástico tradicional ya que son biodegradables y compostables¹⁶. Además, tienen una amplia gama de usos potenciales, que van desde la industria de empaque hasta la medicina regenerativa. La producción de PHA reduce la acumulación de desechos y la dependencia de combustibles fósiles. Estos beneficios hacen que PHA sea una opción atractiva para aquellos que buscan soluciones más amigables con el medio ambiente. Además que potencia la ingeniería metabólica y biología sintética, ya que brinda nuevos campos de investigación, que con proyectos de investigación multidisciplinarios se pueden lograra avances desde el aprovechamiento de residuos industriales o agrícolas, como el la optimización de microorganismos para la producción de plásticos por medio de modificación genética y mejoramiento en procesos de extracción y procesamiento del plástico con el fin de reducir costos³⁰.

7. Discusión

Existen diferentes características que hacen que este *Bacillus* spp, presenta ventajas con respecto al resto de los microorganismos⁵², como lo es su estabilidad genética, mayor tasa de crecimiento en comparación a las demás, ausencia de lipopolisacáridos en su capa externa lo cual facilita la extracción de la síntesis de PHA, tiene la capacidad de producir este biopolímero usando fuentes de carbono de bajo costo y segregan una cantidad de enzimas hidrolíticas que pueden ser usadas la industrias en diferentes procesos que permiten compensar costos de producción de PHAs⁴.

Este microorganismo tiene la capacidad de producir esporas en condiciones de estrés y paralelamente también sintetiza PHA, esto representa un riesgo ya que se producen al mismo tiempo, y la presencia de estas esporas puede ocasionar peligro en la salud del consumidor. Asimismo, la bacteria debe repartir la energía obtenida para poder producir esporas y síntesis de PHA; sin embargo, se ha demostrado que el desarrollo de condiciones de cultivo con pH ácido y deficiencia de potasio con el fin de inhibir el crecimiento y formación de esporas y así mejorar la síntesis del polímero¹⁶.

Dentro de los biopolímeros sintetizados por *Bacillus* se encuentran homo y copolímeros tales como ácido polihidroxi-butírico, Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato), estas variaciones se dan dependiendo la especie de este género que lo sintetice, también de su metabolismo, fuente de carbohidrato fermentable, curvas de crecimiento que pueden variar y la presencia de la enzima PHA sintasa. Durante la revisión bibliográfica la se han registraron un grupo de genes *pha* donde se encuentran siete genes como *phaRYB4*, *phaBYB4*, *phaCYB4*, *phaQYB4*, *phaPYB4*, ORF1 y *phaJYB4*¹¹, los cuales codifican proteínas implicadas en la síntesis del polímero y así mismo responsable de la variación en la cantidad de acumulación. Por consiguiente las condiciones y concentraciones de los nutrientes tienen relevancia en las diferentes fases de crecimiento de las bacterias. Por ende en la fase exponencial, las células usan la ruta Entner-Doudoroff (EDP) ya que la ruta oxidativa de las pentosas fosfato no está activa. En su lugar, las reacciones que generan Ribosa-5-fosfato (R5P) ocurren en sentido inverso a la ruta pentosa fosfato (PP)³⁶. El flujo de Acetil-CoA se divide en tres partes: la producción de polímeros, la síntesis de citrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y las rutas anabólicas que construyen aminoácidos y lípidos. La mayor parte del Acetil-CoA se usa para producir PHAs, lo que reduce el flujo hacia el ciclo CAT y las rutas anabólicas que lo consumen²⁰.

