

Identificación y caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoato (PHA) aisladas
de muestras de suelos del departamento de Santander

Christian Javier Mier Villamizar

Trabajo de Grado para optar al título de Químico

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en química

Codirector

Inés Hernández Celi

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

Agradecimientos

Inicialmente, me gustaría agradecer a la escuela de química de la Universidad Industrial de Santander por permitirme realizar esta investigación como proyecto de grado. A mi director de tesis, el doctor William Hidalgo Buchelli por sus conocimientos, por la paciencia que mantuvo durante todo este proceso de aprendizaje, por la dedicación y su forma de enseñanza que resalto como una de las mejores que he presenciado durante mi corto, pero enriquecido proceso académico. Agradezco a mi codirectora la magister Inés Hernández Celis por todo el apoyo brindado durante este trabajo de grado, nuevamente por la paciencia y el tiempo dedicado en permitirme aprender y mejorar conocimientos como la microbiología, importantes en la realización de esta tesis de investigación. No encuentro las palabras suficientes para la inmensa gratitud que tengo hacia mi director y codirectora por la forma en como lograron instruirme y formarme en la persona que soy hoy; como lograron enamorarme más de un tema, del cual ya estaba enamorado. Agradezco a mi familia por el apoyo durante toda la carrera, la lucha constante de horas de estudio, a mis padres por las palabras alentadoras en momento donde más lo necesitaba. Por último me gustaría agradecer especialmente a mis amigos, por tantas risas en el laboratorio y fuera de este, tantos momentos inolvidables durante los recesos para tomar fuerzas y continuar con el duro trabajo que cada uno estaba desempeñando en ese momento. Por todo esto y mucho más, agradezco a todas las personas cercanas a mí y a este proyecto el cual no hubiera sido posible sin su apoyo y cariño sobre todas las cosas. Muchas gracias, totales.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1. Objetivo general	17
1.2. Objetivos específicos	17
2. Marco teórico	18
2.1. Generalidades de los polihidroxicanoatos (PHA)	18
2.2. Bacterias productoras de PHA	22
2.2.1. Degradación de PHA	35
2.2.2. Biosíntesis de PHA	37
2.2.2.1. Enzimas involucradas en la síntesis de PHA	37
2.2.2.2. Ruta de biosíntesis por sacáridos libres	40
2.2.2.3. Ruta de biosíntesis por β -oxidación	41
2.3. Métodos de identificación y caracterización de PHA	47
2.4. Aplicaciones	48
2.4.1. Aplicaciones médicas	56
2.4.1.1. Ingeniería de tejidos	57

BACTERIAS PRODUCTORAS PHA	4
2.4.1.2. Parches para bioimplantes	57
2.4.1.3. Sistema de liberación de medicamentos	58
2.4.1.4. Aplicaciones quirúrgicas	59
2.4.2. Aplicaciones industriales	59
2.4.3. Aplicaciones en la agricultura	61
3. Metodología	63
3.1. Etapa 1: Aislamiento e identificación de bacterias productoras de PHA en muestras de suelos.	63
3.1.1. Muestreo	63
3.1.2. Preparación de las muestras y aislamiento presuntivo de posibles bacterias productoras de PHA	63
3.1.3. Pruebas preliminares para los cultivos bacterianos	64
3.1.3.1. Prueba de Gram	66
3.1.3.2. Prueba de catalasa	66
3.1.3.3. Prueba de oxidasa	67
3.1.4. Verificación de la presencia de PHA intracelular empleando el colorante Azul Nilo	67
3.2. Etapa 2: Caracterización del PHA producido por las bacterias PHA positivas.	68
3.2.1. Determinación de la biomasa	68
3.2.2. Acumulación de PHA en medio de cultivo mínimo en sales (MSM) líquido	69
3.2.3. Extracción del biopolímero intracelular	70

BACTERIAS PRODUCTORAS PHA	5
3.2.4. Derivatización del PHA extraído para análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases (GC/MS)	70
3.2.5. Caracterización del biopolímero mediante GC/MS	71
3.2.6. Caracterización del biopolímero mediante resonancia magnética nuclear (RMN)	72
3.2.7. Caracterización del biopolímero mediante análisis termogravimétrico (TGA)	72
3.3. Etapa 3: Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos que presentaron la mayor acumulación de PHA.	72
3.3.1. Conservación de microorganismo PHA positivos	73
4. Resultados y análisis	74
4.1. Etapa 1: Aislamiento e identificación de bacterias productoras de PHA en muestras de suelos	74
4.2. Etapa 2: Caracterización del PHA producido por las bacterias PHA positivas.	79
4.3. Etapa 3: Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos que presentaron la mayor acumulación de PHA	91
5. Conclusión	93
Referencias Bibliográficas	93
Apéndices	122

Lista de Figuras

- Figura 1. Estructura química de los polihidroxicanotatos (PHA) [1]. 19
- Figura 2. Vista de gránulos de PHA intracelulares y su forma esquemática. 20
- Figura 3. Rutas sintéticas de los polímeros de tipo PHA. Las líneas punteadas representan rutas secundarias, los números representan las enzimas involucradas en las reacciones químicas que se resumen en la Tabla 4 y las letras sombreadas representan la cantidad de rutas sintéticas descubiertas hasta la fecha (ya sean principales o secundarias). Traducido y modificado de [1, 2]. 38
- Figura 4. Ejemplo colonia bacteriana fluorescente. Fuente: autor. 65
- Figura 5. Observación del microscopio procedentes de muestras de suelo (40X) para la interpretación de emisión fluorescente en colonias bacterianas PHA positivas (a) y para colonias PHA negativas (b). Aunque ambas colonias presentan algún tipo emisión fluorescente. Para la figura a se observa una emisión más intensa de color naranja, ya que el azul Nilo es un colorante específico para lípidos ácidos, es por esto que se une a los fosfolípidos presentes en la mono-capa del granulo de PHA intracelular. Fuente: autor. 68
- Figura 6. Lugares de recolección de las muestras analizadas en el presente proyecto de investigación. 75

- Figura 7. Resultado colonia C01 bajo el microscopio de fluorescencia empleando Azul Nilo como colorante (aumento 40X). 75
- Figura 8. Perfiles cromatográficos de los aislados bacterianos con mayor producción de biopolímero. 80
- Figura 9. Espectros de masas del aislado C02 para distinguir la presencia de monómeros de interés (3HB y 3HV). 81
- Figura 10. Espectro de protones $^1H - RMN$ compilados de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02. 84
- Figura 11. Espectro de carbonos $^{13}C - RMN$ compilados de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02. 85
- Figura 12. Espectro HSQC compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02. 86
- Figura 13. Espectro COSY compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02. 87
- Figura 14. Espectro HMBC compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02. 88
- Figura 15. Resultados análisis termogravimétrico de los aislados C01 y C02 en comparación a un PHB comercial a nuestra disposición. 90
- Figura 16. Resultado prueba preliminar de Azul Nilo de las colonias PHA positivas. 126
- Figura 17. Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A01. 129

Figura 18.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A02.	130
Figura 19.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A03.	130
Figura 20.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A04.	131
Figura 21.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A05.	131
Figura 22.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A06.	132
Figura 23.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A07.	132
Figura 24.	Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A08.	133

Lista de Tablas

Tabla 1.	Comparación de las propiedades físicas de los principales PHAs producidos por bacterias con algunos plásticos derivados del petróleo [3].	21
Tabla 2.	Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas.	24
Tabla 3.	Algunos ejemplos de microorganismos degradadores de PHA aislados de diferentes medios ambientales [4].	36
Tabla 4.	Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3 modificada de [1].	42
Tabla 5.	Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción para el PHA, modificado y traducido de [5].	50
Tabla 6.	Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA, modificada y traducida de [6]	51
Tabla 7.	Resultados pruebas preliminares y observaciones morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas PHA positivas.	76
Tabla 8.	Resultados acumulación de PHA para cada colonia PHA positiva.	78
Tabla 9.	Datos usados para la creación de la curva de calibración para el metil-3-hidroxi-butarato.	82
Tabla 10.	Miligramos de 3-hidroxi-butarato (3HB) presente en los extractos de biopolímero para cada bacteria PHA positiva.	82

Tabla 11.	Resultados análisis termogravimétrico para los biopolímeros obtenidos en los aislados C01 y C02 junto con datos experimentales encontrados en la literatura.	91
Tabla 12.	Preparación de medios de cultivo implementados en este proyecto de investigación.	122
Tabla 13.	Resultado masa seca para las colonias bacterianas PHA positivas	127
Tabla 14.	Soluciones escala de McFarland	128

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Preparación de medios de cultivo.	122
Apéndice B. Resultados prueba preliminar de Azul Nilo para las muestras PHA positivas.	126
Apéndice C. Resultados Masa seca colonias PHA positivas.	127
Apéndice D. Soluciones escala McFarland empleadas par la curva de calibración.	128
Apéndice E. Perfiles cromatograficos obtenidos para los biopolímeros extraídos de las colonias A1 a A8.	129

Resumen

Título: Identificación y caracterización de bacterias productoras de polihidroxialcanoato (PHA) aisladas de muestras de suelos del departamento de Santander *

Autor: Christian Javier Mier Villamizar **

Palabras Clave: Poliésteres, biopolímeros, medicina, biotecnología.

Descripción: Los polímeros plásticos derivados del petróleo acarrear serios problemas ambientales en la actualidad, principalmente debido a la alta resistencia a degradación y su bajo costo de producción. Actualmente, la producción global de plásticos equivale a un poco más de 400 millones de toneladas al año; aproximadamente el 40% del plástico producido se emplea para empaques en Europa, de acuerdo con datos reportados por Plastic Europe, la Asociación de Fabricantes de Plásticos de Europa y EPRO (Asociación Europea de Organizaciones de Reciclado y Recuperación de Plásticos). Para combatir la necesidad de un plástico que posea una degradación ambiental a mediano plazo, provenga de recursos renovables y pueda ser implementada para múltiples aplicaciones médicas, industriales y de agricultura, están los ésteres de polihidroxialcanoato (PHA), una familia de monómeros que a lo largo de los años han demostrado ser una excelente alternativa. En este proyecto de investigación se analizaron tres muestras de suelo de diferentes partes de Santander, dando como resultado 27 aislados bacterianos, los cuales 11 fueron PHA positivas empleando azul nilo como colorante y observándolo bajo el microscopio de fluorescencia. La identificación monomérica se realizó usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), junto con la confirmación de estos resultados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) uni- y bidimensional y análisis por termogravimetría (TGA).

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
Director: William Fernando Hidalgo Bucheli, Doctorado en Química.

Las bacterias con mayor producción fueron identificadas como *Acinetobacter calcoaceticus* y *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* con una acumulación de 59% y 97% del monómero ácido 3-hidroxibutírico (3HB) en función de su PHA total extraído respectivamente.

Abstract

Title: Identification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria isolated from soil samples in the department of Santander *

Autor: Christian Javier Mier Villamizar **

Keywords: Polyesters, biopolymers, medicine, biotechnology.

Description: The high resistance to degradation and low production cost of plastic derived from petroleum make it a serious environmental problem. Currently, the world produces about 400 million tons of plastic per year. About 40% of the plastic made in Europe is used for packaging, according to data from Plastic Europe, the European Plastics Manufacturers Association and EPRO (European Association of Plastics Recovery and Recycling Organisations). To combat the need for a plastic that degrades slowly in the environment, comes from renewable resources and can be used in many different medical, industrial and agricultural applications, there are polyhydroxyalkanoate (PHA) esters, a family of monomers that have been shown to be an excellent alternative over the years. In this research project, three soil samples from different parts of Santander were analyzed, resulting in 27 isolated bacteria, of which 11 were PHA positive using Nile blue as a dye and observing it under a fluorescence microscope. Monomeric identification was performed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), along with confirmation of these results by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) and thermogravimetric analysis (TGA). The

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
Director: William Fernando Hidalgo Bucheli, Doctorado en Química.

bacteria with the highest production were identified as *Acinetobacter calcoaceticus* and *Klebsiella pneumoniae* with an accumulation of 59% and 97% of the monomer 3-hydroxybutyric acid (3HB) based on its total extracted PHA, respectively.

Introducción

La explotación de recursos fósiles para satisfacer la demanda actual de productos plásticos es una seria amenaza para los medios marinos y terrestres, con consecuencias en términos de calentamiento global, riesgos en la salud, y ambientes contaminados. Las propiedades químicas y físicas de estos materiales los hace altamente resistentes a la degradación. Por la complejidad del material y los niveles de contaminación, muchos países del mundo están optando por opciones diferentes a los derivados del petróleo; en este escenario las alternativas que presenten menor impacto ambiental. Entre ellos se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA); bio-polímeros producidos intracelularmente por organismos bacterianos como fuente de energía almacenada en gránulos. Estos materiales fueron descubiertos en bacterias de tipo *Bacillus megaterium* en 1925 por el científico francés Lemoigne [7, 8, 9, 10]. Desde 1974 se han realizado innumerables estudios para descubrir nuevos monómeros pertenecientes a la familia de estos poliésteres, junto con la caracterización y clonación de los genes involucrados en la síntesis de estos polímeros estudiados [11]. En 1995 se tenían reportados 91 tipos diferentes de monómeros, aumentando a 150 ácidos (*R*)-hidroxialcanoicos registrados en el 2020 [12, 13]. Otro de los descubrimientos más relevantes fue la caracterización del primer copolímero y la ruta de biosíntesis del PHA (1990s), como también la elucidación de la estructura cristalina de las principales enzimas responsables para su biosíntesis en el 2017 [14]. Actualmente, muchas de estas utilidades están destinadas a la medicina o salud en general gracias a la biocompatibilidad; entre estas aplicaciones médicas se encuentran ingeniería de tejidos,

parches para bioimplantes y sistemas de liberación de medicamentos, entre otros [2]. De igual manera se han podido ampliar las aplicaciones a sectores como los agrícolas e industriales como: implementación de paquetes y envoltorios cotidianos. Actualmente, las ramas de investigación más importantes para la síntesis de PHA, son la reducción del costo de producción, métodos de menor contaminación para la extracción y modificación genética bacteriana para mejoramiento de producción en los microorganismos productores. Esta investigación se enfocó en la identificación, caracterización y cuantificación de los PHA sintetizados por bacterias provenientes de muestras de suelo del departamento de Santander, Colombia. La investigación tuvo como finalidad encontrar bacterias PHA positivas que puedan ser utilizadas a nivel industrial, con características nombradas en la literatura como que contengan un porcentaje de PHA intracelular mayor al 70 % en función de su masa seca, y que contengan el ácido 3-hidroxi-butírico como monómero principal en la cadena polimérica.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Caracterizar bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) en muestras de suelos del departamento de Santander.

1.2. Objetivos específicos

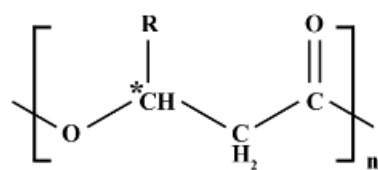
1. Aislar e identificar bacterias productoras de polihidroxialcanoatos en muestras de suelos del departamento de Santander.
2. Caracterizar los Polihidroxialcanoatos producidos por las bacterias que presentaron mayor producción de bioplásticos.
3. Identificación bioquímica de las bacterias que presentaron mayor producción de bioplástico.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades de los polihidroxialcanoatos (PHA)

Los PHA se separan principalmente en tres grupos, los PHA de cadena corta (scl-PHA, por sus siglas en inglés) caracterizados por poseer unidades monoméricas entre 3 a 5 átomos de carbono y los PHA de cadena media (mcl-PHA, por sus siglas en inglés) con unidades monoméricas entre 6 a 14 átomos de carbono y por último los PHA de cadena larga (lcl-PHA, por sus siglas en inglés) los cuales contiene unidades monoméricas con 15 o más átomos de carbono [15, 16, 1]. Una molécula de PHA contiene usualmente entre 600 a 35000 unidades monoméricas de ácidos grasos (R)-hidroxi [4]. Cada unidad monomérica posee un grupo funcional en una cadena lateral R que usualmente puede ser un grupo alquilo saturado (Figura 1) pero también pueden ser grupos alquilo insaturados, o grupos alquilo ramificados y grupos alquilo sustituidos, aunque estas formas son exóticas de encontrar [17].

Estos poliésteres se encuentran almacenados dentro del microorganismo (bacteria) en forma de "granos"(Figura 2). Estos gránulos pueden alcanzar tamaños de entre 0,2 a 0,5 μm ; cada uno contiene alrededor de 10^3 a 10^4 cadenas poliméricas; la pared externa se encuentra recubierto por una mono-capa de fosfolípidos donde se presentan múltiples enzimas (enzimas polimerizantes junto con enzimas despolimerizante) [18, 19] junto con proteínas estructurales conocidas como phasins [20], las cuales son los componentes predominantes en la superficie del gránulo e influyen



Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Figura 1

Estructura química de los polihidroxicanoatos (PHA) [1].

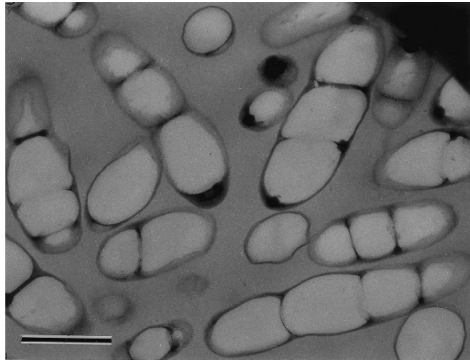
en su tamaño y en su forma [20].

Una gran parte de los polihidroxicanoatos son polímeros semicristalinos. Debido a esto, sus propiedades térmicas y mecánicas se representan en términos de la temperatura de transmisión (T_g) o de la temperatura de fusión (T_m). Estas características se muestran en la *Tabla 1* para los tipos de PHA producidos por bacterias comúnmente empleadas [23]. En condiciones normales, los scl-PHA son polímeros termoplásticos, lo que permite ser moldeados arriba de sus puntos de fusión [15]. Este tipo de PHA exhibe un grado de cristalinidad de 60 a 80%. Sin embargo, a medida que el contenido de 3-hidroxivalerato (3HV) aumenta, esta cristalinidad disminuye del 30 y 40%. La

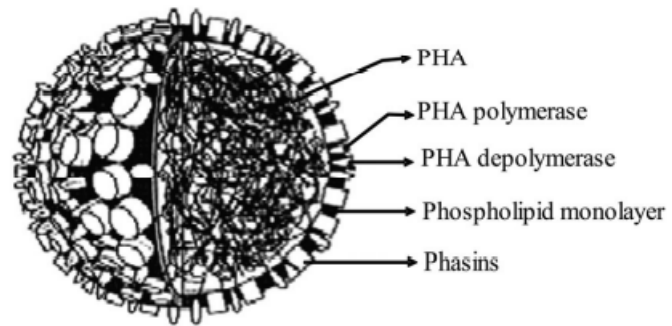
Figura 2

Vista de gránulos de PHA intracelulares y su forma esquemática.

(a) Micrografía electrónica de transmisión de *Cupriavidus necator* recombinante la cual contiene 90% de su peso seco en PHA [21].



(b) Ilustración esquemática de un granulo de PHA intracelular [22].



adición de 3HV también genera que la temperatura de transición u fusión disminuyan; haciendo así que los copolímeros de cadena corta sean materiales más utilizados que el homopolímero [3]. En cuanto a los mcl-PHA, estos son altamente amorfos con un T_g entre -62 y -26 °C y T_m de 42 a 58 °C, por lo cual se clasifican como elastómeros ¹ [24].

También poseen otras propiedades como ser insolubles en agua, enantiómeros (R) puros, no tóxicos (luego de tratamientos posteriores a su extracción), biocompatibles, piezoeléctricos y exhiben una alta tasa de polimerización con altos pesos moleculares llegando hasta siete millones de Dalton (Da) [25]. Estas últimas dos propiedades son los parámetros más importantes en vista que determinan las propiedades mecánicas del polímero [11]. Cuando se trabaja con biopolímeros es muy

¹ Elastómeros: polímeros amorfos que se encuentran sobre su temperatura de transición vítrea (T_g), lo que explica esa considerable capacidad de deformación (como ejemplo tenemos el caucho para neumático).

Tabla 1

Comparación de las propiedades físicas de los principales PHAs producidos por bacterias con algunos plásticos derivados del petróleo [3].

Polímero	Temperatura de fusión (°C)	Módulo de Young (Gpa)	Mpa	Elongación (%)	Temperatura de transición (°C)
P(3HB)	179	3,5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol% 3HV	170	2,9	38	*	*
14 mol% 3HV	150	1,5	35	*	*
25 mol% 3HV	137	0,7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol% 3HV	166	*	28	45	*
10 mol% 3HV	159	*	24	242	*
64 mol% 3HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1,7	34.5	400	45
Poli(etileno-terafalato)	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	*	21
Nylon-6,6	265	2,8	83	60	*

* Información no disponible

relevante conocer su temperatura de degradación, siendo estos valores 246,3 °C y 260,4 °C para el polihidroxibutirato (PHB) y el copolímero Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), respectivamente [9]. Ya que el PHB ha sido el polímero más ampliamente estudiado de esta familia, se ha logrado descubrir muchas de sus características que lo beneficia. Como por ejemplo, su estado ópticamente puro (solo se sintetizan enantiómeros R), al igual que posee una resistencia a

los líquidos mucho menor y una buena barrera natural a la intemperie UV [10].

Sin embargo, la propiedad más importante que tienen estos tipos de polímeros es su posibilidad de degradación. Al ser poliésteres naturales provenientes de bacterias, su degradación en ambientes aerobios (suelo, compost, océano) y ambientes anaerobios (lodos de depuradora, digestores y vertederos) es bastante sencilla gracias a la acción degradante de varias enzimas bacterianas y fúngicas [26]. Cabe resaltar que la capacidad de degradación de cada PHA dependerá de su estructura química, sus componentes estructurales, condiciones ambientales y los tipos de microorganismos que posean las enzimas necesarias [7]. Esta revisión comprende aspectos químicos, biológicos e industriales respecto al potencial que representa actualmente los biopolímeros de tipo PHA como alternativa para mitigar el actual problema de contaminación generada por los plásticos sintéticos. Por tanto, a continuación se describe con mayor detalle cada aspecto relevante e interesante de estos biopolímeros.

2.2. Bacterias productoras de PHA

A lo largo de los años se han realizado incontables estudios principalmente para la producción de scl-PHA. Las bacterias productoras de estos polímeros se pueden dividir en dos principales grupos. El primero, son las bacterias que requieren de limitantes nutricionales como pueden ser el fósforo, nitrógeno, oxígeno o magnesio para acumular PHA intracelularmente. El segundo grupo, lo acumulada durante la fase de crecimiento (aumento de concentración celular) y no requiere de ninguna limitación nutricional [7, 9]. Por ejemplo, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* y *Pseudomonas putida* pertenecen al primer grupo, mientras que *Escherichia coli* recombinante

pertenece al segundo grupo [2].

Múltiples fuentes de carbono principales se pueden emplear como agregado para la síntesis de PHA. No obstante, la cantidad máxima de poliéster acumulado dependerá del tipo de bacteria que se use, su proceso de fermentación y de la fuente de carbono suministrada. Estas fuentes de carbono pueden ser sacáridos (fructosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, etc.), n-alcanos (hexano, octano, dodecano, etc.), ácidos n-alcanoicos (ácido acético, ácido propiónico, ácidos butíricos, ácido valérico, ácido láurico, ácido oleico, etc.), n-alcoholes (metanol, etanol, octanol, glicerol, etc.) y gases (metano y dióxido de carbono) [27]. Las aguas de desecho, que proporcionan una fuente gratuita de carbono también se han empleado para la producción de PHA [28], estas incluyen aceites para freír usados, residuos de vinagre, residuos de alimentos, residuos agrícolas, aguas residuales domésticas, residuos de molinos de aceite vegetal, glicerol puro de producción de biodiésel, residuos plásticos, gases de vertederos, etc. Como vemos en la Tabla 2, múltiples microorganismos son capaces de sintetizar PHA con diferentes fuentes de carbono primarias como las descritas anteriormente; llegando a acumulaciones de hasta 87% de PHA acumulado en masa seca.