Las condiciones fisicoquímicas brindadas al microorganismo tienen un papel importante para su buena producción. La concentración de hidrogeniones (pH), es de gran relevancia, por ello en diversa literatura se ha ajustado el pH de los medios de cultivo a 7.0, para poder tener una acumulación de PHA óptima³³. Sin embargo, por la bioquímica del metabolismo de las bacterias puede presentar variaciones a medida que van ocurriendo cada una de las fases del microorganismo, como lo es la disminución de este cuando el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento atribuido al consumo de iones de amonio que son producto del rompimiento de los triglicéridos por acción de la lipasa. Si bien *B. cereus* es un

microorganismo aerobio, los niveles de oxígeno es uno de los requerimientos que deben ser controlados, ya que los niveles de PHAs son bajos, puede ser debido a una mayor oxigenación que dirige el metabolismo hacia una tasa de respiración más alta. Esto conduce a una mayor oxidación del sustrato, lo que reduce la disponibilidad de Acetil-CoA, que es necesario para producir PHAs. Por lo tanto, cuando hay bajos niveles de oxigenación y una fuente de carbono en exceso, el metabolismo genera altas concentraciones de NADH⁺ y Acetil-CoA. Estos compuestos deben ser convertidos en formas que no afecten el equilibrio redox de la célula, lo que lleva a la producción de PHAs³⁷.

Las fuentes de carbono tienen una relevancia significativa tanto en el crecimiento de la biomasa como en la síntesis de PHA, hay una tendencia en los microorganismos para preferir una fuente de carbono en particular, pero se ha demostrado que la cepa bacteriana puede producir diferentes cantidades de PHAs según la fuente de carbono que utilice. *Wautersia eutropha* utilizó 75 g L⁻¹ de aceite de canola como fuente de carbono, de los cuales se consumió el 15%, el rendimiento obtenido fue de 0,68 g cPHA g c⁻¹, la biomasa seca resultante contenía un 92% de PHA. Con melaza de soja⁸ *Bacillus* sp evidencia mayor afinidad por la rafinosa, con una productividad de 3,00 mg ml⁻¹ y un contenido de PHA de 89,7%. La glucosa y la sacarosa también produjeron altos contenidos de PHA de 90,9 % y 87,0 %, respectivamente, mientras que la fructosa y la lactosa produjeron contenidos de PHA ligeramente más bajos de 86,3 % y 81,7 %, respectivamente.

Dentro de la bibliografía consultada podemos separar en dos grupos las fuentes de carbono, una son aquellas que tienen presencia de altas concentraciones de carbohidratos como los son las melazas residuales de industrias agrícolas y la segunda son aquellos desechos también de la industria alimentaria como los residuos de la palma de cera (glicerol)⁸. Dependiendo de la maquinaria enzimática y las vías metabólicas que pueda realizar el microorganismo podrá hacer fermentación de estas opciones, ya que pueden tomar la ruta de la β -oxidación de Ácidos grasos o el ciclo del ácido cítrico, en comparación con las demás fuentes de carbono, el glicerol produjo el contenido más bajo de PHA de 52,1%³⁷. Por otro lado, la sacarosa se ha demostrado que es una fuente de carbono favorable para la acumulación de PHA, ya que produce un 5% de acetil Co-A³⁴, lo que aumenta la producción de PHAs. Además, la estructura de la molécula de sacarosa, compuesta por glucosa y fructosa, puede influir en la degradación de las mismas por parte de las bacterias. De hecho, en un estudio se encontró que 44 de 108 aislamientos bacterianos producían PHAs cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono. El glicerol residual es una fuente de carbono económica para el proceso de producción de PHA, pero la rafinosa, glucosa y sacarosa parecen ser las fuentes de carbono más favorables para la producción de PHA.