Se han realizado varios estudios para analizar la producción de PHB en diferentes colonias bacterianas con múltiples fuentes de carbono. Como ejemplo, empleando una colonia de *Halomonas boliviensis* e hidrolizado de almidón como obtuvo una producción máxima de 56% (p/p) en comparación con el peso seco celular [9]. *Pseudomonas aeruginosa* posee la habilidad de hidrolizar ácidos grasos para la síntesis de PHA, según lo demostraron Fernández y Rodríguez (2005) y

colaboradores [29]; al utilizar aceite de cocina usado como fuente de consumo primaria se obtuvo una producción máxima de 66 % (p/p). Así mismo, se usó aceite de palma usado y melaza para obtener una producción máxima de 57,4 % (p/p) y 56,3 % (p/p), respectivamente [30, 31]. La bacteria *Halomonas mediterranei* junto con enzimas capaces de tratar con almidón produjo una biomasa de 1,14 g/L junto con una acumulación de PHA del 43 % (p/p); cuando se usó almidón de papa como fuente de carbono y la bacteria *Ralstonia eutropha* NCIM 5149 en un baño de fermentación con alta densidad bacteriana se produjo una biomasa de 179,0 g/l y una acumulación de PHA del 55 % (p/p) [2]. Al emplear *P. aeruginosa* 47T2 y ramnolípidos como fuente de carbono, se alcanzó la acumulación de PHA de hasta 10 g/l cuando se implementaron 7,6 g/l de estos biosurfactantes glicolipídicos [32]. *P. aeruginosa* 42A2 mostró diferentes acumulaciones de PHA con diferentes fuentes de carbono; para ácidos grasos de desecho un 66,1 %, para aceite de freír un 29,4 %, para glucosa un 16,8 % y para ácido oleico un 54,6 % [29].

Tabla 2

Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas.

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
<i>Azucares comerciales</i>				
Glucosa	<i>Bacillus cereus</i>	Lote	47,9	[33]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
	<i>Pseudomonas mendocinana</i> NK-01	Matraz de agitación	51,2	[34]
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317	Lote	52,0	[35]
	<i>Pseudomonas putida</i> Δ gcd (recombinante)	Alimentado por lotes	67,1	[2]
	<i>Escherichia coli</i> (mutante)	Lote	11,9	[36]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Lote	10,8	[37]
	<i>Ralstonia. Eutropha</i>	Alimento por lotes	73,8	[38]
	<i>Escherichia coli</i> K24KP (recombinante)	Lote aerobio	37,2	[39]
	<i>Azohydromonas lata</i> IAM 12665	Lote	76,5–79,4	[40]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
	<i>Azotobacter beijerinckii</i> DSM 1041	Lote	24,8	[1]
Sacarosa	<i>Cupriavidus necator</i> (recombinante)	Alimento por lotes	74,3	[41]
	<i>Alcaligenes latus</i>	Alimento por lotes	50,0	[42]
Glicerol	<i>Escherichia coli</i> K24KL (recombinante)	Alimento por lotes	63,0	[43]
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Alimento por lotes	62,0	[44]
	<i>Shimwellia blattae</i> (recombinante)	Alimento por lotes de dos pasos	30,7	[45]
	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	Lote en matraz agitación	31,3	[46]
<i>Almidón</i>				

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
Almidón	<i>Bacillus cereus</i> CFR06	Lote	48,0	[47]
	<i>Azotobacter chroococ- cum</i>	Lote	46,0	[48]
	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	Lote	56,0	[49]
Almidón de maíz (ex- truido)	<i>Haloferax mediterranei</i>	Alimento por lotes re- petida	24,2	[50]
	<i>Haloferax mediterranei</i>	Alimento por lotes	50,8	[51]
Almidón de papa	<i>Ralstonia eutropha</i>	Alimento por lotes	55,0	[52]
	<i>Cupriavidus necator</i> NCIMB 11599	Alimentado por lotes	46,0	[53]
<i>Residuos industriales</i>				
Glicerol crudo	<i>Pandoraea sp.</i> MA03	Lote	63,6	[54]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
	Consortios microbianos mixtos	Lote	47,0	[55]
	Consortios microbianos mixtos	Lote	59,0	[56]
Efluente del molino de madera	Dos colonias diferentes	Lote aerobio	29,0	[57]
Aguas residuales de la industria del almidón	Consortios microbianos mixtos	Lote de secuenciación	60,0-65,0	[58]
Efluente de fabricación de aceite de palma	<i>Comamonas sp.</i> EB172	Alimento por lotes	59,0	[59]
Efluente de fabricación de aceite de oliva	<i>Lampropedia arbour</i> y <i>Candidatus Meganema perideroedes</i>	Fermentación anaeróbica y secuenciación por lotes aeróbica	×	[60]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
Efluente de molino de celulosa kraft	<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37 y <i>Wautersia sp.</i>	Lote	×	[61]
Residuos de fábrica de papel	<i>Plasticicumulans acidivorans</i>	Lotes secuenciados	77,0	[2]
	<i>Defluviicoccus va-nus/Candidatus petibacter phosphatis</i>	Proceso aerobio /anaerobio	42,0	[62]
<i>Desechos de comida</i>				
Almidón de maíz extruido (1:8)	<i>Haloferax mediterranei</i>	Alimento por lotes repetitivo	55,6	[50]
Salvado de trigo	<i>Halomonas boliviensis</i> LC1	Lote	34,0	[63]
Melaza	<i>Escherichia coli</i> (recombinante)	Lote	75,5	[64]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Lote	31,0-44,0	[65]
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Estado solido	39,0	[66]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 2948	Lote	62,0	[67]
Aceite crudo de palmito	<i>Burkholderia sp.</i> (JCM 15050) (recombinante)	Alimento por lotes	66,0	[68]
	<i>Cupriavidus necator</i> (recombinante)	Alimento por lotes	66,0	[69]
Aceite de semilla de palma	<i>Cupriavidus necator</i> (recombinante)	Alimento por lotes	79,0	[70]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
Proteína de suero de leche	<i>Haloferax mediterranei</i>	Alimento por lotes	66,0	[71]
	<i>Haloferax mediterranei</i>	Lote	53,0	[72]
	<i>Thermus thermophiles</i>	Lote	35,6	[73]
	HB8	Lote	40,0	[74]
Permeato de lactosuero	<i>Cupriavidus necator</i> mRePT	Lote	25,0	[75]
	Aceite de soja	<i>Cupriavidus necator</i> H16	Lote de dos fases	57,0
Residuos de aceite de colza para freír		<i>Cupriavidus necator</i>	Lote	67,9
	H16			

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
Residuos de aceite de girasol para freír	<i>Cupriavidus necator</i> H16	Lote	52,4	[77]
Aceite de maíz	Especies de <i>Pseudomonas</i>	Lote	35,63	[78]
	<i>Cupriavidus necator</i> H16	Lote	79,0–82,0	[79]
Vinaza de caña de azúcar	<i>Haloferax mediterranei</i>	Lote	70,0	[80]
Residuos de malta	<i>Alcaligenus eutrophus</i> DSM1124	Lote	70,0	[81]
	<i>Azohydromonas australica</i> ATCC 29713	Lote	70,1	[82]
Residuos de soja	<i>Alcaligenus eutrophus</i> DSM1124	Lote	32,57	[81]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
Residuos de restaurante	<i>E. coli</i> pnDTM2 re-combinante	Lote	45,0	[83]
	<i>Cupriavidus necator</i> H16	Alimentación continua	87,0	[84]
<i>Biomasa lignocelulósica</i>				
Paja de trigo	<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	Alimento por lotes	72,0	[85]
Paja de arroz	<i>Bacillus firmus</i> NII 0830	Lote	89,0	[86]
Bagazo de caña de azúcar	<i>Burkholderia sp</i>	Alimento por lotes	48,0	[87]
	<i>Cupriavidus necator</i>	Lote	57,0	[88]

Tabla 2 – Microorganismo productores de PHA junto con sus respectivas fuentes de carbono utilizadas

Fuente de carbono	Microorganismo	Modo fermentación	Contenido de PHA (%)	Ref.
<i>Aguas residuales</i>				
Aguas residuales de almidón de yuca	<i>Bacillus tequilensis</i> MSU 112	Lote de secuenciación	79,2	[89]
	<i>Cupriavidus</i> sp. KKU38	Lote	61,6	[2]
Aguas residuales de cervecería	Consortio de lodos activados	Reactor discontinuo agitado	39,0	[90]
Efluentes de aguas residuales de procesamiento de alimentos	Consortio de lodos activados	Lote	60,7	[2]
Aguas residuales de tomate	Consortio de lodos activados	Lote	20,0	[91]

Una bacteria que es bastante interesante de examinar es *Pseudomonas putida*, gracias a que tiene la tendencia de sintetizar PHA que incorporan diferentes grupos funcionales como fenilo, alcoxi, alquenos, halógenos, alquilos y ésteres cuando crece con una fuente de carbono que contiene estas estructuras químicas [29]. También, es útil para la producción de PHA con grupos cianofenol, nitrofenoxido, metilfenoxi, alcoxi y enlaces triples carbono-carbono. En un estudio, se emplearon 36 fuentes de carbono diferentes para sintetizar PHA empleando *P. putida* KCTC 2407, llegando a la conclusión de que la síntesis de PHA empleando ácidos carboxílicos de cadena corta que contienen grupos funcionales con bromo, etoxi, ciclohexilo, metoxi, fenoxi y olefina como fuentes de carbono no es viable; al menos con este tipo de bacterias [92]. Otra de las bacterias que son interesantes debido a que producen Scl-PHA es *Pseudomonas fluorescens* junto con las especies *Azohidromonas*, *Burkholderia* y *Cupriavidus*. Por ejemplo, *A. lata* registró la producción de P3HB en una tasa de 50% a 88% en comparación de su peso seco celular usando diferentes azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa [7]. Mientras que *Burkholderia sp.* USM (JCM 15050) produjo P3HB en un 69% desde ácidos grasos [1]. En la Tabla 2 se detalla una amplia lista de bacterias capaces de sintetizar PHA.

2.2.1. Degradación de PHA. La principal ventaja de los polihidroxicanoatos es su degradabilidad en el ambiente. Esto se logra gracias a que los gránulos son hidrolizados por los microorganismo que buscan en ellos fuentes de carbono y energía; lo hacen por medio de despolimerasas que son secretadas de las células y se adhieren a la superficie del polímero convirtiéndola en unidades de monómeros independientes [93]. El tiempo que tarda la degradación del polímero

depende de su naturaleza propia, así como también las condiciones ambientales a las que son expuestos [94]. Se ha observado degradación de los PHAs en gran cantidad de ambientes incluyendo aerobios, anaerobios, salinos, marinos y otros (Tabla 3) [4].

Tabla 3

Algunos ejemplos de microorganismos degradadores de PHA aislados de diferentes medios ambientales [4].

Fuente de la que se aisló	Microorganismo
Suelos	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Acidovorax faecalis</i>
	<i>Comamonas sp.</i>
	<i>Pseudomonas lemoignei</i>
	<i>Variovorax paradoxus</i>
Lodo activado	<i>A. faecalis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mar	<i>Comamonas testosteroni</i>
Rio	<i>P. stutzeri</i>
Lodo anaerobio	<i>Ilyobacter delafieldii</i>

Se han realizado estudios ecológicos y taxonómicos sobre la abundancia y diversidad de microorganismos degradadores de P3HB y P(3HB-co-3HV). Las principales variables consideradas fueron el tiempo, el tipo de ambiente, la temperatura de incubación y el % de hidroxivalerato (3HV) [93]. Un total de 330 microorganismos degradadores fueron aislados e identificados desde muestras de suelos y muestras líquidas: 154 bacterias, 77 estreptomicetos y 99 hongos. Las bacterias degradadoras de PHA están divididas en once grupos con base en la especificidad de las despolimerasas por su sustrato y los hongos en al menos 95 géneros conocidos como degradadores de PHA. La mayoría de las bacterias caracterizadas presentan una especificidad dependiente de la longitud de

la cadena del polímero (corta o media), aunque algunas manifiestan la capacidad de utilizar una variedad importante de polímeros. La lista completa de organismos degradadores de los PHA aparece en [3, Pág. 95].

2.2.2. Biosíntesis de PHA. Los polihidroxicanoatos juegan un rol primordial en la supervivencia del microorganismo, permitiendo su permanencia a largo plazo bajo condiciones de estrés nutricional sirviendo como almacenamiento de energía. La biosíntesis de estos materiales esta muy ligada a los procesos metabólicos de la bacteria como lo son la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -oxidación, síntesis de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos, ciclo de Calvin y la síntesis de serina [1]. A su vez, muchos de los intermediarios en estas rutas biosintéticas se comparten con la síntesis de estos poliésteres como podría ser el ejemplo del Acetil-CoA. Los caminos de síntesis se encuentran más detallados en la Figura 3.

2.2.2.1. Enzimas involucradas en la síntesis de PHA. Las enzimas claves para la bioinformación que codifica la síntesis de PHA son: PhaA que traduce la enzima 3-cetotilasa; aislada y estudiada en bacterias como *Azotobacter beijerinckii*, *Ralstonia eutropha*, *Zooglea ramigera* y *Rhizobium japonicum*, PhaB que traduce la (R)-3-ketoacetil-CoA reductasa; también estudiada en bacterias de tipo *Azotobacter beijerinckii*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Rhodospirillum rubrum* y *Streptomyces coelicolor*. Para la síntesis de PHB esta enzima específica es la acetoacetil-CoA reductasa; PhaC que es la llamada PHA sintetasa, PhaG que traduce (R)-3-hidroxiacetil-CoA hidrolasa [10]. Como se observa en la Figura 3 todas las enzimas empleadas son enantioméricamente selectivas, es por esto que una de las características del PHA es su sín-

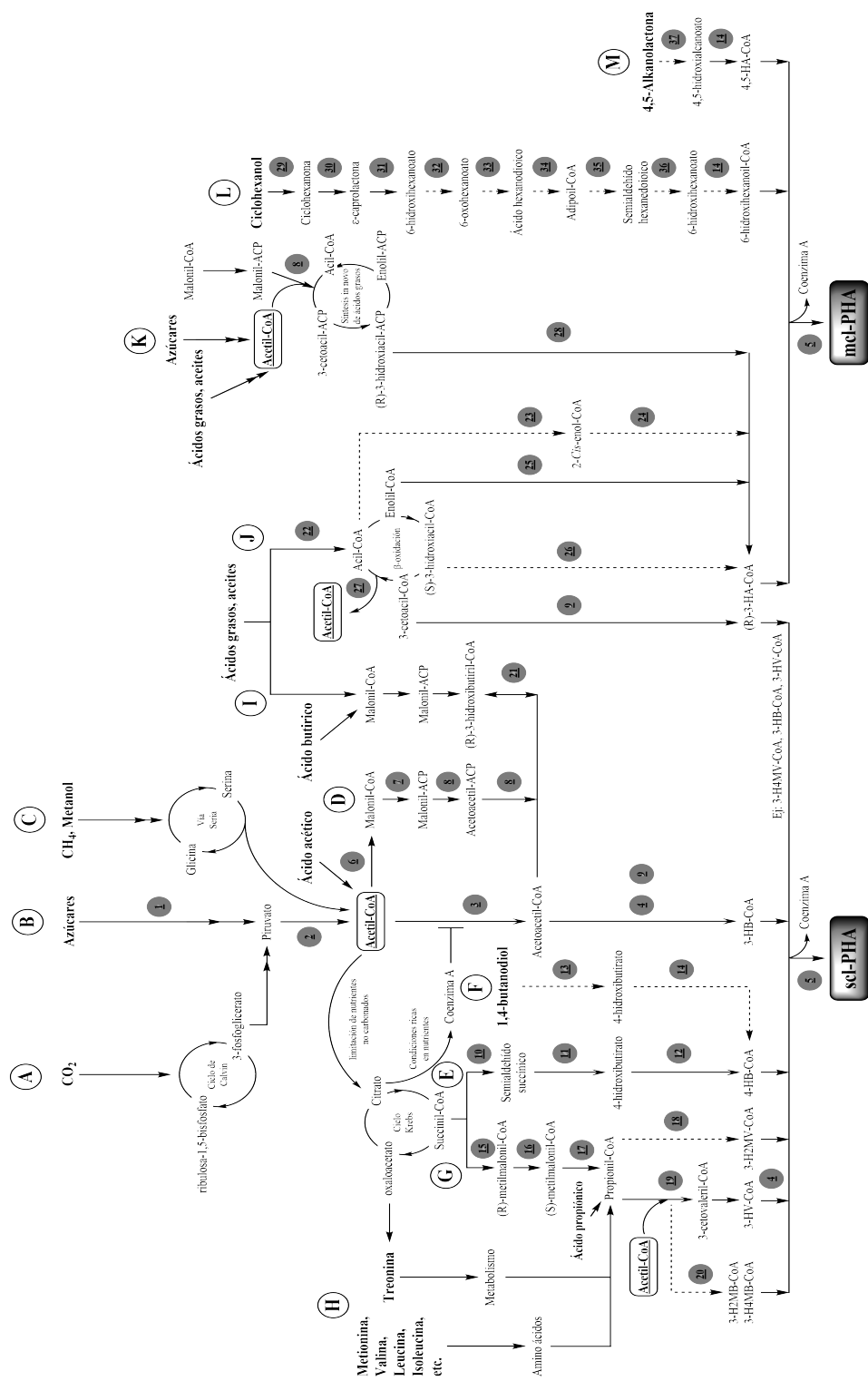


Figura 3
 Rutas sintéticas de los polímeros de tipo PHA. Las líneas punteadas representan rutas secundarias, los números representan las enzimas involucradas en las reacciones químicas que se resumen en la Tabla 4 y las letras sombreadas representan la cantidad de rutas sintéticas descubiertas hasta la fecha (ya sean principales o secundarias). Traducido y modificado de [1, 2].

tesis de solo el enantiómero R. Además, tiene relevancia mencionar que la enzima PhaC se divide en 4 grupos donde se diferencian por su estructura y por sus especificidad de sustrato. La primera clase (clase I) de PHA polimerasa fue obtenida de un operon phaCAB aislada de las especies *Cupriavidus necator*, *Acinetobacter spp.*, *A. latus* y *P. acidophi* [95]; esta clase de polimerasa solo presenta una subunidad y su masa molecular se encuentra entre los 61 y 73 kDa. Estas enzimas son selectivas con los sustratos que emplean, usan tioésteres de CoA de varios (R)-3-hidroxiácidos grasos con 3 a 5 átomos de carbono [96]. La segunda clase (clase II) encontrada en especies de *Pseudomonas*, se divide en dos sub-unidades: phaC1 y phaC2 y están asociadas a la síntesis de PHA de cadena media [97]; al igual que la clase I su peso molecular ronda entre los 61 y 73 kDa, pero a diferencia de la primera clase, estas enzimas prefieren tioésteres de CoA de varios (R)-3-hidroxiácidos grasos con 6 a 14 átomos de carbono [96]. Así mismo, la tercera clase (clase III) está compuesta por dos sub-unidades: PhaC y PhaE (Aproximadamente 40 KDa); este tipo de enzimas principalmente sintetizan PHA de cadena corta (scl-PHA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, cataliza la polimerización de la unidad monomérica mcl, este tipo de enzima cataliza la hidratación del compuesto 2-enoil-CoA (ruta J de Figura 3) para ayudar a dar constituyentes monoméricos de 3-hidroxiacil-CoA que aportan al desarrollo de PHA de cadena media (mcl-PHA). En algunos casos, para bacterias del género *Bacillus* como el *Bacillus megaterium* se presenta una última clase de enzimas: la enzima de clase 4 (clase IV) corresponde a dos subunidades: PhaC Y phaR (Aproximadamente 20 KDa) y están relacionadas con la síntesis de scl-PHA [25, 96]. La subunidad PhaC de las anteriores clases presenta una similitud en su secuencia de aminoácidos del 21-28% con respecto a las sintetasas de la clase I y II y tiene una masa molecular de aproximadamente 40 kDa.

Estas sintasas tienen una especificidad de sustrato hacia los tioésteres de CoA de varios ácidos grasos (R)-3-hidroxi con 3 a 5 átomos de carbono [95].

En relación con la colonia bacteriana a seleccionar, existen muchos factores que pueden impactar en las características y producción del PHA, en particular las siguientes propiedades pueden afectar el peso molecular del polímero. (I) El nivel de expresión de la enzima activa PHA sintetasa, entre mayor sea su concentración, menor será la masa molecular del biopolímero; (II) la presencia de enzimas capaces de degradar el PHA durante su síntesis, como también de otras esterasas y lipasas inespecíficas. Si estas enzimas no están presentes, polímeros de mayor peso molecular se producirá; (III) la actividad catalítica de la PHA sintasa activa; (IV) ocurrencia de reacciones de transferencia de cadena [11]. En general, la composición monomérica de estos poliésteres dependerá de la PHA sintetasa específica para cada especie y en los precursores de tioéster de hidroxiacil-CoA suministrados a la enzima, los cuales dependerán de la ruta metabólica (Figura 3) que opera en el microorganismo y su fuente de carbono externa [2].

2.2.2.2. Ruta de biosíntesis por sacáridos libres. Inicialmente, sustratos como la glucosa entran a su proceso metabólico convencional para producir acetil-CoA. A partir de ahí, la 3-Cetotiolasa (PhaA) combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA; posteriormente, la Acetoacetil-CoA reductasa (enzima 4) permite la reducción de acetoacetil-CoA mediante NaDH para producir (R) 3-hidroxiacetil-CoA; finalmente, la PHA sintetasa (PhaC) polimeriza los (R) 3-hidroxiacetil-CoA para producir PHB, en este momento la coenzima-A es liberada [98]. En la Figura 3 esta ruta de síntesis aparece demarcada como la ruta B, cabe mencio-

nar que solo se producen *R*-isómeros ya que las enzimas son selectivas para sustratos con estas configuraciones estereoquímicas. Durante el crecimiento normal de la bacteria, la producción de 3-Cetotiolasa estará inhibida, ya que la coenzima-A estará fuera del ciclo de Krebs. Pero cuando el ingreso de acetil-CoA al ciclo de Krebs está inhabilitado (durante la limitación de nutrientes no carbonados) el excedente de acetil-CoA se canaliza hacia la biosíntesis de PHB [99]. Principalmente, las bacterias que producen scl-PHA emplean esta ruta para tal fin; todas las enzimas mencionadas anteriormente, se relacionan en la Tabla 4. Posterior a la síntesis del polímero, el mismo es almacenado en el citosol junto con todas las enzimas que lo producen [10].

2.2.2.3. Ruta de biosíntesis por β -oxidación. La β -oxidación y las rutas de biogénesis de ácidos grasos se utilizan para la producción de sustratos fuente en apoyo a la síntesis de polímeros. Esta ruta puede usar ácidos grasos recién sintetizados o intermediarios de las rutas de carbohidratos para producir (*R*)-3-hidroxiacil-CoA; este metabolito se emplea como sustrato para la PHA polimerasa. Los precursores de las rutas de β -oxidación que contienen enoil-CoA, 3-cetoacil-CoA y (*S*)-3-hidroxiacil-CoA funcionan como sustratos para la producción de mcl-(*R*)-3-hidroxiacil-CoA, que se utiliza en la producción de mcl-PHA [100]. Si la fuente de carbono se oxida a Acetil-CoA excluyendo la ruta de β -oxidación, entonces los intermediarios de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos se desvían hacia la síntesis de PHA catalizada por la transacilasa (PhaG). Esta transacilasa específica cataliza la transferencia de la fracción (*R*)-3-hidroxiacil del respectivo tioéster de proteína portadora de acilo (ACP) a CoA [101, 102]. Si la fuente de carbono se oxida a través de la vía de β -oxidación de ácidos grasos, entonces la enoil-CoA hidratasa (PhaJ)

específica de (R) cataliza la oxidación de enoil-CoA a (R)-3-hidroxiacil-CoA [103]. En relación a esto, la mayor parte de *pseudomonas*, por ejemplo *P. oleovorans* genera mcl-PHA utilizando β -oxidación. Siguiendo la ruta J presente en la Figura 3 incluye la contribución de enzima acil-CoA sintetasa (FadD), número 22 en la Tabla 4, la cual activa la estimulación de n-fenilalcanoico junto con compuesto de ácido n-alcanoico ($n > 4$) en la dirección de productos de acil-CoA. Posteriormente, la acil-CoA deshidrogenada (FadF) que necesita la contribución de la flavoproteína (FadE) transportadoras de electrones que activa la inserción de un enlaces doble en la configuración β [10]. Los productores de PHA estimulados por acetil-CoA se producen en el camino del anabolismo a través de la producción de ácidos grasos (*in novo*) (Ruta K) o en el camino de la descomposición por la β -oxidación de ácidos grasos.

Tabla 4

Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3 modificada de [1].

N°	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	<i>Cupriavidus necator</i>	[104]
2	Complejo piruvato deshidrogenasa	×	<i>Cupriavidus necator</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	[104]
3	3-cetotiolasa	PhaA	<i>Cupriavidus necator</i>	[105]

Tabla 4 – Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3

N°	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
4	Acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH	PhaB	<i>Cupriavidus necator</i>	[105]
5	PHA sintetasa	PhaC	<i>Cupriavidus necator</i> y varios	[105]
6	Acetil-CoA carboxilasa	ACC	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	[106]
7	Malonil-CoA:ACP transacilasa	FabD	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	[106]
8	Proteína transportadora de 3-cetoacilo sintasa	FabH	<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	[106]
9	3-cetoacil reductasa dependiente de NADPH	FabG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[107]
10	succínico semialdehído deshidrogenasa	SucD	<i>Clostridium kluyveri</i>	[108]
11	4-Hidroxibutirato Deshidrogenasa	4HbD	<i>Clostridium kluyveri</i>	[108]

Tabla 4 – Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3

N°	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
12	4-hidroxibutirato-CoA:CoA trans-ferasa	OrfZ	<i>Clostridium kluyveri</i>	[108]
13	Alcohol deshidrogenasa, putativo	×	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4	[109]
14	Hidroxiacil-CoA sintasa, putativo	×	<i>Cupriavidus necator</i> , mutante y recombinante	[110]
15	Metilmalonil-CoA mutasa	Sbm	<i>Escherichia coli</i> W3110	[111]
16	Racemasa de metilmalonil-coa	×	<i>Nocardia corallina</i>	[112]
17	Metilmalonil-CoA descarboxilasa	YgfG	<i>Escherichia coli</i> W3110	[111]
18	Cetotiolasa, putativo	×	×	[113]
19	3-cetotiolasa	BktB	<i>Cupriavidus necator</i>	[114]
20	Cetotiolasa, putativo	×	×	[113]

Tabla 4 – Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3

Nº	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
21	AcetoacetylCoA reductasa dependiente de NADPH	×	<i>Rhizobium (Cicer) sp.</i> CC 1192	[115]
22	Acil-CoA sintetasa	FadD	<i>Pseudomonas putida</i> CA-3 y <i>Escherichia coli</i> MG1655	[?]
23	Acil-CoA oxidasa, putativo	×	×	[116]
24	Enoyl-CoA hidratasa I, putativa	×	×	[116]
25	(R)-Enoil-CoA hidratasa	PhaJ	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	[117]
26	Epimerasa	×	×	[116]
27	3-cetoacil-CoA tiolasa	FadA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	[118]
28	3-Hidroxiacil-ACP:CoA transacilasa	PhaG	<i>Pseudomonas mendocina</i>	[119]

Tabla 4 – Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3

N°	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
29	Ciclohexanol deshidrogenasa	ChnA	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	[120]
30	Ciclohexanona monooxigenasas	ChnB	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	[120]
31	Caprolactona hidrolasa	ChnC	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	[120]
32	6-hidroxihexanoato deshidrogenasa	ChnD	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	[120]
33	6-oxohexanoato deshidrogenasa	ChnE	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19 y <i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU	[120]

Tabla 4 – Enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis del PHA presentes en la Figura 3

N°	Enzima	Abreviación	Especie bacteriana	Ref.
34	Semialdehído deshidrogenasa, putativo	×	×	[121]
35	6-hidroxihexanoato deshidrogenasa, putativa	×	×	[121]
36	Hidroxiacil-CoA sintasa, putativa	×	×	[121]
37	Lactonasa, putativo	×	<i>Cupriavidus necator</i> recombinante y mutante	[122]

2.3. Métodos de identificación y caracterización de PHA

En la actualidad el PHA bacteriano puede identificarse parcialmente con azul Nilo A (cloruro de 5-amino-9-dietilaminobenzo [alfa] fenazonio) que presenta fluorescencia naranja a una longitud de onda de 460 nm y el rojo Nilo (7 - diethylamino - 3,4 benzofenoxa - zina - 2 - ona) que como el azul Nilo presenta fluorescencia naranja bajo la misma longitud de onda. Estos colorantes son afines a la monocapa lipídica del gránulo de PHA permitiendo así su visualización bajo luz UV

[123].

La cuantificación del biopolímero es posible desarrollarla bajo varios métodos; tales como: análisis por termogravimetría (TGA, por sus siglas en inglés), espectroscopia UV, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, cromatografía de gases, cromatografía líquida, espectroscopia bidimensional y citometría de flujo (para células intactas) y cromatografía iónica [124, 15]. Para determinar la composición monomérica presente normalmente se emplea cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de filtración en gel y la calorimetría diferencial de barrido. En el caso de las técnicas por RMN éstas se han aplicado exitosamente en el estudio de la estructura de los PHA. El análisis del espectro ^1H RMN permite determinar la composición del polímero y la distribución de las unidades monoméricas puede deducirse de las secuencias de diadas y triadas por análisis espectral de ^{13}C RMN [125].

2.4. Aplicaciones

Los PHA poseen un amplio catálogo de aplicaciones, estas van desde la fabricación de empaques y cubiertas, hasta elementos específicos y complejos como válvulas cardiovasculares o cápsulas para la liberación de medicamentos *en vivo*. A pesar de todas las aplicaciones que se le puedan atribuir a estos poliésteres, uno de los problemas actuales y más importantes es el costo de producción a gran escala. El precio de mercado para polímeros sintéticos como el polipropileno o el polietileno en dólares estadounidenses (USD) varía de 0,60 a 0,87 USD/lb, mientras que, el costo de producción de PHA es 3 a 4 veces mayor, llegando hasta los 2,25 a 2,75 USD/lb [126]. Los factores que más contribuye al aumento del precio para la producción de estos materiales incluyen la fuente

de carbono primaria, el costo de funcionamiento de la fermentación, la eficiencia del proceso, los rendimientos de la fuente de carbono seleccionada y el procesamiento posterior (extracción) [127]. El tipo de sustrato suministrado para alimentar los microorganismos juega un rol crucial para la producción de PHA y representa aproximadamente el 50% del costo de producción [5, 128]. Otras de las variables que son necesarias optimar en la implementación de cultivos microbianos puros o el uso de cultivos microbianos mixtos (MMC, por sus siglas en inglés); estos pueden tener diferentes requerimientos nutricionales, donde dependiendo del tipo de sustrato (MMC utiliza sustratos mixtos como desechos orgánicos) la cantidad y calidad del polímero producido puede variar. Por otro lado, los cultivos puros tienden a tener composiciones nutricionales definidas, sin embargo, esto en biorreactor a nivel industrial no contribuye a la economía del proceso [129]. Otras variables que se pueden optimizar son el pH, la temperatura del biorreactor, concentración del inóculo, y el tiempo de incubación [5]. El método de extracción es otra de las variables que se deben tener muy presentes, este método determina la pureza y el porcentaje de recuperación del biopolímero. Diferentes tipos de extracción se han realizado hasta la fecha los cuales incluyen la digestión química o enzimática, la disrupción mecánica y la extracción por solvente, entre otros. Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción se presentan en la Tabla 5.

Luego de evaluar todos los impedimentos que se presentan a la hora de producir el PHA a nivel industrial y los cuales encarecen su costo de producción, también existen formas de solucionar estas dificultades. Iniciando, una colonia que se implemente a nivel industrial no puede ser patógena, se debe tener conocimiento de su genotipo completo, fácil manipulación de su genotipo, alta

Tabla 5

Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de extracción para el PHA, modificado y traducido de [5].

Método de extracción	Ventajas	Desventajas
Extracción por solventes	Eliminación de endotóxicos, altas purezas sin degradación del polímero	Evitarlo para procesos a gran escala debido a efectos peligrosos a la salud y la ruptura morfológica de los gránulos de PHA
Homogenización a altas presiones	No se emplean químicos	Bajas cantidades de biomasa tienen baja tasa de disrupción
Disrupción por molino de esferas	No se emplean químicos	Requiere de varias repeticiones
Digestión por surfactantes	Tratamientos con altas densidades microbianas sin ningún tipo de degradación del polímero	Necesidad de tratamientos posteriores de los residuos, purificación baja.
Digestión por quelatos y surfactantes	Alta pureza, baja contaminación del ambiente	Generación de alta cantidad de residuos
Ruptura celular por choque osmótico	Fácil aplicación	No todos los microorganismos son compatibles, baja eficiencia, alto requerimiento de químicos y agua
Extracción por fluidos supercríticos	Fácil aplicación, No afecta el funcionamiento o estructura enzimática	Alto costo de implementación

densidad bacteriana en el medio de cultivo escogido (>200 g/l), y que pueda digerir celulosa de manera innata. Esta colonia debería poseer un amplio rango de supervivencia bajo condiciones de temperatura y pH del biorreactor. Con estas características no es difícil obtener una producción de PHA de bajo costo, una acumulación mayor al 90% en peso seco de polímero intracelular o la implementación de sustratos como almidones, sustratos mixtos que tengan una tasa de conversión

mayor al 50% g/g. De la misma manera, tener la posibilidad de sintetizar scl-PHA o mcl-PHA con sustratos seleccionados que puedan salir de desechos industriales. Para conveniencia de la extracción posterior a la fermentación, este microorganismo seleccionado debe poseer un gran tamaño celular, una pared celular frágil, floculación fácil o inducible, etc. [6]. Todas las características descritas anteriormente y algunas otras se presentan en la Tabla 6 donde se analizan algunas tecnologías que es posible desarrollar para disminuir el costo de producción del PHA, como también las tecnologías que se pueden desarrollar para aumentar el valor del PHA en el mercado.

Tabla 6

Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA, modificada y traducida de [6]

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
<i>Tecnologías a desarrollar para reducir el costo de producción de PHA</i>		
Fermentación de alta densidad celular	Lograr un crecimiento efectivo y la recuperación de los microorganismos	Manipulación de los mecanismos de captación de oxígeno celular y detección de quórum
Crecimiento celular en sustratos de bajo costo o sustratos mixtos	Los sustratos contribuyen a un 50% del coste del PHA	Detección de sustratos específicos que utilizan bacterias capaces de producir un alto contenido de PHA

Tabla 6 – Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA.

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
Células de crecimiento rápido	Reduce el tiempo de fermentación y evita contaminación por otros microorganismos	Minimizando el genoma bacteriano, cambiando los patrones de crecimiento celular
Células de crecimiento rápido usando CO_2 como sustrato	CO_2 es un sustrato gratis	Manipular el mecanismo de absorción de CO_2 como los carboxisomas, etc.
Procesos de fermentación continuos y abiertos (no estériles)	Guardar energía para la esterilización, reduce procesos de fermentación complejos y poco eficientes	Selección de microorganismo que tengas un crecimiento rápido bajo condiciones agresivas de temperatura o pH
Síntesis de PHA inducida por limitaciones de oxígeno	Oxígeno es un factor limitante en todos los crecimientos con altas densidades celulares	Establecer operones de PHA sintetasa detrás de promotores microaerobios

Tabla 6 – Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA.

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
Acumulación de PHA muy alta (>95 % en peso seco)	Evita la implementación de métodos de extracción costosos y complicados	Manipulación de PHA sintéticas y sus mecanismos
Aumentar el sustrato (fuentes de carbono) a la eficiencia de síntesis de PHA	Los sustratos contribuyen a un 50 % del coste del PHA	Eliminar las vías que consumen sustratos necesarios para la síntesis de PHA y/o reforzar el flujo de síntesis de PHA
Aumentar de tamaño las células productoras de PHA	Permite mayor acumulación de PHA intracelular y es más fácil su recolección	Modificando los patrones de división o los citoesqueletos
Floculación celular inducible	recolección de la biomasa de una forma más eficiente	sobre expresar las proteínas exteriores adhesivas
Lisis celular inducible	Fácil recuperación de gránulos de PHA después de la recolección de biomasa	Sobre expresión de proteínas generadoras de lisis celular

Tabla 6 – Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA.

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
Ruptura celular por sobreproducción de PHA	Se ahorra el paso de ruptura celular	Manipulación del mecanismo de síntesis de PHA y PHA sintasas
Producción de PHA extracelular	No hay limitación por espacio celular, fácil recuperación de gránulos de PHA	Nuevos mecanismo de síntesis de PHA
Gránulos de PHA grandes	Fácil recolección de los gránulos luego de la lisis celular	Manipulación de las proteínas encargadas de la formación de los gránulos de PHA
<i>Tecnologías para aumentar el precio del PHA</i>		
Síntesis de PHA contralable con estructuras definidas	Para formar homopolímeros de PHA, monómeros de proporciones definidas en copolímeros aleatorios y copolímeros de bloque	Modificación de las vías de síntesis de PHA, especialmente las vías de β -oxidación

Tabla 6 – Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA.

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
Formación de PHA funcional controlable	Para formar materiales inteligentes de PHA con propiedades de pH, temperatura y sensibilidades de humectabilidad o shape memory, etc.	Adiciones de PHA funcional como precursores de monómeros
Aumentar la diversidad del PHA	Encontrar otras posibles aplicaciones	Adición de cadenas laterales funcionales al PHA
Pesos moleculares muy altos	Obtención de fibras muy fuertes	Modificación de PHA sintetasas u operon
Producción de monómeros quiralmente puros	Principalmente como fármacos o como compuestos principales para la síntesis de moléculas de fármacos	Eliminación de PHA sintetasas en la ruta de síntesis de PHA

Tabla 6 – Tecnologías a desarrollar para mejorar la industrialización de los bioplásticos de tipo PHA.

Tecnologías	Razón o propósito	Metodología
PHA como textiles de buena calidad	El PHA se puede convertir en textiles que tienen valores más altos que los materiales de embalaje	Cristalización controlable de fibras de PHA

2.4.1. Aplicaciones médicas. Los PHA tienen un gran rango de aplicaciones médicas, desde la ingeniería de tejidos, parches bio-sintéticos, vehículos de liberación de medicamentos, quirúrgicos y apósitos para heridas. Uno de los mayores obstáculos que presentan estos poliésteres en aplicaciones médicas es que la mayoría de estos son producidos por bacterias Gram-negativas, las cuales presentan en su membrana celular externa unas endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS, por sus siglas en inglés) las cuales pueden co-purificarse durante el proceso de purificación del PHA crudo [130]. Estas endotoxinas son agentes pirógenos los cuales presentan respuesta inflamatoria [131], haciendo al PHA inadecuado para estas aplicaciones. La eliminación de estas endotoxinas se puede realizar mediante la purificación del polímero usando agentes oxidantes (hipoclorito de sodio con NaOH, ozono, peróxido de hidrógeno y peróxido benzoico) durante procesos repetitivos de extracción por solvente o extracción por solvente seguido de purificación con carbón

activado [132, 133]. Como se evidenció anteriormente, esto aumentaría el precio de producción y afectaría las propiedades físicas y químicas del biopolímero (reducción en su masa moléculas y polidispersión) [1]. Este problema se soluciona reemplazando la síntesis de estos materiales con bacterias Gram-positivas; las cuales no presentan LPS en sus paredes celulares [10]. Cabe mencionar que la característica más importante en los polímeros de PHA es su biocompatibilidad. Ya que al entrar al metabolismo celular el ácido 3-hidroxi-butírico (producto de su hidrólisis) se encuentra normalmente en la sangre en concentraciones entre 0,3 y 1,3 mmol/l [9].

2.4.1.1. Ingeniería de tejidos. Esta es una ciencia que tiene como objetivo volver a desarrollar tejido dañado y no saludable mediante la implantación de biomateriales [134, 135]. Existen dos clases de ingeniería de tejidos: la de tejidos blandos la cual son andamios biodegradables más porosos donde se implantarán otro tipo de celular seguido del crecimiento *ex-vivo*, como por ejemplo, células del corazón, hígado, piel y tejidos nerviosos. La otra clase son los andamios duros, los cuales son soportes bioactivos que permiten el desarrollo de nuevas células como los tejidos óseos y cartilagosos [10]. Algunos de los poliésteres que se emplean para estas aplicaciones son el P(3HB), P(3HB-3HV), P(4HB), P(3HO) y P(3HB-HHx) [136]; el PHB y PHBV pueden usarse como matrices *in vitro* para la proliferación de diferentes células humanas, como endoteliales, hepatocitos aislados y fibroblastos las cuales muestran un buen crecimiento en estos materiales [137, 128].

2.4.1.2. Parches para bioimplantes. Gracias a la naturaleza compatible, baja respuesta inflamatoria, biodegradabilidad y uso en reparación de tejidos, el PHA puede ser usado

como parches para bío-implantes en el cuerpo humano. La resección local y el cierre por sutura de los defectos transmurales en el tracto gastrointestinal a menudo se llevan a cabo como tratamientos. Dicho cierre se puede realizar mediante parches bío-implantados de polímeros como PHB [138]. Se ha informado que los implantes ortopédicos basados en PHB se usan en gatos [139].

2.4.1.3. Sistema de liberación de medicamentos. Polímeros biodegradables ya sean homo o co-polímeros como el lactato y glicolato son frecuentemente usados a nivel comercial para la aplicación de sistema de liberación de medicamentos. Estos productos son administrados por vía parenteral donde el fármaco se difunde durante un período de 30 días. Sin embargo, copolímeros de lactato y glucolato se degradan por hidrólisis impidiendo el control completo de la liberación del fármaco [140]. La liberación depende mucho de la matriz porosa, de la composición del copolímero y de la masa molecular del medicamento a utilizar y es independiente del peso molecular del polímero [141]. Gracias a la biodegradabilidad y la naturaleza compatible de los polímeros de PHA, existe una inmensa curiosidad por la implementación de estos materiales en la aplicación de sistema de liberación de medicamentos [142, 143]. El modo de implementación de estos materiales es la introducción de medicamentos especializados en compartimiento de micro o nano esferas de PHA, luego de su natural degradación en el cuerpo el fármaco sea automáticamente liberado de este compartimiento. Estos materiales como acarreadores de medicamentos o de vacunas se han implementado en varios estudios con animales los cuales incluyen ganado, ratones, perros y humanos para tratar, por ejemplo, la gingivitis [144]. Para la cura de la osteomielitis crónica e implantología se han cargado fármacos como la sulbactamcefoperazona a bastoncillos de PHBV

[145]. Finalmente, los altos puntos de fusión de P(3HB) y P(HB-HV) a veces son una desventaja y el uso de mcl-PHA con puntos de fusión más bajos podría proporcionar un avance considerable en la administración de fármacos [146].

2.4.1.4. Aplicaciones quirúrgicas. El PHA y sus derivados se emplean para desarrollar dispositivos que incluyen suturas, sujetadores de sutura, dispositivos de reparación de meniscos, remaches, tachuelas, grapas, tornillos (incluidos los tornillos de interferencia), placas óseas y sistemas de placas óseas, mallas quirúrgicas, parches de reparación, cabestrillos, parches cardiovasculares, clavos ortopédicos (incluyendo material de aumento de relleno óseo), barreras de adhesión, stents, dispositivos de reparación/regeneración de tejidos guiados, dispositivos de reparación de cartílago articular, guías nerviosas, dispositivos de reparación de tendones, dispositivos de reparación de comunicación interauricular, parches pericárdicos, agentes de carga y relleno, válvulas de vena, andamios de médula ósea, dispositivos de regeneración de meniscos, injertos de ligamentos y tendones, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, sustitutos de piel, sustitutos de duramadre, sustitutos de injertos óseos, pasadores óseos, apósitos para heridas y pinzas hemostáticas [147, 10, 136]. La mayor contribución de los PHA a la medicina ha sido en el área cardiovascular. *Tepha* se especializa en la fabricación de parches pericárdicos, aumentos de arterias, stents cardiológicos, injertos vasculares, válvulas cardíacas, implantes y tabletas, suturas, apósitos, polvos, profármacos y transportadores de micropartículas que utilizan PHA [136].

2.4.2. Aplicaciones industriales. Los plásticos que se utilizan actualmente para la fabricación de empaques y cubrimientos se pueden reemplazar por completo o parcialmente por

PHA. La extensa cantidad de propiedades físicas de la familia de estos polímeros junto con las propiedades extendidas que se consiguen al modificar estos mismos químicamente [148] o en mezclas [149] de varios polímeros proporcionan una amplia gama de posibles aplicaciones de uso final. Gracias a su propiedad de biodegradación, sus aplicaciones en pañales o implementes de higiene personal ya se han descrito [9]. Los PHA se han procesado en tóner para aplicaciones de impresión y adhesivos para revestimiento [150]. Recientemente, textiles de alta calidad provenientes de PHBV han sido exitosamente fabricados [6]. Adicionalmente, el látex de PHA se ha usado como protectores de papel y cartón, con el fin de hacerlos resistentes al agua, en contraste de la combinación de cartón y aluminio que se usan actualmente y no es biodegradable. La parte económica es un atributo importante para esta aplicación ya que pequeñas cantidades de PHA son necesarias para este propósito [151]. Por otro lado, una de las características más curiosas del PHA es que presenta características piezoeléctrico por naturaleza, esto permite la fabricación de artículos como sensores de presión para teclados, instrumentos de medición de estiramiento y aceleración, pruebas de materiales, sensores de ondas de choque, encendedores, encendedores de gas, micrófono, detectores ultrasónicos, instrumentos de medición de presión sonora, auriculares, altavoces para terapia ultrasónica y atomización de líquidos [136].

Adicionalmente, el PHA se puede utilizar como biocombustibles mediante la técnica de esterificación con metilo, los 3-hidroxicanoatos (3HA; mcl PHA) están unidos por enlaces éster formados con el grupo hidroxilo ($-OH$) de un monómero y el grupo carboxilo ($-COOH$) del otro monómero a través de la catálisis por varias PHA sintasas [152]. Se ha descubierto que estos ésteres de

hidroxialcanoato (ésteres de 3HA) son similares a los ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga en biodiésel. Es por esto que pueden ser usados como aditivos; la esterificación de scl-PHA y mcl-PHA con metanol da ésteres metílicos de hidroxibutirato (3HBME) y ésteres metílicos de hidroxialcanoato (3HAME). Estos ésteres actúan como el etanol, lo que los hace adecuados para su uso como aditivos en gasolina y biodiésel [153]. Por consiguiente, la producción de bioaceites de alta calidad a partir de un biopoliéster renovable sobre ácido fosfórico sólido en una simple reacción one-pot, es más económico en comparación con el tratamiento catalítico térmico convencional bajo influencia del hidrógeno. Además, debido a que las materias primas de PHB son de baja pureza, pueden usarse para la producción de biocombustibles con poca o ninguna purificación o tratamiento [154].

2.4.3. Aplicaciones en la agricultura. Los nanocompuestos de PHA se utilizan como mantillo en las tierras de cultivo para evitar el crecimiento de hierbas no deseadas y suprimir la evaporación del suelo ya que actúan como una capa protectora para preservar los ingredientes vitales del suelo. Esto no solo reduce el costo de mano de obra, sino que también ayuda en el proceso de reciclaje ecológico [155]. Los PHA actúan como inoculantes bacterianos para mejorar la fijación de nitrógeno en el reino vegetal usando cepas como *Azospirillum*. Algunos estudios evidenciaron que el crecimiento de la planta es muy consistente (independientemente de los portadores) que tienen PHA intracelular con la cepa *Azospirillum brasilense* [156]. Entre otras aplicaciones se han reportado que PHA de ultraalto peso molecular se puede emplear para fabricar fibras que se emplean en redes para pesca e hilo para pescar [6]. Ahora bien, una de las aplicaciones es-

pecializadas del P(3HB-*co*-3HV) en la agricultura es la liberación controlada de insecticidas, los cuales podrían integrarse en gránulos de P(3HB-*co*-3HV) y sembrarse junto con los cultivos del agricultor. El insecticida se liberaría a una velocidad relacionada con el nivel de actividad de la plaga, ya que las bacterias que descomponen el polímero se verían afectadas por las mismas condiciones ambientales que las plagas del suelo [136, 157]. Otro uso de los PHA en la agricultura es en los inoculantes bacterianos que se utilizan para mejorar la fijación de nitrógeno en las plantas. El cultivo bacteriano empleado en las preparaciones de inoculantes con fines agrícolas debe resistir entornos estresantes. Las células bacterianas deben almacenarse durante largos períodos y soportar la desecación y las condiciones de calor. Estos inoculantes deben tener la capacidad de mantener altas tasas de supervivencia dentro del portador. Por lo tanto, la investigación en esta área se ha centrado en la adición de elementos como nutrientes u otros productos sintéticos que pueden aumentar la calidad de los portadores, lo que conduce a una supervivencia prolongada [158].

3. Metodología

En la siguiente metodología se buscó aplicar un protocolo apropiado para el aislamiento y caracterización de bacterias PHA positivas y sus respectivos biopolímeros sintetizados.