8. Conclusiones

- La producción de plásticos biodegradables es un tema de importancia tanto científica como industrial por ello ha sido a su vez mayor su estudio y divulgación. Sin embargo no ha sido suficiente para contrarrestar los efectos del uso indiscriminado del plástico. Si bien se evidencio que es un tema que es estudiado alrededor del mundo. Se requiere la generación de alianzas entre entes académicos, industriales y políticos para promover esta solución, de tal manera se evite el uso de plásticos de origen petroquímico.
- *Bacillus* spp. es un microorganismo con gran potencial para la producción de plásticos biodegradables debido a su capacidad para producir polihidroxicanoatos (PHAs) utilizando diferentes fuentes de carbono. Presentando ventajas frente a otros microorganismos, como una mayor tasa de crecimiento, estabilidad genética y la ausencia de lipopolisacáridos en su capa externa, lo que facilita la síntesis y extracción de PHA. Hace uso de las enzimas (phaA, phaB, phaC , phaG, phaJ), indispensables para poder llevar a cabo la la ruta metabólica de su preferencia.
- La síntesis de PHA por *Bacillus* spp. puede verse afectada por la producción simultánea de esporas, que pueden ser peligrosas para la salud humana. Sin embargo, el uso de condiciones de cultivo específicas puede inhibir la formación de esporas y mejorar la síntesis de PHA
- El género de bacterias estudiado puede producir diferentes tipos de PHA según la especie, el metabolismo y la fuente de carbohidratos fermentables. La síntesis de estos polímeros involucra la enzima PHA sintasa y un grupo de genes llamados *pha*.
- El uso de fuentes alternativas de carbohidratos, como los desechos agrícolas y de la industria alimentaria, puede ser usados como reemplazo de elementos sintéticos, se observó que esta bacteria tuvo mayor producción de PHA cuando su fermentación uso maltosa como fuente de carbono. El uso de esta alternativa genera una solución a la producción de residuos y desecha la huella de carbono y a su vez el desarrollo de métodos eficaces y oportunos permite reducir los costos de producción de los PHA.

9. Referencias bibliográficas

1. N. Moreno-Sarmiento, D. Malagón-Romero, J. Cortázar, A. Espinosa-Hernández. Recuperación de poli-B-hidroxihexanoato-octanoato sintetizado por *Pseudomonas putida* mediante el uso de dispersiones hipoclorito-cloroformo. *Universitas Scientiarum* [Internet]. 2006;11(1):41–8. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/31648>
2. Full TD, Jung DO, Madigan MT. Production of poly-beta-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2006;43(4):377–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01981.x>
3. Gonzalez MG. Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino [Internet]. [México]: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C; 2008. Disponible en: https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/288/1/gonzalez_m.pdf
4. Carrasquero FL. Fundamentos de polímeros [Internet]. Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química; 2005. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16743/polimeros.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. González Y, Meza J, González O, Códova J. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental* [Internet]. 2012;29(1). Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007
6. Lemos Delgado AC, Mina Córdoba A. Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Inf téc* [Internet]. 2015 [citado el 19 de abril de 2023];79(1):83. Disponible en: https://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/139
7. Pradhan S. Optimization and characterization of bioplastic produced by *Bacillus cereus* SE1 [Internet]. [Rourkela]: National Institute Of Technology; 2014. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/80147099.pdf>
8. Muhammadi, Shabina, Afzal M, Hameed S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chem Lett Rev* [Internet]. 2015;8(3–4):56–77. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>

9. Mohammed S, Panda AN, Ray L. An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus* sp. BPPI-14 and *Bacillus* sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;134:1085–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.155>
10. de los Ángeles Socas González M. Contaminación por residuos: islas de plástico. [España]: Universidad de la Laguna ; 2018.
11. Bhagowati P, Pradhan S, Dash HR, Das S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2015;79(9):1454–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2015.1034651>
12. Borah B, Thakur PS, Nigam JN. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2002;92(4):776–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01590.x>
13. Andler R, Pino V, Moya F, Soto E, Valdés C, Andreeßen C. Synthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus cereus* using grape residues as sole carbon source. *International Journal of Biobased Plastics* [Internet]. 2021;3(1):98–111. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/24759651.2021.1882049>
14. Addagada L, Pathak P, Shahid MK, Rout PR. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): A brief overview of their features, synthesis, and Agro-industrial applications. En: *Advances in Agricultural and Industrial Microbiology*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2022. p. 217–36.
15. Andrady AL, Neal MA. Applications and societal benefits of plastics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2009;364(1526):1977–84. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>
16. Espín DSRN. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*. 2017;14(3).
17. Trowbridge J, Goin DE, Abrahamsson D, Sklar R, Woodruff TJ. Fossil fuel is the common denominator between climate change and petrochemical exposures, and effects on women and children's health. *Int J Gynaecol Obstet* [Internet]. 2023;160(2):368–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ijgo.14408>
18. Terán KPO. La evolución regulatoria de plásticos de un solo uso en Colombia [Internet]. Bogotá]: Universidad Jorge Tadeo Lozano ; 2022. Disponible en: <https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/27903/PryTesisMaestr%C3%ADaDaKarenPaolaOrjuelaTeran2022May03RevAprob.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