3.1. Etapa 1: Aislamiento e identificación de bacterias productoras de PHA en muestras de suelos.

3.1.1. Muestreo. Se basó en la metodología reportada por Ramírez (2013) para la recolección de las muestras [159]. Los factores que se tuvieron en cuenta para establecer los lugares fueron: suelo húmedo, preferiblemente cerca a árboles de gran tamaño y de característica no arcillosa. Posterior a esta selección, se realizaron tres agujeros de aproximadamente 20 cm de profundidad en sentido horizontal (en el caso de este estudio siempre fue alrededor de árboles grandes) de tal forma que se creará un triángulo. De cada agujero se tomó alrededor de 500 gramos de muestra, los cuales se almacenaron en bolsas con cierre hermético para ser transportadas completamente selladas y permitiendo tener una cámara de aire dentro de ellas, a temperatura de 10 °C aproximadamente. Para finalizar, en el centro del triángulo se tomaron las coordenadas del punto de adquisición anotando la latitud y longitud empleando google maps como medidor.

3.1.2. Preparación de las muestras y aislamiento presuntivo de posibles bacterias productoras de PHA. Este protocolo fue basado en los trabajos realizados por Ramírez (2013) & Jove (2022) [159, 160]. En un recipiente se mezclaron las tres muestras colectadas por

cada sitio de muestreo y se procedió a homogeneizar para posterior análisis. Pasado este proceso, la muestra fue pasada por un tamiz con poro de 1 mm para retirar piedras, ramas, entre otros objetos. De esta última, se pesó 30 gramos a los cuales se les adicionó 270 ml de una solución de peptona al 5 % esteril, en un Erlenmeyer de 500 ml. Esta suspensión fue agitada manualmente durante 10 minutos para permitir homogeneización. Esta solución se etiquetó como la solución A. De esta se tomó 1 ml el cual fue transferido a un tubo Falcon que contenían 9 ml agua peptonada al 5 %. Luego, se agitó en el vórtex y se etiquetó como la dilución B. Este proceso de dilución se repitió tres veces más, cada una con 1 ml de la suspensión anterior y 9 ml de agua peptonada. Al final se etiquetan las tres soluciones restantes como C, D y E. Esto da como resultado diluciones en serie desde 10^{-1} a 10^{-5} .

Para cultivar las colonias bacterianas, se preparó medio de cultivo Mac Conkey (MC) y medio de cultivo King's B (KB), suplementados con Nistatina a un 5 % (v/v), para impedir el crecimiento de hongos en los medios. Estas fueron etiquetadas para realizar siembra de la dilución 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} por triplicado. Posteriormente, se realizó siembra de la muestra por la técnica en superficie de 100 μ l. Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a una temperatura de 29.5 °C con monitoreo constante. En el *Anexo 1* se describe la preparación de cada medio de cultivo utilizado en el estudio.

3.1.3. Pruebas preliminares para los cultivos bacterianos. Se realizó un aislamiento en medios de cultivo que favorecieran el crecimiento de bacilos Gram negativos; para ello se usó el medio Mac Conkey, en este agar crecen todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, en donde se encuentran los géneros de interés para la producción de polihidroxicanoatos.

Una vez se desarrolla el crecimiento son seleccionadas como se ha establecido por la fundamentación: microorganismos fermentadores de lactosa: colonias de consistencia viscosa, color rosado a rojizo y con precipitación, y microorganismos no fermentadores de lactosa: colonias del color del medio (naranja), e incoloras [161]. De igual manera se uso el medio de cultivo King B que favorece la producción de fluoresceína (o pioverdina), un pigmento amarillo-verdoso que es fluorescente bajo lámpara de luz ultravioleta en algunas cepas de *Pseudomona* (ver Figura 4). De este agar se seleccionaron las colonias transparentes viscosas que presentaron la producción de pigmentos [162]. Estos aislados fueron repicados a cajas Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) para su mantenimiento y caracterización donde se incubaron durante 48 - 72 horas dependiendo del crecimiento de cada colonia a 29,5 °C.

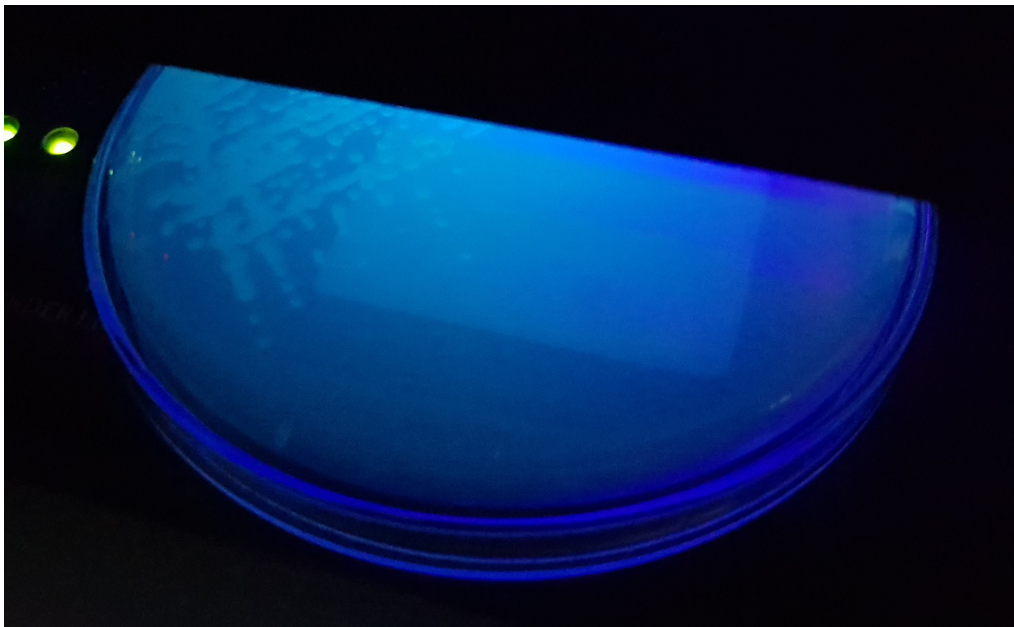


Figura 4
Ejemplo colonia bacteriana fluorescente. Fuente: autor.

3.1.3.1. Prueba de Gram. Este protocolo fue basado a partir de Mejía (2010) [163].

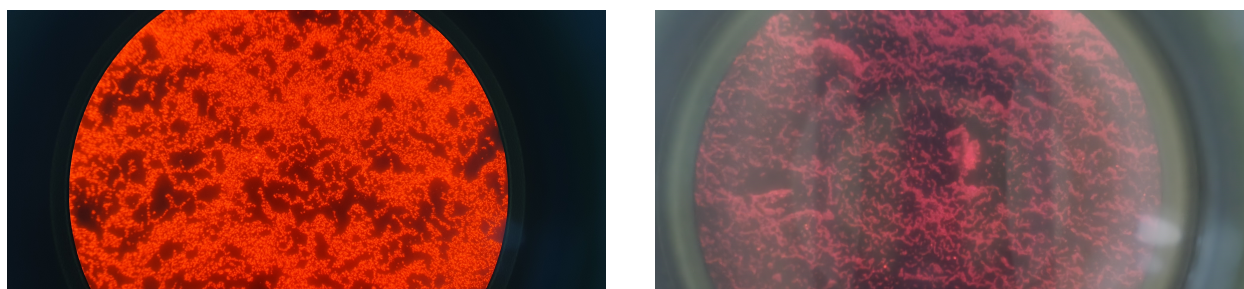
Utilizando un mechero de alcohol, se flameó el asa bacteriológica por 5 segundos para esterilizarla; posteriormente, se adiciono una gota de agua tipo I sobre el portaobjetos y con el asa ya esterilizada se toma un poco de muestra bacteriana desde el cultivo sólido y lo se mezclo con la gota de agua tipo I dispuesta anteriormente en el portaobjetos. Para secar el portaobjetos y fijar la muestra con calor.

Ya con las muestras fijadas se procedió a agregar cristal violeta con un gotero hasta cubrir el frotis y se dejó actuar durante 1 min. Se lavó el colorante con agua, luego, se agregó lugol en cantidad suficiente y se dejó actuar por 1 minuto. Se realizo un lavado con agua y se agrega alcohol acetona (80%) durante 15 s, la cual se lavó nuevamente con suficiente agua para eliminar el exceso de solvente. Por último, se agregó safranina con un gotero hasta cubrir el frotis y dejar actuar durante 60 s. Se dejó secar la preparación a temperatura ambiente luego de ser finalmente lavada con agua tipo I hasta que no presentará más colorante encima. Se observaron las muestras al microscopio (marca Optika Microscopes B-350) con el objetivo 100X.

3.1.3.2. Prueba de catalasa. Este protocolo fue basado a partir de Jove (2022) [164]. En un portaobjetos se adicionó una gota de una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, seguidamente con un palillo se tomó un poco de la colonia a estudiar para luego mezclarla con la solución y observar si se presento algún tipo de burbujeo proveniente de la colonia. La presencia de burbujeo indica prueba positiva para catalasa [164].

3.1.3.3. Prueba de oxidasa. Esta prueba se realizó empleando tiras reactivas para detección de la enzima citocromo-oxidasa, *BactidentTM Oxidase test strips* de la marca *Sigma-Aldrich* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomo el asa de inoculación y se esterilizó para tomar una colonia aislada del medio de cultivo. Esta colonia fue aplicada sobre la zona reactiva. Al cabo de aproximadamente 20 a 60 segundos se comparó la escala de colorimétrica para determinar si el aislado bacteriano es positivo o negativo para oxidasa.

3.1.4. Verificación de la presencia de PHA intracelular empleando el colorante Azul Nilo. La metodología se basó en A G Ostle et al. (1982) [165]. Inicialmente, se realizó una solución al 1% de Azul Nilo (marca Merck) en agua desionizada, la cual fue sumergida en baño de agua a 55 °C. Así mismo, se procedió a la fijación de las colonias a estudiar en portaobjetos; luego de tener las muestras listas, se sumergieron en la solución de Azul Nilo durante 10 min. Posteriormente, los cubreobjetos fueron lavados con agua para retirar el exceso de colorante y sumergidos en una solución de ácido acético al 8% durante 1 minuto. Las muestras se dejaron secar para su posterior análisis bajo el microscopio de fluorescencia en un rango de excitación de 520 a 550 nm y un rango de emisión de 590 a 630 nm. Como se muestra en la Figura 5a, una colonia bacteriana PHA positiva genera fluorescencia de color naranja, mientras que, las colonias no productoras no exhiben fluorescencia (Figura 5b).



(a) Colonia PHA positiva

(b) Colonia PHA negativa

Figura 5

Observación del microscopio procedentes de muestras de suelo (40X) para la interpretación de emisión fluorescente en colonias bacterianas PHA positivas (a) y para colonias PHA negativas (b). Aunque ambas colonias presentan algún tipo emisión fluorescente. Para la figura a se observa una emisión más intensa de color naranja, ya que el azul Nilo es un colorante específico para lípidos ácidos, es por esto que se une a los fosfolípidos presentes en la mono-capa del granulo de PHA intracelular. Fuente: autor.

3.2. Etapa 2: Caracterización del PHA producido por las bacterias PHA positivas.

3.2.1. Determinación de la biomasa. Para el estudio de la masa seca se transfirió un pequeño inóculo desde el medio LB sólido a un medio de activación líquido (5 ml) agregado a un vial de vidrio de 10 ml con tapa hermética previamente esterilizado. Este vial de reacción se dejó incubar por 24 horas a 29,5 °C y 150 rpm [166]. Posterior a este tiempo, se cuantificó la concentración del inóculo a agregar al medio de fermentación empleando la escala de McFarland. Esta escala fue realizada comparando la turbidez de las diferentes disoluciones en la Tabla 14 presente en el anexo 4 a 600 nm creando una curva patrón [167]. Pasadas las 24 horas se procedió a tomar 200 μ l del medio de cultivo de activación (blanco) en una placa de 96 pozos de fondo plano y 200 μ l de las colonias a estudiar. Esta placa de fondo plano se pasó por el espectrofotómetro leído a 600 nm donde la absorbancia obtenida por las colonias bacterianas activas se les restó el valor

dado por el medio de cultivo de activación limpio (blanco) para así obtener su absorbancia absoluta. Posteriormente, se prepararon las diluciones respectivas con agua desionizada previamente esterilizada hasta obtener una concentración similar al estándar McFarland de 1, el cual posee una concentración celular de $3 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ [167]; estas diluciones se prepararon en tubos Eppendorf de 1,5 ml con la finalidad de que la solución tenga un volumen final de 1 ml. Este volumen se adiciona a 100 ml de medio de cultivo mínimo en sales (MSM) líquido (Medio fermentador) en un Erlenmeyer de 250 ml; se dejó incubar durante 72 horas a $29,5 \text{ }^\circ\text{C}$ y 155 rpm en una incubadora Thermo Scientific SHKE4450 [168].

Pasadas las 72 horas de incubación se procedió a determinar la masa seca de cada colonia aislada estudiada. Para este fin, el medio de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavó con agua desionizada previamente esterilizada (este proceso se repitió dos veces más). Luego de tener el pellet limpio, fue transferido a un tubo Falcón de 15 ml el cual se aforó con agua desionizada hasta llegar a un volumen final de 5 ml. De este volumen se tomó 1 ml el cual se agregó sobre una caja Petri de 30 mm previamente pesada y secada; esta caja se dejó secar por 24 horas en un horno a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Pasado este tiempo, la muestra se retiró del horno y se colocó en desecador hasta temperatura ambiente. La diferencia de peso corresponde a 1/5 de la masa seca real, al haber diluido con un volumen final de 5 ml.

3.2.2. Acumulación de PHA en medio de cultivo mínimo en sales (MSM) líquido.

La acumulación de PHA se realizó basándose en la metodología de Ana Lorena et al. (2013) [166] con medio MSM con las mismas variables con las que se desarrolló la fermentación para

la determinación de masa seca (sección 3.2.1). Al final de la fermentación, el medio de cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm; el líquido fue desechado y el pellet fue resuspendido con agua para ser nuevamente centrifugado bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió 2 veces; al finalizar, todo el pellet fue transferido a un tubo Falcon de 15 ml, el cual se almacenó en la nevera de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la posterior extracción del biopolímero.

3.2.3. Extracción del biopolímero intracelular. La metodología fue basada de Guilherme A. et al. (2020) [169]. A mínimo 500 mg de muestra fresca húmeda se le adicionó carbonato de dimetilo (DMC) en una proporción de 1 ml por cada 0,05 g de muestra en un balón de fondo redondo de 100 ml previamente pesado. Este balón es introducido en un montaje de reflujo usando aceite mineral previamente calentado a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (punto de ebullición del DMC), dejando reaccionar durante 1 h. Luego de dejar enfriar el balón hasta temperatura ambiente, el solvente fue separado de contaminantes y masa residual usando un embudo buchner y una bomba de vacío. Posteriormente, se transfirió el solvente (con el biopolímero disuelto) a otro balón de fondo redondo de 100 ml, el cual fue conectado a un roto-evaporador (HEIDOLPH HEI VAP) configurado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 50 mbar para permitir así la evaporación del mismo y observar el polímero en forma de cristales sobre la pared del recipiente. Una vez evaporado el solvente, el residuo (biopolímero) se resuspendió en cloroformo (grado analítico) y se transfirió a un vial de vidrio previamente pesado.

3.2.4. Derivatización del PHA extraído para análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases (GC/MS). La metodología fue basada de Guilherme A. et al. (2020) & Pravesh et al. (2019) [169, 170]. A 4 mg de muestra agregando 1 ml de cloroformo

(99%), 0,95 ml de metanol (96%) y 0,05 ml de ácido sulfúrico (95%). Todos estos reactivos junto a la muestra fueron adicionados a un tubo de ensayo con tapa rosca, el cual se introdujo a un baño de aceite mineral precalentado a 100 °C y se dejó reaccionar durante 2,5 horas. Posteriormente, se dejó enfriar el tubo hasta temperatura ambiente y se le adicionó 1 ml de una solución de NaCl 1 M. El tubo se agitó vigorosamente durante 10 min en shaker para posteriormente dejar separar las fases; la fase acuosa fue descartada, y el proceso se repitió al menos 4 veces más. Luego de solo tener la fase orgánica en el recipiente, se procedió a evaporar el solvente a temperatura ambiente en un vaso de precipitado de 50,0 ml. La muestra fue resuspendida en 1 ml de cloroformo (grado analítico), la cual se filtró con un filtro PTFE de 0,45 $\mu\text{l} \times 13 \text{ mm}$ y se transfirió a un vial (1,5 ml) de cromatografía para posterior análisis por GC/MS.

3.2.5. Caracterización del biopolímero mediante GC/MS. El protocolo fue basado de La metodología fue basada de Guilherme A. et al. (2020) [169]. Inicialmente, se realizó una curva de calibración usando como estándar primario el metil-(R)-3-hidroxi-butarato sintetizado a partir del ácido 3-hidroxi-butírico (Merck) empleando cloroformo como disolvente. El cromatógrafo de gases utilizado fue un 7890B de la marca *Agilent Technologies* con una columna capilar HP-5MS (30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm) y un espectrómetro de masas 5977B de la misma marca; flujo de 2 mL min^{-1} de helio, inyección de muestra de 1 μl , y un split de (1:10) con una temperatura inicial de 35 °C y con un gradiente de temperatura de 10 °C/min hasta llegar a 250°C en el inyector y detector. Se utilizó el software *Masshunter Qualitative Analysis* (versión B.07.00)x para la identificación química de los monómeros presentes en las colonias a través de su espectro

de masas. Para la curva de calibración Se emplearon 6 puntos con concentraciones de 80 a 4800 μM .

3.2.6. Caracterización del biopolímero mediante resonancia magnética nuclear

(RMN). El protocolo fue basado de Iza Radecka et al (2016) [171]. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en solución se midieron en un Bruker de 400,00 MHz en $CDCl_3$ como disolvente. Los espectros de RMN de 1H se recogieron a 299,95 MHz con un pulso $\pi/2$ de 7,0 μs para los núcleos de 1H y un período de adquisición de 3,74 s en un ancho de espectro de 4,5 kHz con un número de scans de 8. Los espectros de RMN de ^{13}C se recogieron a 75,43 MHz con un pulso $\pi/2$ de 6,5 μs para los núcleos de ^{13}C y un período de adquisición de 1,82 s en un ancho de espectro de 16,5 kHz con un retraso de reciclaje de 1,19 s en un número de scans de 1024. También se realizó la toma de espectros bidimensionales COSY, HMBC y HSQC.

3.2.7. Caracterización del biopolímero mediante análisis termogravimétrico (TGA).

El protocolo fue basado de Guilherme A. et al. (2020) [169]. Se colocó una masa de alrededor de 10 mg en el crisol de equipo y se fijó un modo de rampa de 10 °C por minuto hasta 500 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

3.3. Etapa 3: Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos que presentaron la mayor acumulación de PHA.

Las cepas bacterianas aisladas gram negativas y oxidasa negativas, se identificaron con el Sistema RapIDTM ONE (RemelTM) siguiendo las instrucciones de fabricante; el cuál es un micrométodo

cuantitativo que utiliza sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de microorganismos, siguiendo el manual proporcionado por el fabricante (Thermo Scientific) [172].

3.3.1. Conservación de microorganismo PHA positivos. Los microorganismos fueron activados usando medio de cultivo LB; se agregaron 10,0 ml de este medio a un tubo de ensayo con tapa para ser incubados por al menos ocho horas a 30,0 °C; una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 0,7 ml del cultivo y se adicionaron a un criovial de dos ml, el cual contenía 0,3 ml de una solución de glicerol al 10,0% (agente criogénico). Luego, se agitaron por 15 segundos en un shaker para ser almacenados a -80,0 °C [166].

4. Resultados y análisis

4.1. Etapa 1: Aislamiento e identificación de bacterias productoras de PHA en muestras de suelos

En este proyecto de investigación se tomaron 3 muestras de diferentes lugares; la primera muestra (Figura 6a) con coordenadas de longitud: 7.1151924, latitud: -73.1045032 (4V8W+35 Bucaramanga, Santander) se logró aislar 10 colonias, la segunda (Figura 6b) con coordenadas de longitud: 6.8619438, latitud: -73.0436556 (VX64+Q6H Piedecuesta, Santander) se logró aislar seis colonias aisladas y por último la tercera (Figura 6c) con coordenadas de longitud: 7.1316086, latitud: -73.0571388 (4WJV+J4 Chimita, Bucaramanga, Santander) se logró aislar siete colonias aisladas analizadas.

Las pruebas preliminares descritas en la sección 3.1.3 se realizaron para los 27 aislados bacterianos. De estas bacterias analizadas, el 88,9% (24) de las bacterias fueron Gram negativas, el 37,0% (10) positivas para la prueba de oxidasa, el 51,8% (14) positivas para la prueba de catalasa. Con respecto a la morfología microscópica se evidenció que el 55,55% (15) presentaron morfología de *Bacilos* y 44,44% (12) de morfología *cocos*. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los 11 aislados bacterianos que presentaron prueba positiva de PHA intracelularmente bajo observación en el microscopio de fluorescencia, siguiendo los parámetros de la sección 3.1.4. En la Figura 7 se observa el resultado de la colonia C01, para las imágenes respectivas de las demás colonias PHA



(a) Lugar recolección muestra 1.



(b) Lugar recolección muestra 2.



(c) Lugar recolección muestra 3.

Figura 6

Lugares de recolección de las muestras analizadas en el presente proyecto de investigación.

positivas se encuentran en el Anexo 2.

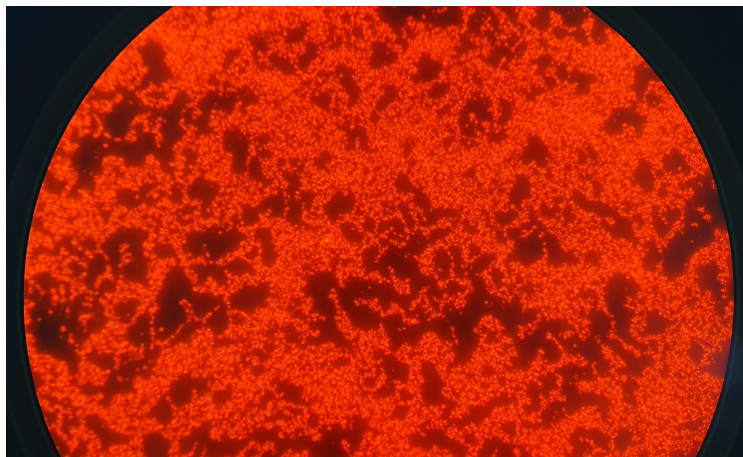


Figura 7

Resultado colonia C01 bajo el microscopio de fluorescencia empleando Azul Nilo como colorante (aumento 40X).

Aislado	Pruebas preliminares				Observaciones macroscópicas								
	Gram	Oxidasa	Catalasa	Fluorescencia	Masa seca (mg)	Morfología	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Consistencia	Color	Luz
A01	-	+	+	-	86,7 ± 15,9	Bacilos	Irregular	Erosionado	Elevada	Rugosa	Membranosa	Beige	Transparente
A02	-	+	+	-	218,3 ± 1,7	Bacilos	Irregular	Ondulado	Elevada	Lisa	Cremosa	Verdosa	Opaca
A03	-	+	+	-	138,3 ± 4,4	Bacilo	Irregular	Erosionado	Plana	Lisa	Cremosa	Beige	Opaca
A04	-	+	+	-	155,0 ± 1,0	Bacilo	Irregular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Membranosa	Beige	Translúcida
A05	-	-	+	-	113,4 ± 4,4	Bacilo	Irregular	Entero	Convexa	Lisa	Cremosa	Beige	Translúcida
A06	-	+	+	-	128,3 ± 1,7	Bacilo	Circular	Entero	Convexa	Rugosa	Cremosa	Beige	Transparente
A07	-	+	+	-	186,7 ± 9,3	Bacilo	Circular	Ondulado	Plana	Rugosa	Cremosa	Beige	Translúcida
A08	+	-	+	-	90,0 ± 5,0	Cocos	Filamentosos	Filamentosa	Plana	Rugosa	Membranosa	Blanca	Translúcida
CB01	-	-	+	-	105,0 ± 7,6	Cocos	Fusiforme	Entero	Plana	Rugosa	Cremosa	Beige	Translúcida
CC01	-	-	+	-	92,0 ± 20,3	Cocos	Entero	Ondulado	Plana	Rugosa	Cremosa	Beige	Opaca
CC02	-	-	+	-	141,7 ± 13,0	Bacilos	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Cremosa	Beige	Opaca

Tabla 7

Resultados pruebas preliminares y observaciones morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas PHA positivas.

Los resultados obtenidos en la Figura 7 Luego de caracterizar macroscópicamente las bacterias positivas para PHA (de manera cualitativa), se realizaron las fermentaciones para la acumulación de biopolímero y la extracción del mismo siguiendo los parámetros establecidos en las secciones 3.2.2 y 3.2.3. Los resultados de las extracciones se presentan en Tabla 8. El 36,36% (4) de las colonias PHA positivas lograron acumular un porcentaje de polímero mayor al 30%; colonias como la C01 y la C02 lograron una acumulación mayor al 59%. Es posible conjeturar que las colonias PHA positivas de la muestra C sintetizan una mayor cantidad de biopolímero por el lugar de colecta (longitud: 6.8619438, latitud: -73.0436556 (VX64+Q6H Piedecuesta, Santander)), para la muestra B01 fue tomada en un monocultivo de café en un ambiente con poca humedad ambiental. Pero para las colonias de la muestra C que fueron tomadas en un ambiente frío, húmedo, cercano a un árbol grande, evidenciando ser un ambiente promisorio para aislar bacterias productoras de PHA.

Estudios anteriores demostraron que bacterias gram negativas, catalasa positivas y oxidasa positivas como la *Pseudomonas aeruginosa*, la *Alcaligenes latus* y la *Cupriavidus necator* son bacterias PHA positivas las cuales se presentan en diferentes ambientes naturales [23], es por esto que, al realizar las pruebas preliminares a los 27 aislados bacterianos puede hacer un perfilamiento de los posibles aislados PHA positivos antes de ser analizados bajo el microscopio de fluorescencia. Pero esto no quiere decir que otras bacterias gram positivas, o negativas para una o dos de las pruebas preliminares también puedan producir PHA intracelular, solo que según estudios, la producción de PHA en bacterias gram positivas en comparación con gram negativas será menor [173]. Luego de

Aislado	Acumulación PHA (mg)				(%) acumulación PHA ¹
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Resultado ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	
A01	4,0	15,0	×	86,7 ± 15,9	11,0%
A02	10,0	4,0	×	7,0 ± 3,0	3,2%
A03	4,0	20,0	×	12,0 ± 8,0	8,7%
A04	16,0	18,0	×	17,0 ± 1,0	11,0%
A05	7,0	61,0	×	34,0 ± 27,0	30,0%
A06	15,0	18,0	×	16,5 ± 1,5	12,9%
A07	13,0	11,0	×	12,0 ± 1,0	13,3%
A08	9,0	3,0	×	6,0 ± 3,0	3,2%
B01	20,0	58,0	20,0	39,0 ± 19,0	31,0%
C01	82,0	61,0	70,0	71,5 ± 10,5	77,2%
C02	223,0	33,0	122,0	128,0 ± 95,0	86,1%

¹ El porcentaje de acumulación de PHA se encuentra en función de la biomasa seca.

Tabla 8

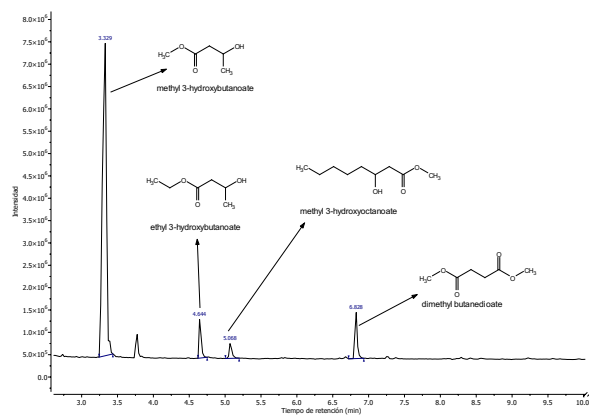
Resultados acumulación de PHA para cada colonia PHA positiva.

analizar los aislados PHA positivos y obtener resultados para las extracciones es posible comprar los datos suministrados por otros estudios como por ejemplo Otero-Ramírez [159] el cual obtuvo polímero recuperado entre 0,01 g/l a 0,88 g/l desde bacterias provenientes de nuestras de suelo del departamento de Nariño. Para nuestros aislados se logró recuperar 0,02 g/l para la bacteria con menor acumulación y 0,31 g/l para las bacterias de mejor producción. Teniendo en cuenta que el método de fermentación implementado (lote) no fue el más óptimo o la fuente de carbono primaria era una de las más generales (glucosa), pues es posible conjeturar que en posteriores estudios donde se analice la cinética de crecimiento y acumulación de PHA para los aislados C01 y C02 se obtengan mejores resultados que los presentados anteriormente.

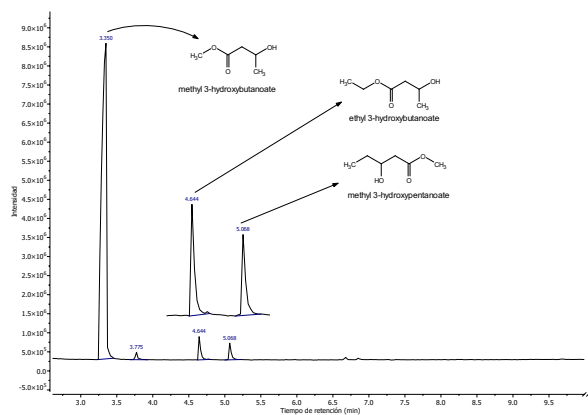
4.2. Etapa 2: Caracterización del PHA producido por las bacterias PHA positivas.

Posterior a la extracción, se procedió a analizar los polímeros por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), como se indicó en las secciones 3.2.4 y 3.2.5. Los perfiles cromatográficos de los PHA extraídos para los aislados A01-A08 se encuentran en el anexo 5. Sustancias como el metil 4-oxopentanoico (ácido levulínico, en su forma no metilada) presente en el ciclo de Krebs y en la glucólisis [174]; Otro posible compuesto presente en estos cromatogramas es el dimetil butanodioato (ácido succínico, en su forma no metilada) el cual tiene aplicaciones industriales como solvente, en perfumes, tintes y químicos para fotografía [175]. El dimetil pentanedioato (ácido glutárico) es producido por los microorganismos durante el metabolismo de algunos aminoácidos, como la lisina y el triptófano. Sin embargo, tiene excelentes aplicaciones en la producción de polímeros de poliéster como el polioliol y las poliamidas [176]. Por último aparecen las formas metiladas de PHA de cadena media como el metil 3-hidroxi octanoato y el metil 3-hidroxipentanoato los cuales no poseen buenas propiedades fisicoquímicas impidiendo su uso en la industria [2]. Los perfiles cromatográficos para los aislados con mayor producción de PHA intracelular (B01, C01 y C02) se encuentran en la Figura 8 junto con los espectros de masas del aislado C02 (Figura 9) para las señales con tiempo de retención $t_R = 3,35$ y $t_R = 3,51$ min que ayudan a dilucidar la presencia de monómeros de interés como son el metil 3-hidroxi butirato (3HB) y metil 3-hidroxi valerato (3HV) respectivamente [1]. En los tres casos la señal presentada por el 3HB presenta la mayor intensidad; planteando como una posible hipótesis la presencia mayoritaria de 3HB en los biopolímeros extraídos. Las muestras de poliésteres extraídos fueron analizadas por

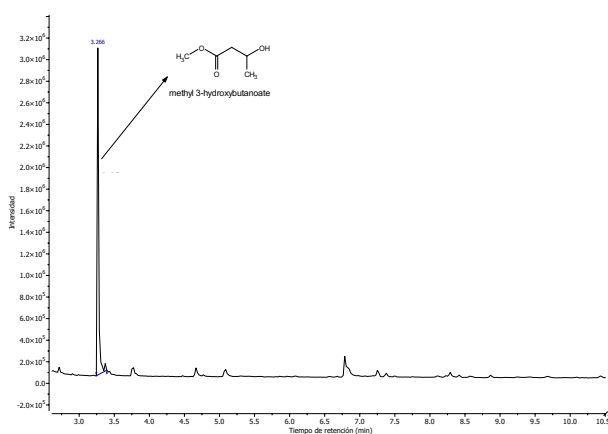
resonancia magnética nuclear para confirmar la conjetura planteada.



(a) Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de C01.



(b) Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de C02.

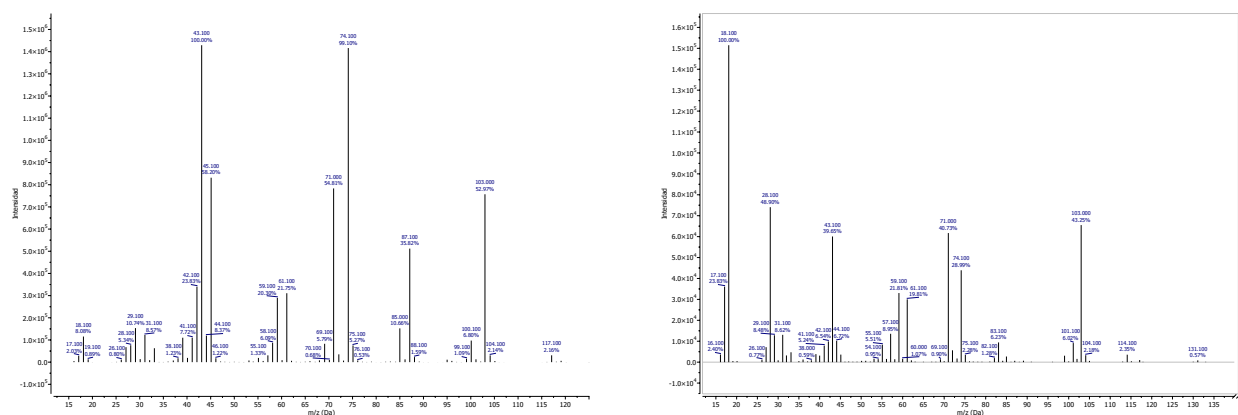


(c) Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de B01.

Figura 8

Perfiles cromatográficos de los aislados bacterianos con mayor producción de biopolímero.

Se empleó una curva de calibración para la cuantificación (μM) de los monómeros de 3HB presentes en cada muestra. Con un $R^2 = 0,9954$ y una ecuación de la recta de $y = 906,91x - 156356$. En la Tabla 10 se muestran los resultados para la concentración en minimolar (nM) para cada biopolímero extraído de cada aislado bacteriano. Analizando los datos presentes en esta tabla observamos

(a) *Espectro de masas metil 3-hidroxitirato.*(b) *Espectro de masas metil 3-hidroxiualerato.***Figura 9**

Espectros de masas del aislado C02 para distinguir la presencia de monómeros de interés (3HB y 3HV).

que no toda la cantidad de PHA extraído es igual 3HB, es por esto que se puede asumir que otros tipos de monómeros son sintetizados por las bacterias. A pesar de ello, de aquí en adelante el estudio se enfocará en confirmar la presencia mayoritaria de 3HB para los aislados bacterianos con mayor producción de PHA.

Para los aislados B01, C01 y C02 se realizó un estudio por resonancia magnética nuclear (RMN) con el fin de confirmar la presencia mayoritaria de ácido 3-hidroxitirato en los polímeros extraídos a partir de estos aislados bacterianos. Inicialmente, para el análisis del espectro de protones (1H) (Figura 10) acoplado de los tres aislados bacterianos comenzaremos de derecha a izquierda con la señal en 1,28 ppm representante para el acoplamiento de los hidrógenos $-CH_3$ del carbono cuatro con el hidrógeno del carbono tres la cual se presenta como un doblete. Continuando, tendremos la señal en 2,57 ppm la cual interpreta el acoplamiento de los hidrógenos del grupo $-CH_2$

Concentración (μM)	Area picos generados			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Resultados ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)
80	64249,71	99889,84	100827,33	88322,29 \pm 14745,11
160	40123,55	39909,88	39133,09	39722,17 \pm 368,56
240	12456,8	85558,24	123751,27	73922,10 \pm 39988,53
640	298104,44	296054,78	301380,09	298513,10 \pm 1899,34
960	802743,65	828550,60	407869,18	679721,14 \pm 166724,50
1600	1102949,45	1163515,88	1145945,06	1137470,13 \pm 22033,40
3200	2948607,92	2842351,79	2543235,90	2778065,20 \pm 148629,06
4800	4668504,96	4545467,29	3524498,42	4246156,89 \pm 444059,56

Tabla 9

Datos usados para la creación de la curva de calibración para el metil-3-hidroxitirato.

Aislado	Calculo concentración de 3HB				3HB presente en cada extracto				
	Replica 1	Replica 2	Resultado ($\langle x \rangle \pm \Delta x$)	[3HB] (uM)	[3HB](mM)	Rep 1 (mg)	Rep 2(mg)	Promedio	3HB (mg) presente muestra
A01	$5,44 \times 10^6$	$1,82 \times 10^6$	$10,50 \times 10^6 \pm 13,34 \times 10^6$	11605,15	11,61	10,00	4,00	7,00	2,40
A03	$2,46 \times 10^6$	$7,41 \times 10^6$	$4,94 \times 10^6 \pm 3,50 \times 10^6$	5463,89	5,46	4,00	6,66	5,33	0,86
A04	$2,96 \times 10^5$	$1,66 \times 10^6$	$9,77 \times 10^5 \pm 9,63 \times 10^5$	1094,34	1,09	16,00	9,00	12,50	0,40
A05	$3,28 \times 10^6$	$2,87 \times 10^7$	$1,45 \times 10^7 \pm 2,01 \times 10^7$	16041,12	16,04	7,00	15,00	11,00	5,21
A06	$3,24 \times 10^6$	$1,23 \times 10^7$	$7,71 \times 10^6 \pm 6,33 \times 10^6$	8523,25	8,52	15,00	9,00	12,00	3,02
A07	$1,17 \times 10^6$	$3,62 \times 10^6$	$2,40 \times 10^6 \pm 1,73 \times 10^6$	2660,52	2,66	9,00	3,00	6,00	0,47
A08	$2,15 \times 10^7$	$1,57 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7 \pm 4,09 \times 10^6$	20577,62	20,58	13,00	11,00	12,00	7,28
B01	$2,76 \times 10^6$	$1,63 \times 10^7$	$9,55 \times 10^6 \pm 9,59 \times 10^6$	10542,96	10,54	6,66	4,00	5,33	1,66
C01	$2,14 \times 10^7$	$1,46 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7 \pm 4,78 \times 10^6$	19915,31	19,92	16,00	10,00	13,00	7,64
C02	$3,85 \times 10^7$	$2,08 \times 10^7$	$2,97 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^7$	32763,60	32,76	16,00	8,00	12,00	11,60

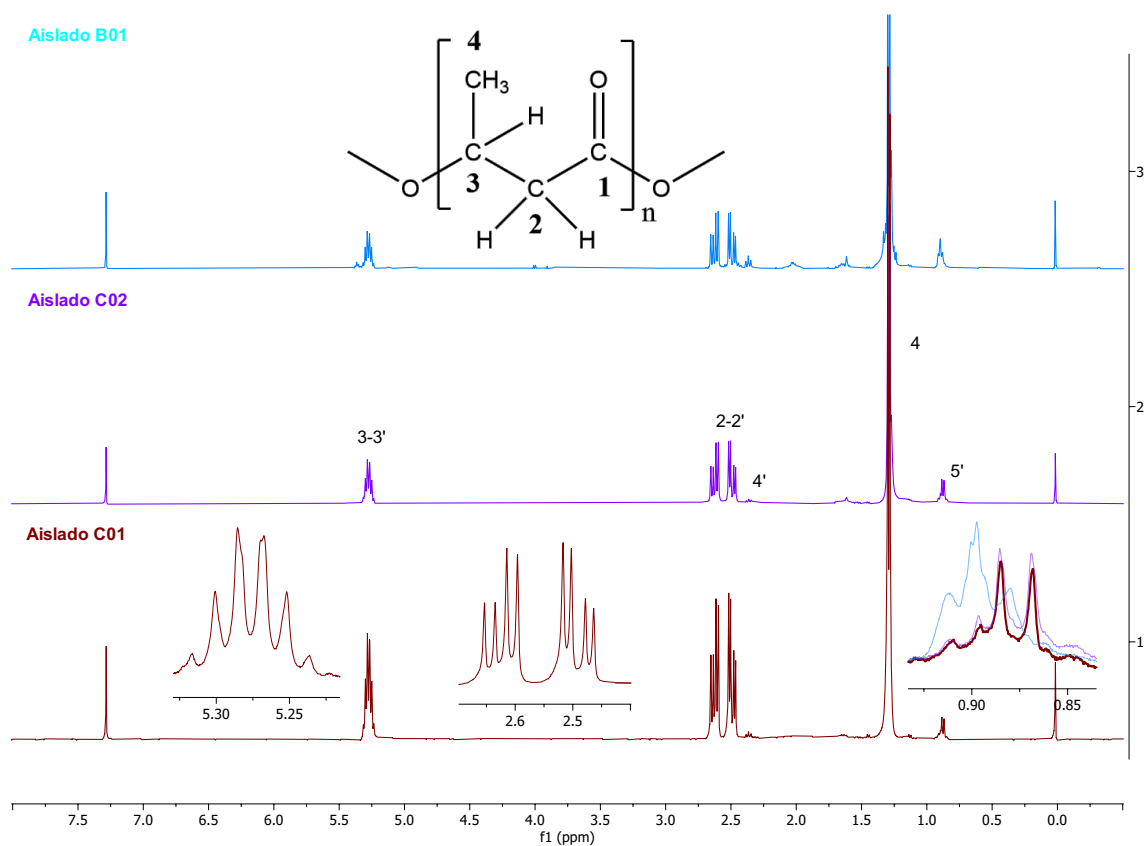
Tabla 10

Miligramos de 3-hidroxitirato (3HB) presente en los extractos de biopolímero para cada bacteria PHA positiva.

con el hidrógeno del carbono tres; esta señal se presenta como un multiplete porque los hidrógenos (no geminales) del carbono 2 se acoplan con el hidrógeno del carbono tres generando un doblete, luego, este par de hidrógenos al no ser geminales interaccionan entre sí y con el hidrógeno del carbono tres generando las cuatro señales que vemos en el espectro, dos para un hidrógeno y dos para el otro hidrógeno. Esta información se confirmó posteriormente con el análisis de sus con-

tantes de acoplamiento. Por último, para la señal en 5,28 ppm será el acoplamiento del hidrógeno del carbono tres con los hidrógenos presentes en el carbono cuatro y en el carbono dos, es por esto que la señal se presenta como un multiplete de 6 picos (recordando la regla de $n+1$). En el espectro de protones también se presentan señales de baja intensidad en 0,89 ppm y en 2,30 ppm las cuales hacen referencia a los acoplamientos de los hidrógenos presente en el grupo $-CH_3$ de cadenas laterales más larga de otros monómeros presentes en menor proporción en la muestra; y de grupos $-CH_2$ presentes en estos otros tipos de monómeros respectivamente. Para el espectro de carbonos (^{13}C) acoplado (Figura 11). La primera señal ubicada en 19,77 ppm será característica para el carbono cuatro del monómero de ácido 3-hidroxi-butírico, representante del grupo $-CH_3$. Para la señal en 40,79 ppm representa al carbono dos del grupo ($-CH_2$), la señal en 67,63 ppm para el carbono tres ($-CH$) y por último, la señal de 169,19 ppm será la del carbono uno ($-C=O$) la cual está ubicada en esta zona debido a la pérdida de su densidad electrónica por la presencia del oxígeno unido a doble enlace con él. Estos datos fueron corroborados con otros reportados como por ejemplo Sushobhan et al. [2] o Shahid et al [177] donde se analizan diferentes espectros de protones para los polímeros producidos por diferentes bacterias.

Analizando los espectros de protones y carbono nos permite llegar a la conclusión de que el ácido 3-hidroxi-butírico es el monómero con mayor proporción para estos tres aislados bacterianos. Sin embargo, para estar 100 % seguros a los polímeros extraídos se les realizó también estudios por RMN en dos dimensiones. Iniciando con el espectro compilado de la espectroscopia de correlación (COSY, por sus siglas en inglés), presente en la Figura 13, el cual muestra los acoplamientos entre

**Figura 10**

Espectro de protones ^1H – RMN compilados de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02.

hidrógenos vecinos. La primera señal que observaremos con coordenadas en ((1,28), (5,27)) ppm estará presente en los tres espectros y señala el acoplamiento de los hidrógenos del carbono cuatro ($-\text{CH}_3$) y el hidrógeno del carbono tres ($-\text{CH}$), este punto está correlacionado con el punto de coordenadas ((5,27), (1,28)) ppm. Ahora, el punto de coordenadas ((2,57), (5,27)) ppm mostrará el acoplamiento entre el hidrógeno del carbono tres ($-\text{CH}$) con los hidrógenos del grupo ($-\text{CH}_2$) del carbono dos. Ya que no se presentan más hidrógenos vecinos presentes en el monómero, solo se observarán estos dos tipos de señales. Siguiendo con el análisis de la espectroscopia de correlación

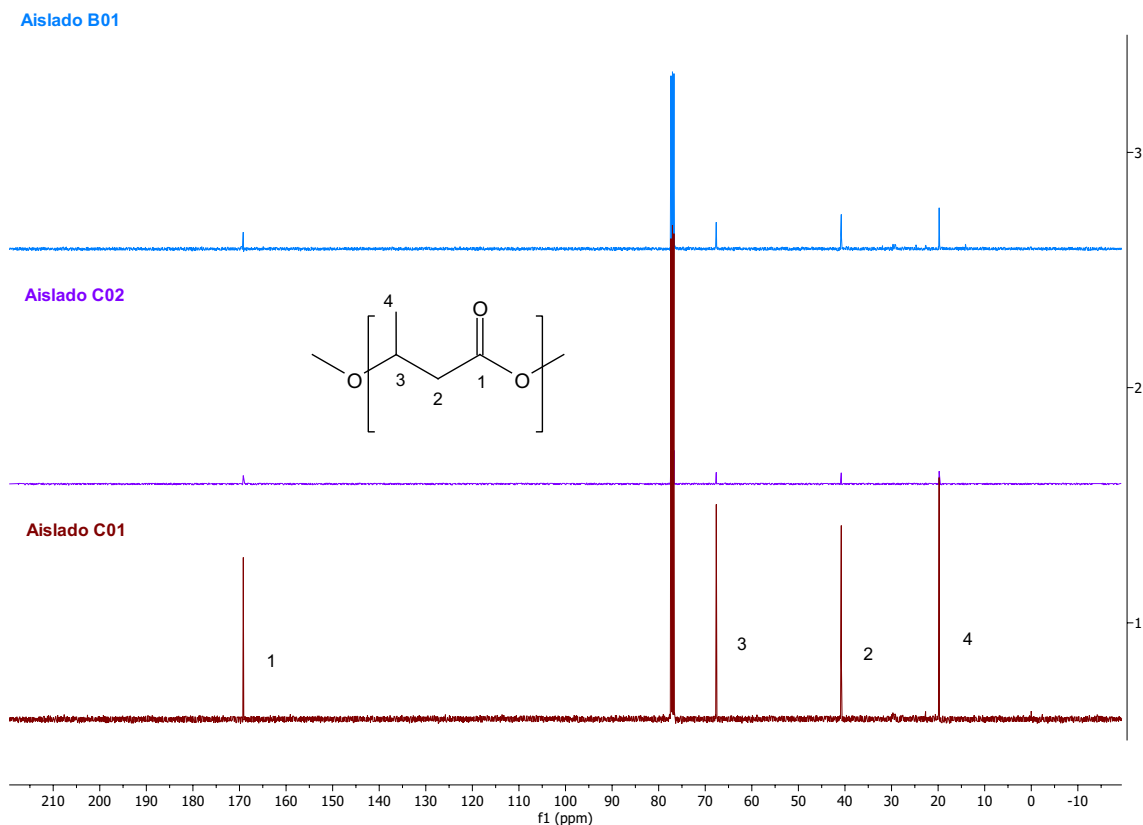


Figura 11

Espectro de carbonos ^{13}C – RMN compilados de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02.

heteronuclear de un único cuanto (HSQC, por sus siglas en inglés), el cual muestra la interacción de cada carbono presente en la molécula con los hidrógenos unidos a ese carbono específico (Figura 12) [178]. Iniciando con la señal con coordenadas ((1,28), (19,78)) ppm perteneciente al grupo ($-\text{CH}_3$) del carbono cuatro. Para la señal ((2,55), (40,79)) ppm corresponderá al grupo ($-\text{CH}_2$) del carbono dos, esta señal está dividida en dos pequeñas señales debido a que los hidrógenos no son geminales como explicamos anteriormente, y por último, la señal ((5,28), (67,63)) ppm característico del grupo ($-\text{CH}$) del carbono tres. El carbono uno no presenta señal en este tipo de

espectros porque no tiene hidrógenos unidos a él.