19. CONGRESO DE COLOMBIA. Ley 2213 de 2022 [Internet]. 2022. Disponible en: http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley_2213_2022.html
20. Biopolímeros: Avances Y Perspectivas. Dyna [Internet]. 2013;80(181). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532013000500019
21. Tan G-Y, Chen C-L, Li L, Ge L, Wang L, Razaad I, et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. Polymers (Basel) [Internet]. 2014;6(3):706–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/polym6030706>
22. da Silva LÁ. Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos [Internet]. Idus.us.es. [citado el 19 de abril de 2023]. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/54517/BIOPL%C3%81STICOS.pdf>
23. Blanco Marín KJ. Detección de gránulos de polihidroxicanoatos en la cepa USBA 355 *Tistlia consotensis*. Bogotá]: Pontificia Universidad Javeriana; 2010.
24. Otero-Ramírez ID. Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA's) en el departamento de Nariño. Biotecnología Sect Agropecu Agroindustrial [Internet]. 2013 [citado el 20 de abril de 2023];11(SPE):12–20. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-3561201300030002
25. Riaño JYS. Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. Revista TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA,. 2010;5(2):79–84.
26. Andrea NAY. Producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* op, utilizando orujo de uva como fuente de carbono a distintas razones carbono/nitrógeno. [Chile]: Universidad Técnica Federico Santa María; 2019.
27. Cerrone F. Producción de poliésteres biopoliméricos (pha) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Universidad de Granada; 2011.
28. Araya Chaves V. Bioprospección de bacterias obtenidas del suelo y su aplicación potencial en la producción de polihidroxicanoatos (PHAs). 2019 [citado el 20 de abril de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/18880>
29. López EI. Bacterias productoras de polímeros para su utilización como plásticos biodegradables. Asociación nacional de auditores y verificadores ambientales. 2017;
30. Yamileth Ortegón, Yomaira Uscategui, Manuel Fernando Valero Valdivieso. Biopolímeros: avances y perspectivas. Dyna. 2013;80(181):171–80.
31. Moreno AS. Dinámica de los gránulos de polihidroxicbutirato durante el ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. [México]: Universidad Nacional de México; 2013.