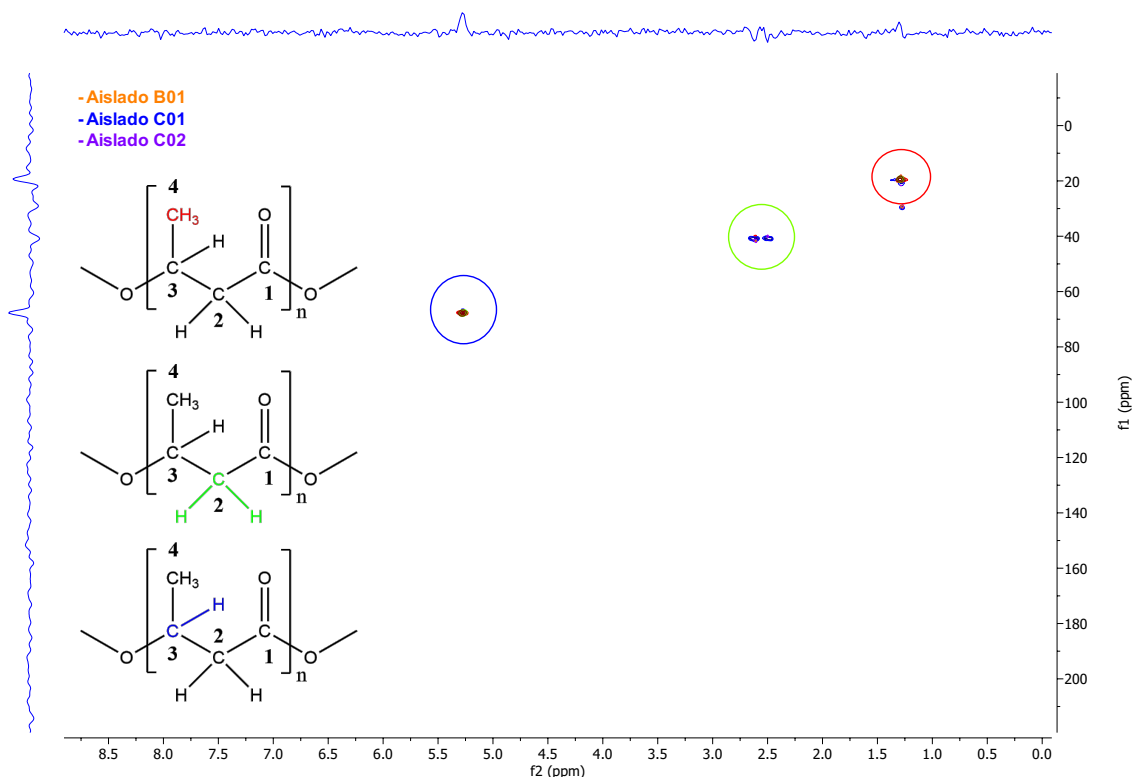


Figura 12

Espectro HSQC compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02.

Para finalizar esta sección, en la Figura 14 está la conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC, por sus siglas en inglés) [178]. Iniciaremos el análisis interpretando las señales características que presentan los tres polímeros; la señal con coordenadas ((1, 29), (40, 79)) indica la interacción entre el carbono 2 y los hidrógenos del carbono 4 ($-CH_3$). La señal ((1, 27), (67, 63)) indica la interacción entre el carbono 3 y los hidrógenos del carbono 4 ($-CH_3$). Siguiendo con la señal ((2, 55), (67, 63)) será la interacción entre el carbono 3 y los hidrógenos presentes en el carbono 2.

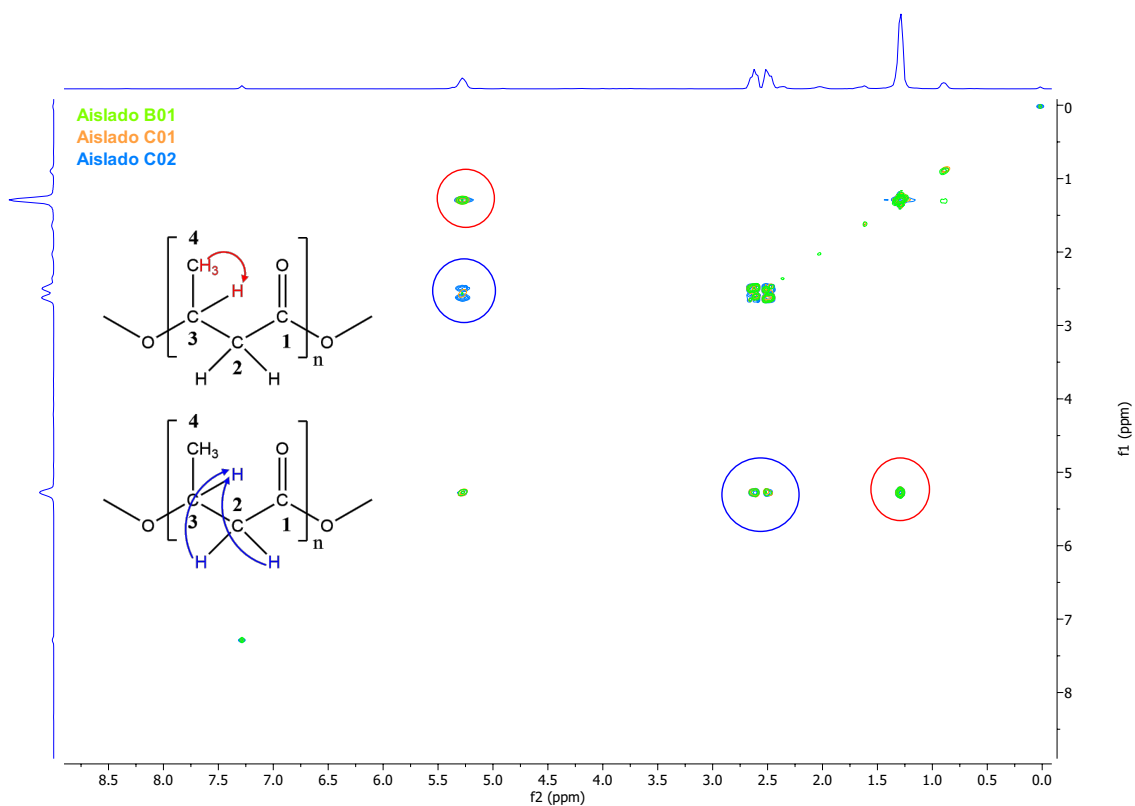


Figura 13

Espectro COSY compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02.

Por último, para las señales conjuntas, tenemos la señal con coordenadas ((2,55), (169,10)) ppm la cual será la interacción entre el carbono 1 y los hidrógenos de carbono 2 como con el hidrógeno del carbono 3. La señal con coordenadas ((1,29), (19,73)) ppm corresponderá a la interacción mutua entre los hidrógenos del carbono 4. La señal ((2,55), (19,78)) corresponde a la interacción del par de hidrógenos del carbono 2 con los hidrógenos del carbono 4. La señal ((2,55), (40,79)) ppm será la interacción mutua de los hidrógenos presentes en el carbono 2. Para finalizar con el análisis de este espectro en 2 dimensiones tendremos la señales con coordenadas ((5,55), (19,73)),

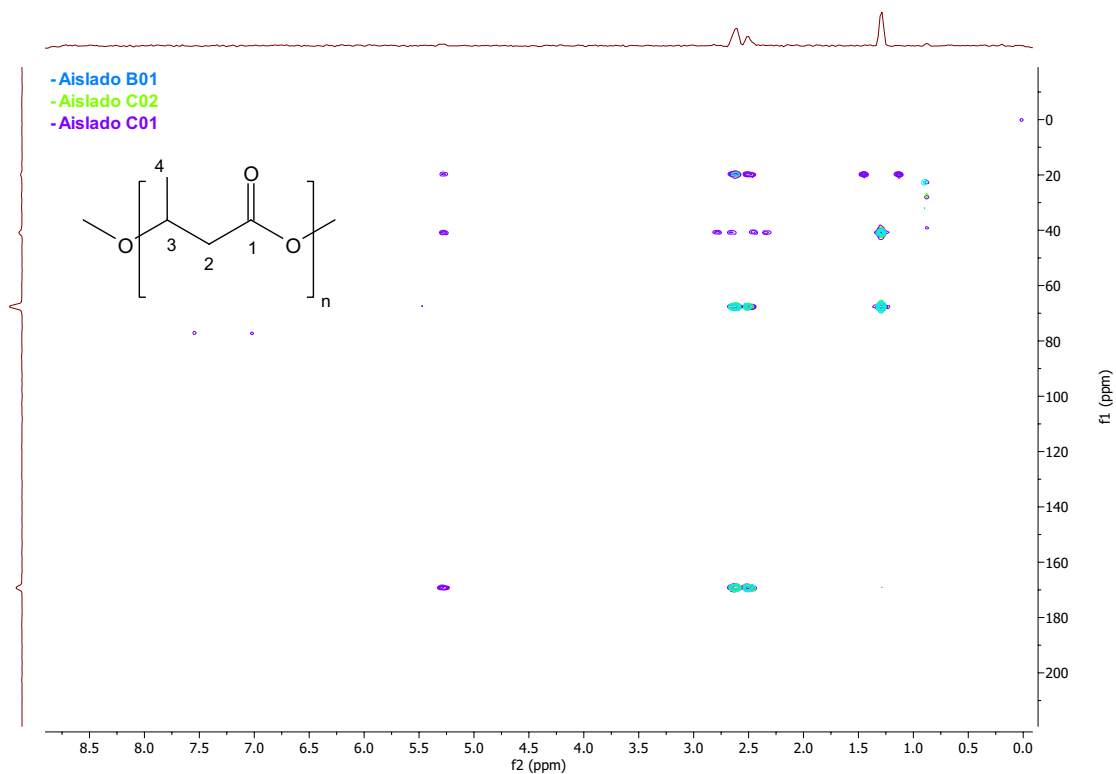


Figura 14

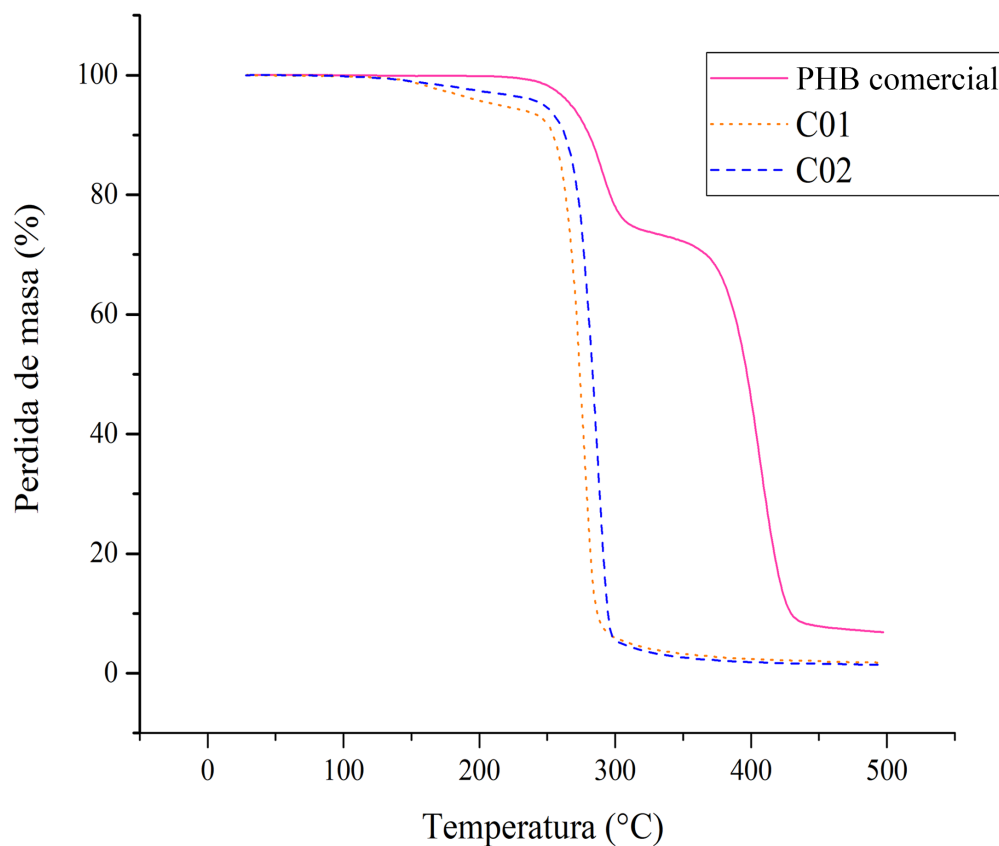
Espectro HMBC compilado de los polímeros sintetizados por los aislados B01, C01 y C02.

$((5,55), (40,79)), ((5,55), (169,10))$ ppm las cuales serán las interacciones entre el hidrógeno del carbono 3 con el carbono 4, carbono 2 y el carbono 1 respectivamente. Luego de analizar los espectros de RMN uni- y bidimensionales, y con la ayuda de los cromatogramas, todo indica la presencia principalmente en los polímeros extraídos de los aislados bacterianos monómeros de 3HB en mayor abundancia en comparación a otros monómeros presentes.

Para finalizar la sección de resultados, se analizaron los polímeros producidos por los aislados C01 y C02 mediante termogravimetría (TGA). En la Figura 15 observamos los resultados obtenidos

en este análisis cuando es comprado con un PHB comercial. Algo curioso es la forma en como el PHB comercial presenta su pérdida de masa en función de la temperatura; la gráfica presenta claramente dos decaimientos significativos en su porcentaje de masa, dando a entender y como específica Rebocho et al. [179] en su investigación la presencia de dos tipos de monómeros diferentes presentes en la muestra. Para los aislados C01 y C02 se exhibe un solo decaimiento en la masa, dando a suponer la presencia mayoritaria un monómero en la cadena polimérica como se especificó anteriormente. Para términos de comparación se investigaron datos experimentales de algunas muestras de PHA sintetizados junto con el análisis de otros PHB comerciales (Tabla 11). Para el aislado C01 se obtuvieron valores menores de (T_i) y (T_{max}) en comparación con el polímero de PHB puro, dando como resultado que las otras sustancias presentes en el PHA extraído diferente a 3HB modificaron sus valores de pérdida de masa. Para el aislado C02, se obtuvo una conjetura parecida a lo que se ve en su cromatograma (Figura 8); y es que la presencia de los dos monómeros de 3HB-3HV en una proporción (80:20) mol% produce resultados de (T_i) y (T_{max}) semejantes a los obtenidos por el aislado C02. Lo anterior mostrado no es posible confirmarlo a un 100% con los datos suministrados. Sin embargo, se demuestra nuevamente la presencia mayoritaria para el ácido 3-hidroxibutírico presente en el PHA extraído del aislado bacteriano C02 y la presencia del monómero de ácido 3-hidroxivalérico en menor proporción.

Es de mucha relevancia en la presente investigación la cantidad de polímero producido por los aislados C01 y C02. Como dije anteriormente, el modo de fermentación (lote), la fuente de carbono primaria general (glucosa) y no conocer la cinética de crecimiento y acumulación de PHA de estas

**Figura 15**

Resultados análisis termogravimétrico de los aislados C01 y C02 en comparación a un PHB comercial a nuestra disposición.

bacterias no nos permite lograr el mayor potencial de producción de biopolímero. Sin embargo, si se realizan estudios posteriores donde se varíe la fuente de carbono primaria, siguiendo como ejemplo la Tabla 2 para visualizar posibles opciones y estudiar la cinética de crecimiento en biorreactores ya estructurado con un modo de fermentación establecido para estas bacterias, es más que probable que la producción de PHA intracelular presente en estos aislados mejore significativamente.

Tipo de polímero	Composición del PHA (mol %)	(T_i) Pérdida peso 5 % (°C)	(T_{max}) Pérdida peso 95 % (°C)
Aislado C01	ND	214,27	311,27
Aislado C02	ND	248,08	305,082
PHB comercial	ND	268,22	497,22
PHB [2]	3HB (100)	226,0-235,0	285,0-305,0
PHB (sigma) [180]	ND	234,0	302,0
PHB comercial [181]	3HB-3HV (90:10)	269,66	286,77
P(3-HB-co-3-HV) [2]	3HB-3HV (80:20)	247,0-253,0	289,0-308,0
P(3-HB-co-3-HV) [181]	3HB-3HV (43:57)	264,04	288,32
P(3HB-3HV-3HHx) [2]	HB-HV-HH (5,4:9,9:86,7)	273,0	ND

Tabla 11

Resultados análisis termogravimétrico para los biopolímeros obtenidos en los aislados C01 y C02 junto con datos experimentales encontrados en la literatura.

4.3. Etapa 3: Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos que presentaron la mayor acumulación de PHA

Para finalizar el análisis de resultados, siguiendo la metodología establecida en la sección 3.3 los aislados con mayor producción de PHA y mayor concentración de monómero 3HB C01 y C02 se identificaron como *Acinetobacter calcoaceticus* y *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*. La caracterización de estas bacterias arrojó un porcentaje de similitud de 99,9%, sin embargo, es necesaria la identificación genética (RNA 16S) para corroborar al 100% la veracidad de estos resultados. Las pruebas preliminares de los aislados PHA positivos (ver Tabla 7) nos confirman la identificación de estas bacterias ya que para ambos casos son bacterias Gram negativas, oxidasa

negativas y catalasa positivo [182, 183]. Actualmente no se han publicado estudio en la síntesis o acumulación de PHA en este tipo de bacterias, posiblemente por sus características patógenas hacia los seres humanos [184, 185]; es por esto que si se desea continuar con estudios posteriores será necesario establecer su naturaleza patogénica en humanos y/o animales, sin embargo ya han sido encontradas en suelo, incluso evaluadas en degradación de PHA [186].

5. Conclusión

La implementación de medios de cultivo selectivos como el MC y KB suplementados con nistatina, junto con la implementación de pruebas preliminares (gram, catalasa, oxidasa) permitieron el perfilamiento de bacterias posiblemente PHA positivas en el estudio. Usando azul Nilo como colorante logramos determinar que de 27 colonias bacterianas aisladas, 11 (40,7%) fueron PHA positivas.

De once aislados bacterianos PHA positivos, los aislados B01, C01 y C02 presentaron la mayor acumulación de PHA intracelular con valores de 31,1%, 77,2%, 86,1% respectivamente en función de su masa seca y análisis por GC/MS, RMN y TGA permitieron la confirmación de la presencia del ácido 3-hidroxibutírico como el principal monómero presente de los polihidroxialcanoatos extraídos.

Los aislados C01 y C02 se identificaron como *Acinetobacter calcoaceticus* y *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* respectivamente.

Referencias Bibliográficas

- [1] Giin-Yu Tan, Chia-Lung Chen, Ling Li, Liya Ge, Lin Wang, Indah Razaad, Yanhong Li, Lei Zhao, Yu Mo, and Jing-Yuan Wang. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. 6(3):706–754. 6, 9, 18, 19, 26, 35, 37, 38, 42, 57, 79
- [2] Sushobhan Pradhan, Pritam Kumar Dikshit, and Vijayanand S. Moholkar. Production, Characterization, and Applications of Biodegradable Polymer: Polyhydroxyalkanoates. In Vimal Katiyar, Amit Kumar, and Neha Mulchandani, editors, *Advances in Sustainable Polymers*, Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials, pages 51–94. Springer Singapore. 6, 16, 23, 24, 25, 29, 34, 38, 40, 79, 83, 91
- [3] Yolanda GONZÁLEZ García, Juan Carlos MEZA Contreras, and Orfil GONZÁLEZ Reynoso. SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS: PLÁSTICOS DE ORIGEN MICROBIANO. page 39. 9, 20, 21, 37
- [4] Shilpi Khanna and Ashok K. Srivastava. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. 40(2):607–619. 9, 18, 36
- [5] Pema Lhamo, Shishir Kumar Behera, and Biswanath Mahanty. Process optimization, metabolic engineering interventions and commercialization of microbial polyhydroxyalkanoates production – A state-of-the art review. 16(9):2100136. 9, 49, 50

- [6] Ying Wang, Jin Yin, and Guo-Qiang Chen. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. 30:59–65. 9, 51, 60, 61
- [7] Joana Soares, Isabel Miguel, Cátia Venâncio, Isabel Lopes, and Miguel Oliveira. Public views on plastic pollution: Knowledge, perceived impacts, and pro-environmental behaviours. 412:125227, 2021. 15, 22, 35
- [8] D. Jendrossek, A. Schirmer, and H. G. Schlegel. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. 46(5-6):451–463, 1996. 15
- [9] R.A.J. Verlinden, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams, and I. Radecka. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. 102(6):1437–1449, 2007. 15, 21, 22, 23, 57, 60
- [10] Salma Shahid, Sadia Razzaq, Robina Farooq, and Zill-i-Huma Nazli. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world’s future economy. 166:297–321, 2021. 15, 22, 37, 41, 42, 57, 59
- [11] João Medeiros Garcia Alcântara, Francesco Distanto, Giuseppe Storti, Davide Moscatelli, Massimo Morbidelli, and Mattia Sponchioni. Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. 42:107582, 2020. 15, 20, 40
- [12] So Young Choi, Mi Na Rhie, Hee Taek Kim, Jeong Chan Joo, In Jin Cho, Jina Son, Seo Young Jo, Yu Jung Sohn, Kei-Anne Baritugo, Jiwon Pyo, Youngjoon Lee, Sang Yup Lee, and Si Jae Park. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year

- journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. 58:47–81, 2020. 15
- [13] Faizan Muneer, Ijaz Rasul, Farrukh Azeem, Muhammad Hussnain Siddique, Muhammad Zubair, and Habibullah Nadeem. Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. 28(9):2301–2323, 2020. 15
- [14] Jieun Kim, Yeo-Jin Kim, So Young Choi, Sang Yup Lee, and Kyung-Jin Kim. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. 12(1):1600648, 2017. 15
- [15] Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated by *Ps. citronellolis*. *Reactive and Functional Polymers*, 73(10):1391–1398, October 2013. Publisher: Elsevier. 18, 19, 48
- [16] Aderemi T. Adeleye, Chuks Kenneth Odoh, Obieze Christian Enudi, Oluwakemi Oluwabunmi Banjoko, Osigbeminiyi Oludare Osiboye, Emmanuel Toluwalope Odediran, and Hitler Louis. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. 96:174–193. 18
- [17] Jingnan Lu, Ryan C. Tappel, and Christopher T. Nomura. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3):226–248, August 2009. 18
- [18] Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1):15–27, April 2008. Publisher: Elsevier. 18

- [19] Novel Description of mcl-PHA Biosynthesis by *Pseudomonas chlororaphis* from Animal-Derived Waste. *Journal of Biotechnology*, 165(1):45–51, May 2013. Publisher: Elsevier. 18
- [20] Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferrax mediterranei*. *New Biotechnology*, 33(1):224–230, January 2016. Publisher: Elsevier. 18, 19
- [21] K Sudesh, H Abe, and Y Doi. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10):1503–1555, December 2000. 20
- [22] Muhammadi, Shabina, Muhammad Afzal, and Shafqat Hameed. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. 8(3-4):56–77. 20
- [23] Julieth Yadira Serrano Riaño. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos.: Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y praxis investigativa*, 5(2):79–84, 2010. Publisher: Fundación Universitaria del Área Andina Section: Teoría y praxis investigativa. 19, 77
- [24] Dan Kai and Xian Jun Loh. Polyhydroxyalkanoates: Chemical modifications toward biomedical applications. 2(2):106–119. 20
- [25] Alexander Steinbüchel and Tina Lütke-Eversloh. Metabolic engineering and pathway cons-

- truction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. 16(2):81–96. 20, 39
- [26] Rosa Turco, Gabriella Santagata, Iolanda Corrado, Cinzia Pezzella, and Martino Di Serio. In vivo and Post-synthesis Strategies to Enhance the Properties of PHB-Based Materials: A Review. 8:619266. 22
- [27] Alistair J Anderson and Edwin A Dawes. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. 54:23. 23
- [28] Martin Koller, Aid Atlić, Miguel Dias, Angelika Reiterer, and Gerhart Braunegg. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In George Guo-Qiang Chen, editor, *Plastics from Bacteria*, volume 14 of *Microbiology Monographs*, pages 85–119. Springer Berlin Heidelberg. 23
- [29] D. Fernández, E. Rodríguez, M. Bassas, M. Viñas, A.M. Solanas, J. Llorens, A.M. Marqués, and A. Manresa. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2-3):159–167, 2005-11. 24, 35
- [30] Zazali Alias and Irene K.P. Tan. Isolation of palm oil-utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 96(11):1229–1234, 2005-07. 24
- [31] Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium meliloti*, R-viciae

- and *Bradyrhizobium* [jack//avesis.gazi.edu.tr/yayin/8e7976b4-0698-46db-bbea-961d5de7f70b/production-of-poly-beta-hydroxybutyrate-phb-by-rhizobium-meliloti-r-viciae-and-bradyrhizobium-japonicum-with-different-carbon-and-nitrogen-sources-and-inexpensive-substrates](http://avesis.gazi.edu.tr/yayin/8e7976b4-0698-46db-bbea-961d5de7f70b/production-of-poly-beta-hydroxybutyrate-phb-by-rhizobium-meliloti-r-viciae-and-bradyrhizobium-japonicum-with-different-carbon-and-nitrogen-sources-and-inexpensive-substrates). 24
- [32] Everest Akaraonye, Tajalli Keshavarz, and Ipsita Roy. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. 85(6):732–743. 24
- [33] A. Devi, Valli Nachiyar, T. Kaviyarasi, and Antony Samrot. Characterization of polyhydroxybutyrate synthesized by *Bacillus Cereus*. 7:140–144. 24
- [34] Yuanyuan Wang, Fengjie Zhao, Xu Fan, Shufang Wang, and Cunjiang Song. Enhancement of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesis from glucose by metabolic engineering in *Pseudomonas mendocina*. 38(2):313–320. 25
- [35] Wennan He, Weidong Tian, Guang Zhang, Guo-Qiang Chen, and Zengming Zhang. Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. 169(1):45–49. 25
- [36] Development of a New Strategy for Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates by Recombinant *Escherichia coli* via Inexpensive Non-Fatty Acid Feedstocks. 25
- [37] Oscar Rojas-Rosas, Juan Villafaña-Rojas, Fernando A. López-Dellamary, Jesús Nungaray-Arellano, and Orfil González-Reynoso. Production and characterization of polyhydroxyal-

- kanoates in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 from glucose, an unrelated carbon source. 53(7):840–851. 25
- [38] Beom Soo Kim, Seung Chul Lee, Sang Yup Lee, Ho Nam Chang, Yong Keun Chang, and Seong Ihl Woo. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. 43(9):892–898. 25
- [39] Effects of Aeration on the Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Glycerol and Glucose in Recombinant *Escherichia coli*. 25
- [40] J. G. C. Gomez, M. F. A. Rodrigues, R. C. P. Alli, B. B. Torres, C. L. Bueno Netto, M. S. Oliveira, and L. F. da Silva. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. 45(6):785–791. 25
- [41] Hisashi Arikawa, Keiji Matsumoto, and Tetsuya Fujiki. Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring *csc* genes from *Escherichia coli* W. 101(20):7497–7507. 26
- [42] Tsuneo Yamane, Masaaki Fukunaga, and Yong Woo Lee. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. 50(2):197–202. 26
- [43] Elimination of d-Lactate Synthesis Increases Poly(3-Hydroxybutyrate) and Ethanol Synthesis from Glycerol and Affects Cofactor Distribution in Recombinant *Escherichia coli*. 26

- [44] João M.B.T. Cavalheiro, M. Catarina M.D. de Almeida, Christian Grandfils, and M.M.R. da Fonseca. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. 44(5):509–515. 26
- [45] Shunsuke Sato, Hiroyuki Maruyama, Tetsuya Fujiki, and Keiji Matsumoto. Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a co-substrate. 120(3):246–251. 26
- [46] Chengjun Zhu, Christopher T. Nomura, Joseph A. Perrotta, Arthur J. Stipanovic, and James P. Nakas. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. 26(2):424–430, 2010 Mar-Apr. 26
- [47] Prakash M. Halami. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. 24(6):805–812. 27
- [48] Beom Soo Kim. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. 27(10):774–777. 27
- [49] J. Quillaguamán, S. Hashim, F. Bento, B. Mattiasson, and R. Hatti-Kaul. Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. 99(1):151–157. 27
- [50] Ting-Yen Huang, Kow-Jen Duan, Shih-Yow Huang, and C. Will Chen. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. 33(8):701–706. 27, 29

- [51] C. Will Chen, Trong-Ming Don, and Hsiao-Feng Yen. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. 41(11):2289–2296. 27
- [52] André Freches and Paulo C. Lemos. Microbial selection strategies for polyhydroxyalkanoates production from crude glycerol: Effect of OLR and cycle length. 39:22–28. 27
- [53] Richard Haas, Bo Jin, and Florian Tobias Zepf. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. 72(1):253–256. 27
- [54] Fabrício Coutinho de Paula, Sérgio Kakazu, Carolina Bilia Chimello de Paula, José Gregório Cabrera Gomez, and Jonas Contiero. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. 29(2):166–173. 27
- [55] R. Moita, A. Freches, and P.C. Lemos. Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. 58:9–20. 28
- [56] André Freches and Paulo C. Lemos. Microbial selection strategies for polyhydroxyalkanoates production from crude glycerol: Effect of OLR and cycle length. 39:22–28. 28
- [57] M. Ben, T. Mato, A. Lopez, M. Vila, C. Kennes, and M. C. Veiga. Bioplastic production using wood mill effluents as feedstock. 63(6):1196–1202. 28
- [58] Giulia De Grazia, Luca Quadri, Mauro Majone, Fernando Morgan-Sagastume, and Alan Werker. Influence of temperature on mixed microbial culture polyhydroxyalkanoate production while treating a starch industry wastewater. 5(5):5067–5075. 28

- [59] Mohd Rafein Zakaria, Meisam Tabatabaei, Farinazleen Mohamad Ghazali, Suraini Abd-Aziz, Yoshihito Shirai, and Mohd Ali Hassan. Polyhydroxyalkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain *Comamonas* sp. EB172. 26(5):767–774. 28
- [60] M. Beccari, L. Bertin, D. Dionisi, F. Fava, S. Lampis, M. Majone, F. Valentino, G. Vallini, and M. Villano. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process: Bioproduction of PHA from olive mill effluents. 84(6):901–908. 28
- [61] Lorena M. Tobella, Marta Bunster, Amalia Pooley, José Becerra, Felix Godoy, and Miguel A. Martínez. Biosynthesis of poly-beta-hydroxyalkanoates by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Wautersia* sp. PZK cultured in cellulose pulp mill effluents containing 2,4,6-trichlorophenol. 32(9):397–401. 29
- [62] Simon Bengtsson, Alan Werker, and Thomas Welander. Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. 58(2):323–330. 29
- [63] D. Van-Thuoc, J. Quillaguamán, G. Mamo, and B. Mattiasson. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. 104(2):420–428. 29
- [64] V. Saranya and R. Shenbagarathai. Production and characterization of PHA from recombi-

- nant *E. coli* harbouring *phaC1* gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5 using molasses. 42(3):1109–1118. 29
- [65] M. Beaulieu, Y. Beaulieu, J. Melinard, S. Pandian, and J. Goulet. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. 61(1):165–169. 30
- [66] F. C. Oliveira, D. M. G. Freire, and L. R. Castilho. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. 26(24):1851–1855. 30
- [67] Abhishek Dutt Tripathi, Ajay Yadav, Alok Jha, and S. K. Srivastava. Utilizing of Sugar Refinery Waste (Cane Molasses) for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process. 20(2):446–453. 30
- [68] J.-Y. Chee, N.-S. Lau, M.-R. Samian, T. Tsuge, and K. Sudesh. Expression of *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from palm oil products. 112(1):45–54. 30
- [69] Nyok-Sean Lau and Kumar Sudesh. Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. 2(1):41. 30
- [70] Kesaven Bhubalan, Wing-Hin Lee, Ching-Yee Loo, Tetsuya Yamamoto, Takeharu Tsuge, Yoshiharu Doi, and Kumar Sudesh. Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. 93(1):17–23. 30

- [71] Recycling of Waste Streams of the Biotechnological Poly(hydroxyalkanoate) Production by *Haloferax mediterranei* on Whey. 31
- [72] Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei* - ScienceDirect. 31
- [73] Anastasia A. Pantazaki, Christos P. Papanephytous, Agathi G. Pritsa, Maria Liakopoulou-Kyriakides, and Dimitrios A. Kyriakidis. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. 44(8):847–853. 31
- [74] Martin Koller, Paula Hesse, Rodolfo Bona, Christoph Kutschera, Aid Atlić, and Gerhart Braunegg. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. 7(2):218–226. 31
- [75] Silvana Povolo, Paolo Toffano, Marina Basaglia, and Sergio Casella. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. 101(20):7902–7907. 31
- [76] Ikuo Taniguchi, Kumi Kagotani, and Yoshiharu Kimura. Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils. 5(5):545–548. 31
- [77] Stanislav Obruca, Sinisa Petrik, Pavla Benesova, Zdenek Svoboda, Libor Eremka, and Ivana Marova. Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. 98(13):5883–5890. 31, 32

- [78] Waqas Nasir Chaudhry, Nazia Jamil, Iftikhar Ali, Mian Hashim Ayaz, and Shahida Hasnain. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. 61(3):623–629. 32
- [79] T. Fukui and Y. Doi. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. 49(3):333–336. 32
- [80] Anirban Bhattacharyya, Arnab Pramanik, Sudipta Kumar Maji, Saubhik Haldar, Ujjal Kumar Mukhopadhyay, and Joydeep Mukherjee. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. 2(1):34. 32
- [81] Conversion of food industrial wastes into bioplastics | SpringerLink. 32
- [82] P. H. Yu, H. Chua, A. L. Huang, W. Lo, and G. Q. Chen. Conversion of food industrial wastes into bioplastics. 70–72:603–614. 32
- [83] Majd Khalid Eshtaya, Abdul Rahman Nor 'Aini, and Mohd Ali Hassan. Bioconversion of restaurant waste into Polyhydroxybutyrate (PHB) by recombinant *E. coli* through anaerobic digestion. 11(1):27–37. 33
- [84] Akira Hafuka, Kenji Sakaida, Hisashi Satoh, Masahiro Takahashi, Yoshimasa Watanabe, and Satoshi Okabe. Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. 102(3):3551–3553. 33
- [85] M. Teresa Cesário, Rodrigo S. Raposo, M. Catarina M. D. de Almeida, Frederik van Keulen,

- Bruno S. Ferreira, and M. Manuela R. da Fonseca. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. 31(1):104–113. 33
- [86] Raveendran Sindhu, Nagapoosam Silviya, Parameswaran Binod, and Ashok Pandey. Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. 78:67–72. 33
- [87] Mateus Schreiner Garcez Lopes, José Gregório Cabrera Gomez, Marilda Keico Taciro, Thátiane Teixeira Mendonça, and Luiziana Ferreira Silva. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. 41(9):1353–1363. 33
- [88] Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates - ScienceDirect. 33
- [89] Production of PHA from Cassava Starch Wastewater in Sequencing Batch Reactor Treatment System - ScienceDirect. 34
- [90] Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater - Ben - 2016 - Journal of Chemical Technology & Biotechnology - Wiley Online Library. 34
- [91] Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery Wastewater - Liu - 2008 - Water Environment Research - Wiley Online Library. 34
- [92] Do Young Kim, Young Baek Kim, and Young Ha Rhee. Evaluation of various carbon subs-

- trates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. 28(1):23–29. 35
- [93] K Sudesh, H Abe, and Y Doi. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10):1503–1555, December 2000. 35, 36
- [94] Ying Wang, Jin Yin, and Guo-Qiang Chen. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. 30:59–65. 36
- [95] A. Steinbüchel and H. G. Schlegel. Physiology and molecular genetics of poly(?-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. 5(3):535–542. 39, 40
- [96] Bernd H. A. Rehm. Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. 376(1):15–33. 39
- [97] Toshiaki Fukui, Naofumi Shiomi, and Yoshiharu Doi. Expression and Characterization of (*R*)-Specific Enoyl Coenzyme A Hydratase Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by *Aeromonas caviae*. 180(3):667–673. 39
- [98] Takeharu Tsuge, Kotaro Yano, Shin-ichi Imazu, Keiji Numata, Yoshihiro Kikkawa, Hideki Abe, Seiichi Taguchi, and Yoshiharu Doi. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolymer from Fructose Using Wild-Type and Laboratory-Evolved PHA Synthases. 5(2):112–117. 40
- [99] Colin Ratledge and B. Kristiansen, editors. *Basic Biotechnology*. Cambridge University Press, 3rd ed edition. 41

- [100] G. N. M. Huijberts and G. Eggink. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures. 46(3):233–239. 41
- [101] Nils Hoffmann, Amro A. Amara, Br Bernd Beermann, Qingsheng Qi, Hans-Jürgen Hinz, and Bernd H. A. Rehm. Biochemical Characterization of the *Pseudomonas putida* 3-Hydroxyacyl ACP:CoA Transacylase, Which Diverts Intermediates of Fatty Acid de Novo Biosynthesis *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45):42926–42936, November 2002. 41
- [102] Bernd H. A. Rehm, Niels Krüger, and Alexander Steinbüchel. A New Metabolic Link between Fatty Acid de NovoSynthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis: THE PHAG GENE FROM PSEUDOMONAS PUTIDAKT2440 ENCODES A 3-HYDROXYACYL-ACYL CARRIER PROTEIN-COENZYME A TRANSFERASE *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37):24044–24051, September 1998. 41
- [103] Tamao Hisano, Takeharu Tsuge, Toshiaki Fukui, Tadahisa Iwata, Kunio Miki, and Yoshiharu Doi. Crystal Structure of the (R)-Specific Enoyl-CoA Hydratase from *Aeromonas caviae* Involved in Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1):617–624, January 2003. 42
- [104] Matthias Raberg, Jan Bechmann, Ulrike Brandt, Jonas Schlüter, Bianca Uischner, Birgit Voigt, Michael Hecker, and Alexander Steinbüchel. Versatile metabolic adaptations of *Ralstonia eutropha* H16 to a loss of PdhL, the E3 component of the pyruvate dehydrogenase complex. 77(7):2254–2263. 42

- [105] O. P. Peoples and A. J. Sinskey. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). 264(26):15298–15303. 42, 43
- [106] Sunhee Lee, Eunyoung Jeon, Hyun Shik Yun, and Jinwon Lee. Improvement of fatty acid biosynthesis by engineered recombinant *Escherichia coli*. 16(4):706. 43
- [107] Q. Ren, N. Sierro, B. Witholt, and B. Kessler. FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. 182(10):2978–2981. 43
- [108] H. E. Valentin and D. Dennis. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. 58(1):33–38. 43, 44
- [109] Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ* - ScienceDirect. 44
- [110] Henry E. Valentin and Alexander Steinbüchel. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. 3(3):169–175. 44
- [111] Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar typhimurium - PubMed. 44

- [112] Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of *mutB* by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene - PubMed. 44
- [113] H. Satoh, T. Mino, and T. Matsuo. PHA production by activated sludge. 25(1-3):105–109, 1999 Jun-Jul. 44
- [114] S. Slater, K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett, and K. J. Gruys. Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. 180(8):1979–1987. 44
- [115] null Chohan and null Copeland. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium (Cicer) sp.* Strain CC 1192. 64(8):2859–2863. 45
- [116] V. Mittendorf, E. J. Robertson, R. M. Leech, N. Krüger, A. Steinbüchel, and Y. Poirier. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis thaliana* using intermediates of peroxisomal fatty acid beta-oxidation. 95(23):13397–13402. 45
- [117] Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* - PubMed. 45
- [118] Shao-Ping Ouyang, Rong Cong Luo, Si-Si Chen, Qian Liu, Ahleum Chung, Qiong Wu, and Guo-Qiang Chen. Production of polyhydroxyalkanoates with high 3-hydroxydodecanoate

- monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. 8(8):2504–2511. 45
- [119] Leo Zhong Zheng, Zhi Li, Hong-Lei Tian, Ming Li, and Guo-Qiang Chen. Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein:coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. 252(2):299–307. 45
- [120] P. C. Brzostowicz, M. S. Blasko, and P. E. Rouvière. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. 58(6):781–789. 46
- [121] Guo-Qiang Chen, Guo-Qiang Chen, and Guo-Qiang Chen. Plastics from bacteria : natural functions and applications. *null*, 2010. 47
- [122] Henry E. Valentin and Alexander Steinbüchel. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. 3(3):169–175. 47
- [123] Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. *New Biotechnology*, 37:108–116, July 2017. Publisher: Elsevier. 48
- [124] A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34:47–53, January 2017. Publisher: Elsevier. 48

- [125] Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapple peel waste using *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology*, 231:232–238, August 2016. Publisher: Elsevier. 48
- [126] Constantina Kourmentza, Jersson Plácido, Nikolaos Venetsaneas, Anna Burniol-Figols, Cristiano Varrone, Hariklia N. Gavala, and Maria A. M. Reis. Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. 4(2):55. 48
- [127] Gi Na Lee and Jonguk Na. Future of microbial polyesters. 12(1):54. 49
- [128] Manish Kumar, Rashmi Rathour, Rashmi Singh, Yuqing Sun, Ashok Pandey, Edgard Gnan-sounou, Kun-Yi Andrew Lin, Daniel C.W. Tsang, and Indu Shekhar Thakur. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. 263:121500. 49, 57
- [129] Loveleen Kaur, Robinka Khajuria, Leena Parihar, and G. Dimpal Singh. POLYHYDROXYALKANOATES: BIOSYNTHESIS TO COMMERCIAL PRODUCTION- A REVIEW. 2021:1098–1106. 49
- [130] Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future - ScienceDirect. 56
- [131] Bacterial cell wall macroamphiphiles: Pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system - PubMed. 56
- [132] Guo-Qiang Chen and Qiong Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. 26(33):6565–6578. 57

- [133] B. Wampfler, T. Ramsauer, S. Rezzonico, R. Hischier, R. Köhling, L. Thöny-Meyer, and M. Zinn. Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. 11(10):2716–2723. 57
- [134] Peter X Ma. Scaffolds for tissue fabrication. 7(5):30–40. 57
- [135] Wai Lam, Yujie Wang, Pui Ling Chan, Shun Wan Chan, Yiu Fai Tsang, Hong Chua, and Peter Hoi Fu Yu. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. 38(13-14):1779–1791. 57
- [136] S. Philip, T. Keshavarz, and I. Roy. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applications. 82(3):233–247. 57, 59, 60, 62
- [137] V. I. Sevastianov, N. V. Perova, E. I. Shishatskaya, G. S. Kalacheva, and T. G. Volova. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. 14(10):1029–1042. 57
- [138] Guo-Qiang Chen and Qiong Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. 26(33):6565–6578. 58
- [139] Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats - Endrigo Gabellini Leonel Alves, Cleuza Maria de Faria Rezende, Rogéria Serakides, Marivalda de Magalhães Pereira, Isabel Rodrigues Rosado, 2011. 58
- [140] Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery - ScienceDirect. 58

- [141] Philip L. Gould, Simon J. Holland, and Brian J. Tighe. Polymers for biodegradable medical devices. IV. Hydroxybutyrate-valerate copolymers as non-disintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms. 38(1):231–237. 58
- [142] Iftikhar Ali and Nazia Jamil. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. 11(1):19–27. 58
- [143] Subhasree Ray and Vipin Chandra Kalia. Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. 57(3):261–269. 58
- [144] Sabeel P. Valappil, Aldo R. Boccaccini, Christopher Bucke, and Ipsita Roy. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. 91(1):1–17. 58
- [145] M. F. Yagmurlu, F. Korkusuz, I. Gürsel, P. Korkusuz, U. Ors, and V. Hasirci. Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: In vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. 46(4):494–503. 59
- [146] In vitro antibiotic release from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) rods: *Journal of Microencapsulation*: Vol 19, No 2. 59
- [147] Guo-Qiang Chen and Qiong Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. 26(33):6565–6578. 59

- [148] Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification - Zinn - 2005 - Advanced Engineering Materials - Wiley Online Library. 60
- [149] Lianlai Zhang, Xianmo Deng, Shujie Zhao, and Zhitang Huang. Biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and hydroxyethyl cellulose acetate. 38(24):6001–6007. 60
- [150] L. L. Madison and G. W. Huisman. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. 63(1):21–53. 60
- [151] C. A. Lauzier, C. J. Monasterios, I. Saracovan, R. H. Marchessault, and B. A. Ramsay. Film formation and paper coating with poly ([beta]-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. 76:5. 60
- [152] C. S. K. Reddy, R. Ghai, null Rashmi, and V. C. Kalia. Polyhydroxyalkanoates: An overview. 87(2):137–146. 60
- [153] Xue Gao, Jin-Chun Chen, Qiong Wu, and Guo-Qiang Chen. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. 22(6):768–774. 61
- [154] Brooks B. Bond-Watts, Robert J. Bellerose, and Michelle C. Y. Chang. Enzyme mechanism as a kinetic control element for designing synthetic biofuel pathways. 7(4):222–227. 61
- [155] Production and applications of crude polyhydroxyalkanoate-containing bioplastic from the organic fraction of municipal solid waste | SpringerLink. 61

- [156] Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates | SpringerLink. 61
- [157] Aderemi T. Adeleye, Chuks Kenneth Odoh, Obieze Christian Enudi, Oluwakemi Oluwabunmi Banjoko, Osigbeminiyi Oludare Osiboye, Emmanuel Toluwalope Odediran, and Hitler Louis. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. 96:174–193. 62
- [158] N.I. López, J.A. Ruiz, and B.S. Méndez. Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. 14(5):681–684. 62
- [159] Ivan Dario Otero-Ramírez. BIOPROSPECTING OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHA's) PRODUCING BACTERIA IN THE DEPARTMENT OF NARIÑO. (2):9. 63, 78
- [160] Culturing and Enumerating Bacteria from Soil Samples | Protocol. 63
- [161] Mac Conkey Agar. 65
- [162] fernando. King b agar | pseudomonas. 65
- [163] Adriana Guadalupe Mejía Chávez. PROTOCOLOS DE PRÁCTICAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL FACULTAD DE QUÍMICA. page 3. 66
- [164] Isolation and identification of fecal bacteria from water | environmental microbiology | jove. 66

- [165] A. G. Ostle and J. G. Holt. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. 44(1):238–241. 67
- [166] Ana Lorena Arroyave, Mariana Cardona, and Lina María Agudelo. Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos -(phas)en lodos activados. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1):69–76, November 2013. Number: 1. 68, 69, 73
- [167] Martha Liliana Arcos, Faisury Ossa, and Tito Efraín Díaz. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 5(1):60–63, October 2004. 68, 69
- [168] Polyhydroxyalkanoates production with *Ralstonia eutropha* from low quality waste animal fats. *Journal of Biotechnology*, 214:119–127, November 2015. Publisher: Elsevier. 69
- [169] Guilherme A. de Souza Reis, Michiel H. A. Michels, Gabriela L. Fajardo, Ischa Lamot, and Jappe H. de Best. Optimization of Green Extraction and Purification of PHA Produced by Mixed Microbial Cultures from Sludge. *Water*, 12(4):1185, April 2020. 70, 71, 72
- [170] Pravesh Tamang, Rintu Banerjee, Stephan Köster, and Regina Nogueira. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. 78:137–146. 70
- [171] Iza Radecka, Victor Irerere, Guozhan Jiang, David Hill, Craig Williams, Grazyna Adamus, Michal Kwiecień, Adam A. Marek, Jan Zawadiak, Brian Johnston, and Marek Kowalczyk.