32. Moreno SAS. Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología* [Internet]. 2012;14(2). Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37286>
33. Iguavita G, Paola M. Obtención de poli-3-hidroxibutarato (p3hb) a partir de la Extracción de pectina del mucilago de café con *Streptomyces* sp. Aislados de suelos de Boyacá (Colombia). Universidad de La Sabana; 2014.
34. Villota-Calvachi GE, González Marín KV, Marulanda Moreno SM, Galeano Vanegas NF, Velasco Ortega DS, Ocampo Henao LA, et al. Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de biopolímeros a partir de efluentes industriales. *Rev Colomb Biotecnol* [Internet]. 2022;24(1):27–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.76660>
35. Valappil SP, Rai R, Bucke C, Roy I. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2008;104(6):1624–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03678.x>
36. Shah KR. FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by a locally isolated novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India. *Journal of microbial & biochemical technology* 3. 2012;4(4):380–3.
37. Trejo A, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Espín G. GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2017;364(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnw278>
38. Wang Y, Ruan L, Chua H, Yu PHF. Cloning and expression of the PHA synthase genes phaC1 and phaC1AB into *Bacillus subtilis*. *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2006;22(6):559–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9071-7>
39. Aragón Morales MF, Martínez Fonseca CA. Selección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos a partir de un prototipo para la automatización del ciclo feast-famine. *Bioingeniería*; 2022.
40. Ruiz Herrera BL, Campos González Angulo JA, Barba Behrens N. Cofactor FeMco (M = Mo, V, Fe) en la nitrogenasa. *Educ quím* [Internet]. 2008 [citado el 20 de abril de 2023];19(1):34–41. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2008000100006
41. Lourdes MFM. Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis* [Internet]. [México]: Instituto Politécnico Nacional; 2012. Disponible en: <https://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8652>

42. Zheng Y, Guo L, Liu Y, She Z, Gao M, Jin C, et al. Effects of chemical oxygen demand concentration, pH and operation cycle on polyhydroxyalkanoates synthesis with waste sludge. *Environ Technol* [Internet]. 2021;42(12):1922–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2019.1683615>
43. López-Cuellar MR, Alba-Flores J, Rodríguez JNG, Pérez-Guevara F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2011;48(1):74–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016>
44. Cardona Echavarría AC, Mora Martínez AL, Marín Montoya M. Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Rev Fac Nac Agron Medellin* [Internet]. 2013 [citado el 20 de abril de 2023];66(2):7129–40. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-28472013000200013&lng=e&nrm=iso&tlng=es
45. Pedraza León AL, Poveda Ladino DS. Estimación de parámetros cinéticos de un cultivo mixto microbiano basado en bacterias acumuladoras de pha, procedentes de un sistema de lodos activados. *Fundación Universidad de América*; 2020.
46. Astudillo Fajardo MC, Olmedo García LE. Obtención de polihidroxibutirato (PHB) a partir del subproducto glicerol procedente de la transformación de aceites usados de palma a biodiesel. 2021.
47. Sinaei N, Zare D, Azin M. Production and characterization of poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in wheat starch wastewater and its potential for nanoparticle synthesis. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2021;52(2):561–73. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-021-00430-5>
48. Figueroa Ceballos RA, Morales Esquivel OI, Valenzuela GÁ, Bran MC. Producción de plásticos biodegradables a partir de bacterias de hábitats salinos aislados de la Laguna de Ayarza. *Cienc Tecnol Salud* [Internet]. 2022;9(2):189–98. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.36829/63cts.v9i2.1368>
49. Contenidos M. VegaCastro-2017-ExtraccionCaracterizacionPHA [Internet]. *Studenta*. 2022 [citado el 20 de abril de 2023]. Disponible en: <https://es.studenta.com/content/116772905/vega-castro-2017-extraccion-caracterizacion-pha>
50. Page WJ. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1992;103(2–4):149–57. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05832.x>
51. Morinval A, Averous L. Systems based on biobased thermoplastics: From bioresources to biodegradable packaging applications. *Polym Rev (Phila Pa)*

[Internet]. 2022;62(4):653–721. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1080/15583724.2021.2012802>

52. Olivia LA. Producción de PHA por bacterias aisladas del estado de Nuevo León, México. [México]: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2019.
53. Yasin A, Al-Mayaly I. Study of the fermentation conditions of the *Bacillus cereus* strain ARY73 to produce polyhydroxyalkanoate from glucose. Inž Ekol [Internet]. 2021;22(8):41–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.12911/22998993/140326>
54. Escobar LP. Aislamiento de hongos con potencial para sintetizar polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de grasas y aceites en aguas residuales [Internet]. Edu.co. [citado el 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/18514/u721823.pdf?sequence=1>