- Oxidized Polyethylene Wax as a Potential Carbon Source for PHA Production. 9(5):E367.
72
- [172] Thermo scientific™ sistema rapid™ one - ver productos inicio. 73
- [173] Giin-Yu Tan, Chia-Lung Chen, Ling Li, Liya Ge, Lin Wang, Indah Razaad, Yanhong Li, Lei Zhao, Yu Mo, and Jing-Yuan Wang. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3):706–754, March 2014. 77
- [174] Jean Felipe Leal Silva, Rebecca Grekin, Adriano Pinto Mariano, and Rubens Maciel Filho. Making Levulinic Acid and Ethyl Levulinate Economically Viable: A Worldwide Technoeconomic and Environmental Assessment of Possible Routes. 6(4):613–639. 79
- [175] J. Merrylin, R. Yukesh Kannah, J. Rajesh Banu, and Ick Tae Yeom. Chapter 6 - Production of organic acids and enzymes/biocatalysts from food waste. In J. Rajesh Banu, Gopalakrishnan Kumar, M. Gunasekaran, and S. Kavitha, editors, *Food Waste to Valuable Resources*, pages 119–141. Academic Press. 79
- [176] Peter Werle and Marcus Morawietz. Alcohols, Polyhydric. In Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, editor, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, page a01_305. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 79
- [177] Salma Shahid, Sadia Razzaq, Robina Farooq, and Zill-i-Huma Nazli. Polyhydroxyalkanoates: Next generation natural biomolecules and a solution for the world's future economy. 166:297–321. Ya leído. 83

- [178] 2D NMR Introduction. 85, 86
- [179] Ana Rebocho, João Pereira, Luisa Neves, Vítor Alves, Chantal Sevrin, Christian Grandfils, Filomena Freitas, and Maria Reis. Preparation and Characterization of Films Based on a Natural P(3HB)/mcl-PHA Blend Obtained through the Co-culture of *Cupriavidus Necator* and *Pseudomonas Citronellolis* in Apple Pulp Waste. 7:34. 89
- [180] Raveendran Sindhu, Balakrishnan Ammu, Parameswaran Binod, Sreelatha K. Deepthi, K. B. Ramachandran, Carlos Ricardo Soccol, and Ashok Pandey. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. 54:783–794. 91
- [181] Sarisha Singh, Bruce Sithole, Prabashni Lekha, Kugenthiren Permaul, and Roshini Govinden. Optimization of cultivation medium and cyclic fed-batch fermentation strategy for enhanced polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus thuringiensis* using a glucose-rich hydrolyzate. 8. 91
- [182] E Juni. Genetics and Physiology of *Acinetobacter*. 32(1):349–371. 92
- [183] Claudia Clavijo, Virginia Chipana, Jhon Centeno, Doris Zúñiga, and Carlos Guillén. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de olea europea “olivo” en tacna Perú. 11(1-2):89. 92
- [184] Infecciones por *acinetobacter* - enfermedades infecciosas. 92

- [185] Cindy Fevre, Virginie Passet, Alexis Deletoile, Valérie Barbe, Lionel Frangeul, Ana S. Almeida, Philippe Sansonetti, Régis Tournebize, and Sylvain Brisse. PCR-Based Identification of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, the Agent of Rhinoscleroma. 5(5):e1052. 92
- [186] Anatoly Boyandin, S. Prudnikova, V. Karpov, Vladimir Ivonin, Ngoc Do, Thi Nguyen, Thi Le, Nikolay Filichev, Alexander Levin, Maxim Filipenko, Tatiana Volova, and Iosif Gitelson. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. 83:77–84. 92
- [187] Wei Wang, Shihui Yang, Glendon B. Hunsinger, Philip T. Pienkos, and David K. Johnson. Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. 5. 124

Apéndices

Apéndice A. Preparación de medios de cultivo.

Tabla 12

Preparación de medios de cultivo implementados en este proyecto de investigación.

Componente	Cantidad (g/l)
Mc Conkey (Condalab)	
Agar bacteriano	13,5
Sales biliares	1,5
Cristal Violeta	0,001
Digerido pancreático de gelatina	17,0
Rojo neutro	0,03
Mix de peptona	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Lactosa monohidratada	10,0

Continúa en la siguiente página...

Tabla 12 – Preparación de medios de cultivo implementados en este proyecto de investigación

Componente	Cantidad (g/l)
King's B	
Peptona bacteriana	20,0
Hidrogeno-fosfato dipotasico (K_2HOP_4)	1,5
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5
Glicerol	10 (ml/l)
Agar bacteriano	15,0
Luria Bertrani (LB)	
Extracto de levadura	1,0
Triptona	2,0
Cloruro de sodio ($NaCl$)	2,0
Glucosa	4,0
Agar bacteriano	15,0

Continúa en la siguiente página...

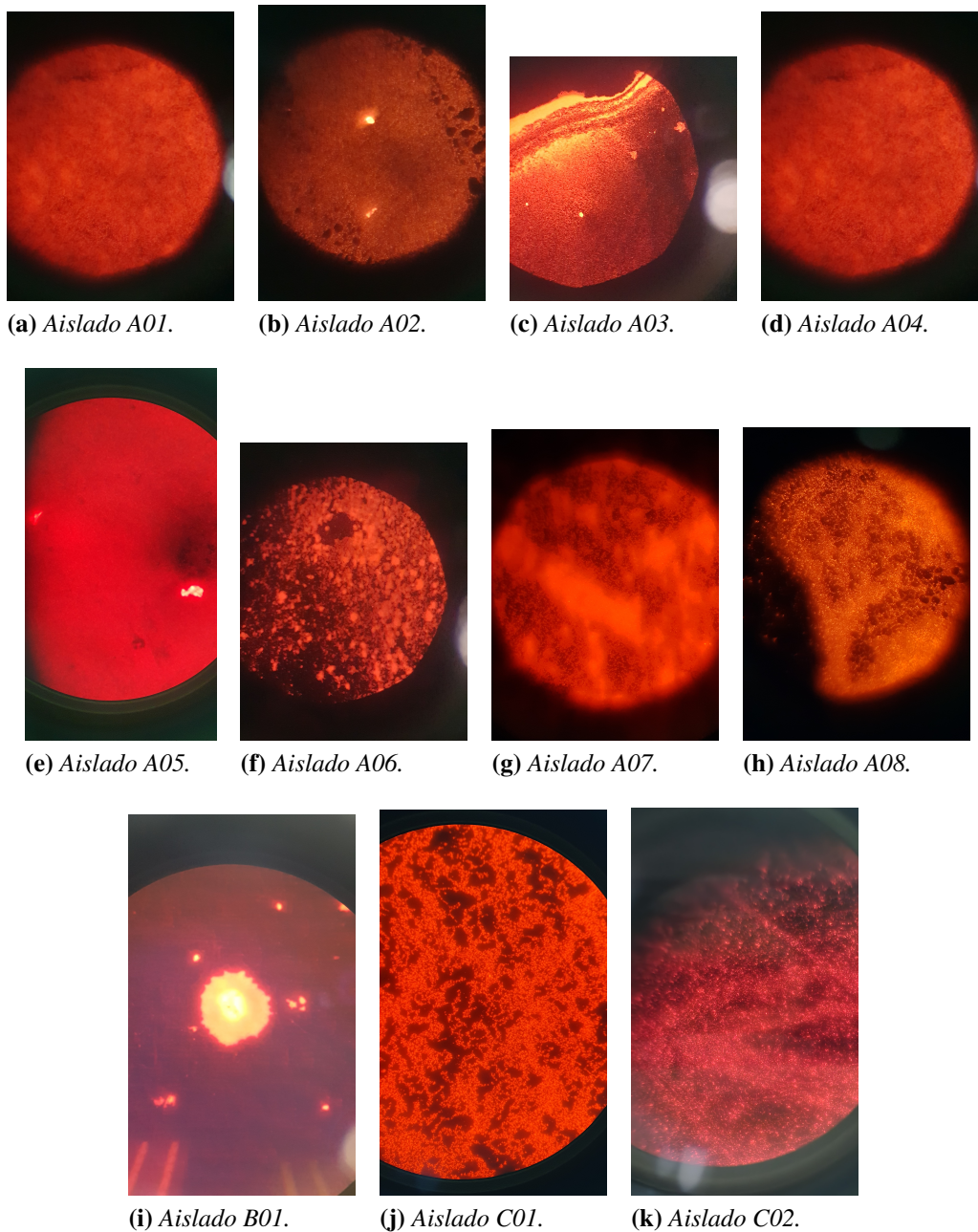
Tabla 12 – Preparación de medios de cultivo implementados en este proyecto de investigación

Componente	Cantidad (g/l)
Medio de activación	
Peptona	17,0
Glucosa	2,0
Cloruro de sodio (<i>NaCl</i>)	5,0
Hidrogeno-fosfato dipotasico (<i>K₂HOP₄</i>)	2,5
Medio mínimo de sales (MSM) [187]	
Fosfato de hidrogeno disódico (<i>Na₂HPO₄</i>)	7,0
Dihidrógeno fosfato de potasio (<i>KH₂PO₄</i>)	2,0
Sulfato de amonio (<i>(NH₄)₂SO₄</i>)	1,0
Sulfato de magnesio heptahidratado (<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>)	0,2
Cloruro de calcio dihidratado (<i>CaCl₂ · 2H₂O</i>)	15 mg
Glucosa	10
Extracto de levadura	1,0

Continúa en la siguiente página...

Tabla 12 – Preparación de medios de cultivo implementados en este proyecto de investigación

Componente	Cantidad (g/l)
Solucion de metales	1,0 ml
Esta solución de metales fue preparada con los siguientes componentes:	
EDTA dihidrato disódico ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)	6,4
Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,0
Molibdato de sódio dihidratado ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,1
Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,5
Sulfato de hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	2,5
Sulfato de cobre (II) pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0,1
Cloruro de cobalto (II) hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,2
Sulfato de manganeso (II) monohidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0,52

Apéndice B. Resultados prueba preliminar de Azul Nilo para las muestras PHA positivas.**Figura 16**

Resultado prueba preliminar de Azul Nilo de las colonias PHA positivas.

Apéndice C. Resultados Masa seca colonias PHA positivas.

Colonia	UFC ($\times 10^8 \text{ml}^{-1}$) ¹	Peso seco (mg)			
		Toma 1	Toma 2	Toma 3	Resultado
Colonia A01	15,7	85,0	115,0	60,0	86,7 \pm 15,9
Colonia A02	9,7	215,0	220,0	220,0	218,3 \pm 1,7
Colonia A03	21,7	130,0	140,0	145,0	138,3 \pm 4,4
Colonia A04	11,4	155,0	155,0	155,0	155,0 \pm 1,0
Colonia A05	6,8	120,0	115,0	105,0	113,3 \pm 4,4
Colonia A06	11,7	125,0	130,0	130,0	128,3 \pm 1,7
Colonia A07	19,9	205,0	175,0	180,0	186,7 \pm 9,3
Colonia A08	6,9	95,0	95,0	80,0	90,0 \pm 5,0
Colonia B01	28,5	100,0	120,0	95,0	105,0 \pm 7,6
Colonia C01	1,6	66,0	132,0	78,0	92,0 \pm 20,3
Colonia C02	9,0	140,0	120,0	165,0	141,7 \pm 13,0

¹ Unidades Formadoras de Colonia

Tabla 13

Resultado masa seca para las colonias bacterianas PHA positivas

Apéndice D. Soluciones escala McFarland empleadas par la curva de calibración.

Patrón N°	BaCl₂ 1% (ml)	H₂SO₄ 1% (ml)	UFC ($\times 10^8$ ml⁻¹)¹
1	0,1	9,9	3,0
2	0,2	9,8	6,0
3	0,3	9,7	9,0
4	0,4	9,6	12,0
5	0,5	9,5	15,0
6	0,6	9,4	18,0
7	0,7	9,3	21,0
8	0,8	9,2	24,0
9	0,9	9,1	27,0
10	1,0	9,0	30,0

¹ Unidades Formadoras de Colonia.

Tabla 14

Soluciones escala de McFarland

Apéndice E. Perfiles cromatograficos obtenidos para los biopolímeros extraídos de las colonias A1 a A8.

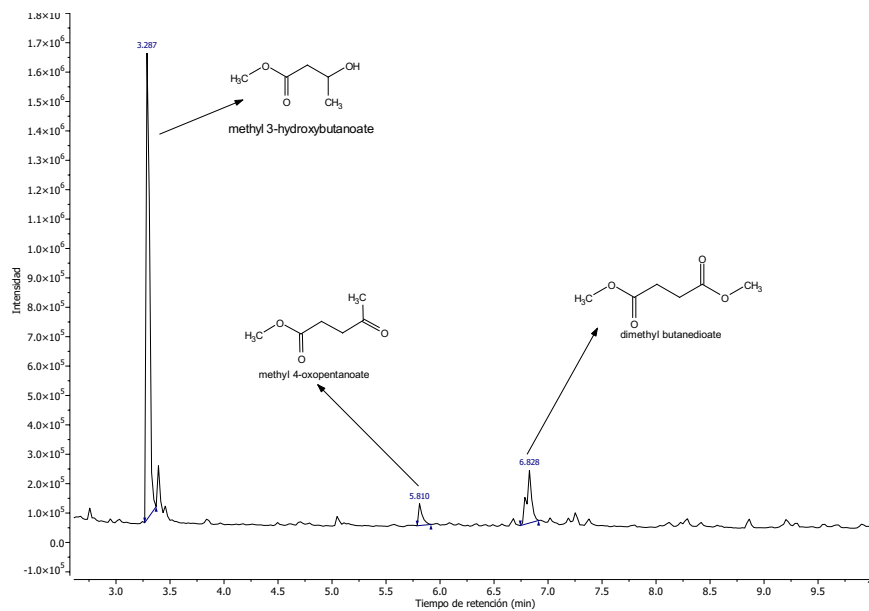


Figura 17

Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A01.

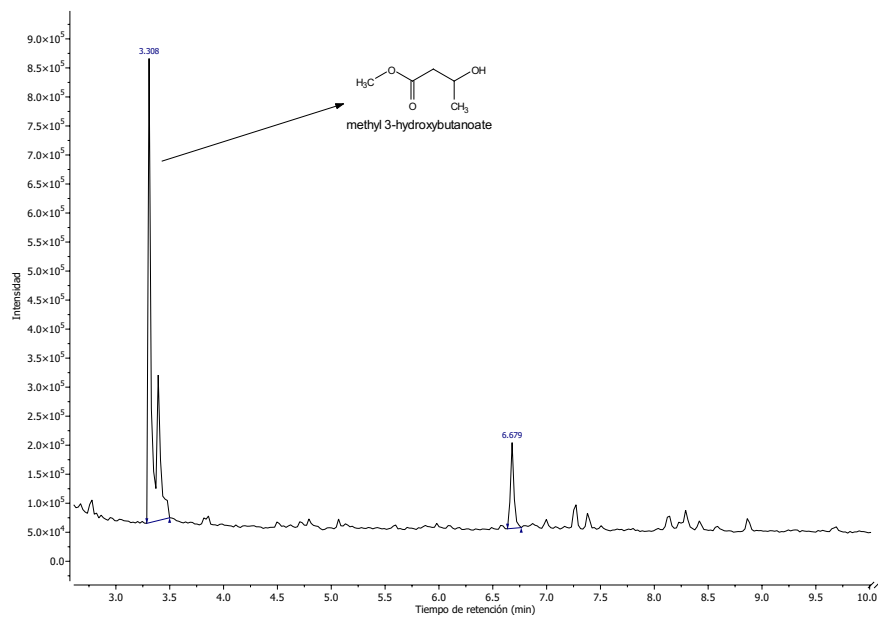


Figura 18
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A02.

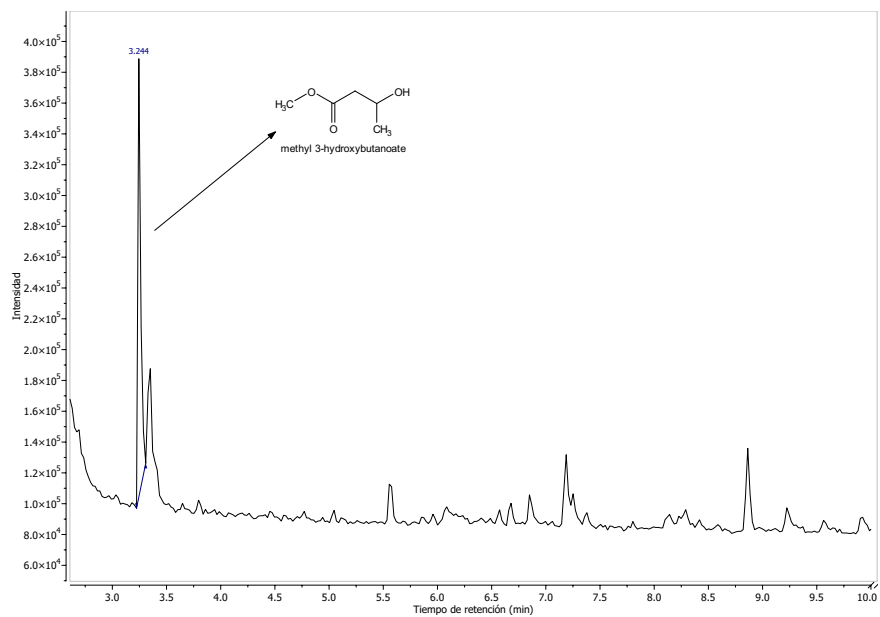


Figura 19
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A03.

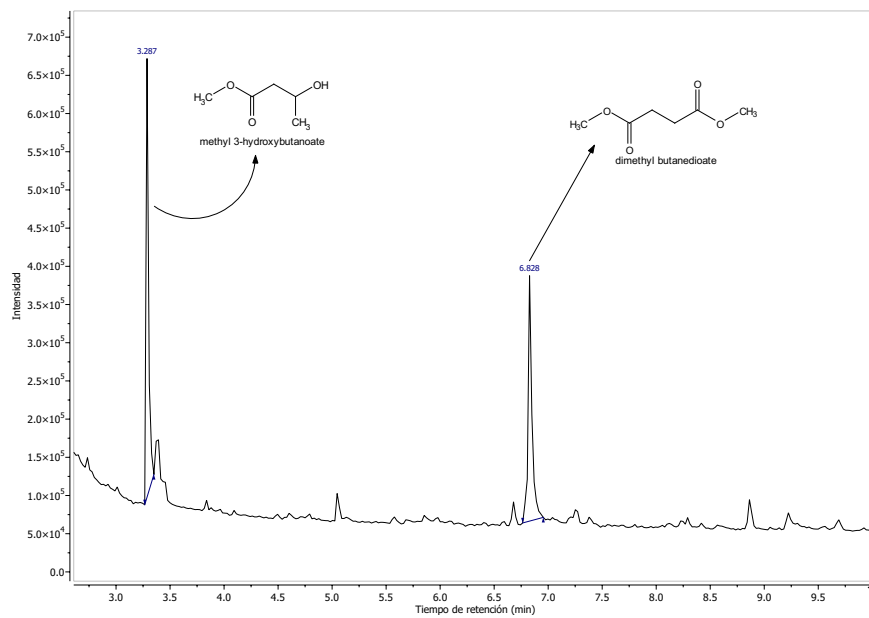


Figura 20
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de A04.

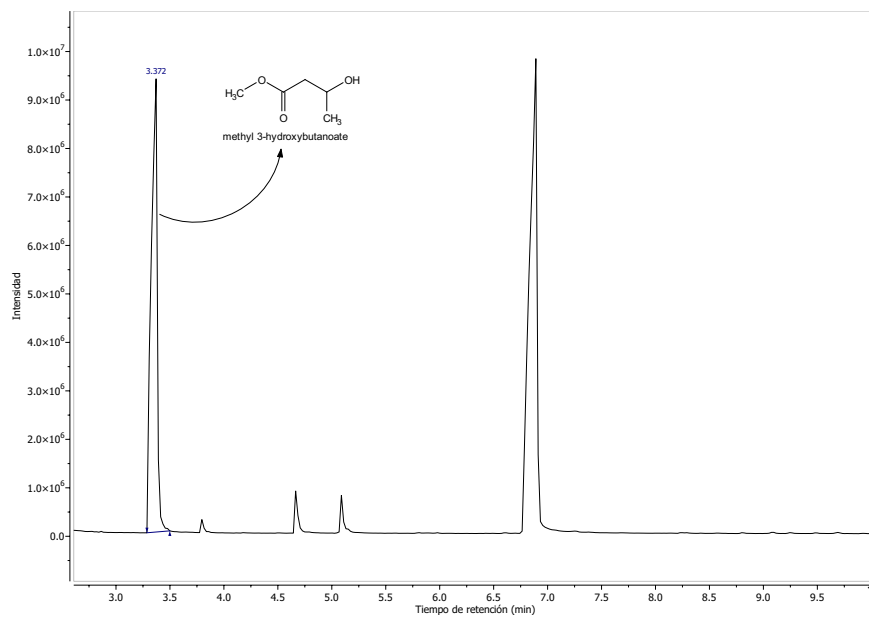


Figura 21
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de A05.

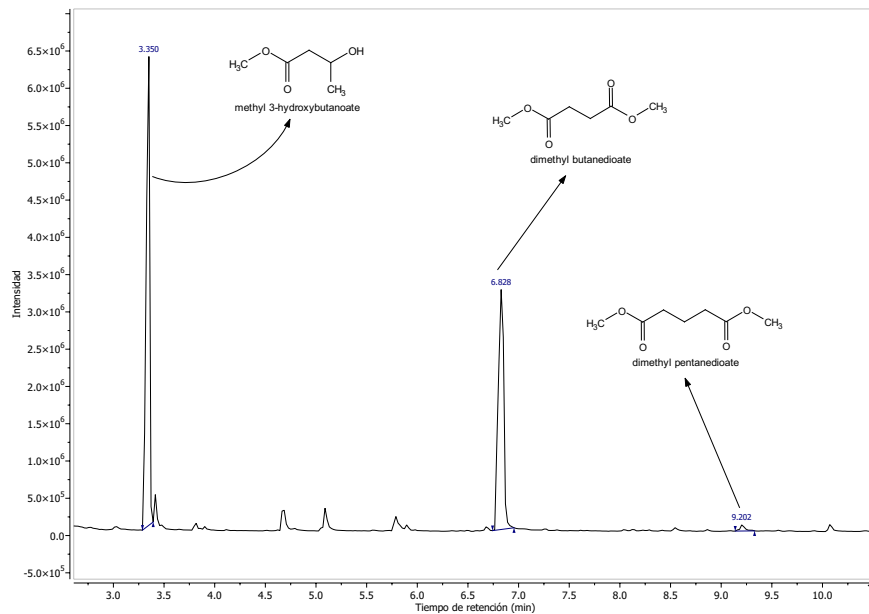


Figura 22
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A06.

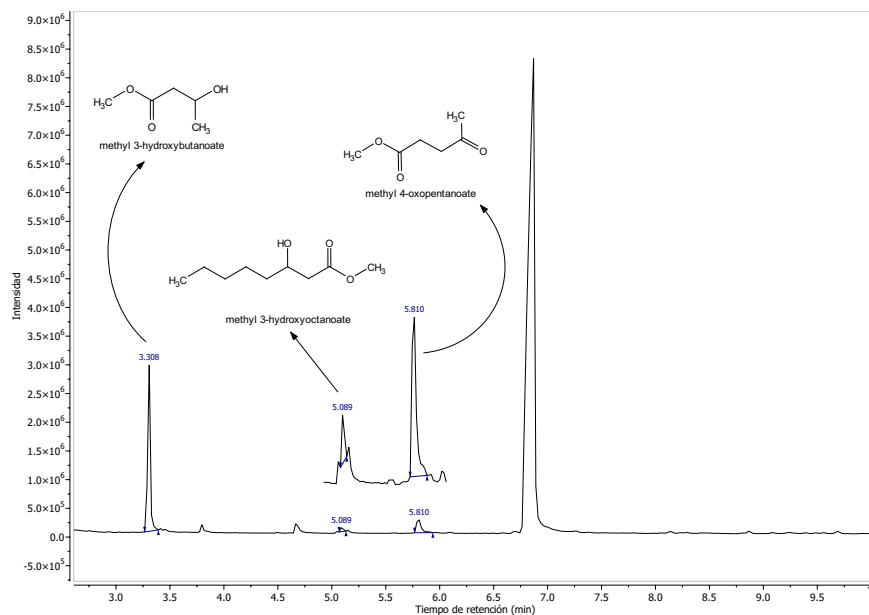
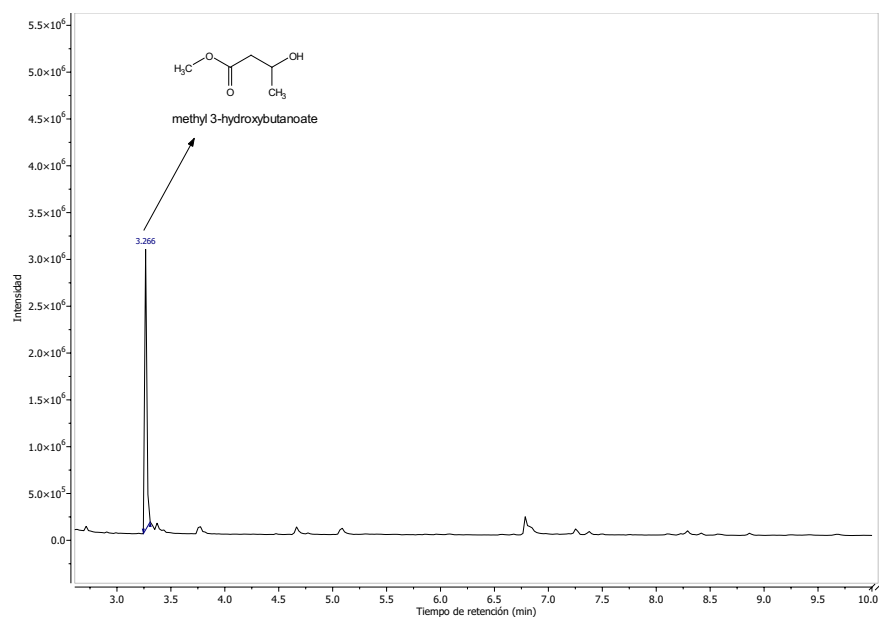


Figura 23
Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extraido de A07.

**Figura 24**

Perfil cromatográfico obtenido para el biopolímero extradido de A08.