

REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES  
VERTIDAS AL RÍO PASTO CON BACTERIAS PRODUCTORAS DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS.

IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
PASTO  
2012

REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES  
VERTIDAS AL RÍO PASTO CON BACTERIAS PRODUCTORAS DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS.

IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director  
Pablo Fernández Izquierdo  
PhD: Ciencias Biológicas Área Microbiología.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
PASTO  
2012

## NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”

Artículo 1° del acuerdo No 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Pablo Fernández Izquierdo PhD

Firma del Presidente de tesis

---

Jaqueline Mena Huertas MSc

Firma del jurado

---

Dolly Margot Revelo Romo MSc

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Agosto de 2012

## AGRADECIMIENTOS

A Dios porque cuando quiero retroceder me extiende su mano y me enseña que todo sería más fácil si no me apartara de Él.

A mi madre Jenny Amparo Ramírez porque sin su esfuerzo y dedicación quizás no fuera la persona que soy en este momento, gracias por apoyarme, por educarme, por entenderme, por estar siempre ahí, y por haber sido padre y madre a la vez.

A mi hermano por ser mi amigo, mi cómplice, mi apoyo y junto con mi madre la razón por la cual busco cada día ser mejor persona.

A mi asesor Pablo Fernández Izquierdo PhD por permitirme hacer parte de su equipo de trabajo, porque más que asesor es un amigo que siempre me ha apoyado y con sus consejos me ha formado como un profesional integral. Gracias por ayudarme a encontrar mi espacio dentro del extenso mundo de la biología.

A mis Jurados Dolly Margot Revelo Romo MSc y Jaqueline Mena Huertas MSc por sus valiosos aportes para la consolidación de este trabajo.

A Edith Mariela Burbano PhD por todas sus orientaciones y consejos no solo para el desarrollo de este trabajo, sino también en mi vida como profesional.

A Guido Ernesto Villota por todo su apoyo en la parte experimental de esta investigación y porque de alguna manera ha contribuido en mi formación profesional especialmente en el campo de la microbiología.

A Iván Sánchez MSc y al ingeniero Roberto García por sus recomendaciones y asesorías especialmente en la parte de tratamiento de aguas y diseño y construcción de bioreactores.

A los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, especialmente a Mary Luz Valencia y David Arturo por su colaboración en los análisis fisicoquímicos y cromatograficos.

A mis compañeros del grupo de investigación Biotecnología Microbiana: Vanessa Pérez, Mayra Quiroz, Marcela Concha, Isabel Gómez, Cristian Cabrera y Roger Castillo por su apoyo y recomendaciones en esos pequeños espacios de debate.

A mis compañeros de aventura Fiorela Delgado, Mileidy Betancourh, Érica Arturo, Ronald Fernández, Verónica Rodríguez, Ana Mora, Nathalia García, Lorena Maury y Carolina Burbano, porque fue un honor compartir con ustedes la experiencia tan maravillosa de convertirnos en Biólogos.

A todos los profesores del programa de Biología que en su momento me compartieron un poco de su conocimiento y me ayudaron a ser un profesional integral.

A la Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales por la financiación de este trabajo.

## RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) se acumulan en diferentes especies bacterianas y tienen potencial para reemplazar los plásticos de origen petroquímico con la ventaja que son biodegradables. Sin embargo, sus aplicaciones son limitadas por los costos de producción; por ello, se han implementado diferentes estrategias como la obtención de estos biopolímeros a partir de sustancias de desecho. En este sentido, se evaluó la síntesis de PHAs como una estrategia para disminuir la carga orgánica acumulada en las aguas residuales que se descargan al río Pasto. Para esto, se tomaron muestras de agua de cinco estaciones ubicadas en el cauce principal del río Pasto. Después, mediante la técnica de diluciones seriadas y siembra por superficie en placas de agar plate count suplementado con glucosa y Nilo azul A, se obtuvieron 44 aislados que presentaban fluorescencia naranja cuando se observaron a luz ultravioleta. Posteriormente, empleando técnicas analíticas se estableció que el aislamiento E1M10 RP produce hasta  $5,24 \text{ gL}^{-1}$  de polihidroxibutirato en un medio sin optimizar con glucosa como fuente de carbono. Después, mediante el análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA el aislado E1M10 RP tuvo 96% de identidad con *Bacillus subtilis*. Finalmente, en bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua con un volumen de trabajo de 2L, se determinó el efecto de factores nutricionales y operacionales sobre la remoción de materia orgánica de las aguas residuales vertidas al río Pasto utilizando como inóculo adicional esta bacteria. Los resultados obtenidos con estas metodologías permitieron establecer que la remoción de la materia orgánica fue del 94,63% y que los factores nutricionales KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y el factor operacional VVM inciden significativamente en el proceso. Adicionalmente, como subproducto del tratamiento se recuperó hasta  $0,111 \text{ gL}^{-1}$  de polihidroxibutirato. Por lo tanto, es posible tratar las aguas residuales de la ciudad de Pasto con bacterias silvestres productoras de PHAs.

Palabras clave: Bacterias, Polihidroxicanoatos, Remoción de Materia Orgánica, Aguas Residuales, Bioreactor, Tiempo de Retención Hidráulico.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are accumulated in different bacterial species and have the potential to replace petrochemical-based plastics with the advantage that they are biodegradable. However, their applications are limited by production costs, hence, different strategies have been implemented such as obtaining these biopolymers from waste products. In this sense, the synthesis of PHAs was assessed as a strategy to reduce the organic load accumulated in the river Pasto. For this, water samples were taken from five stations located in the main bed of the river Pasto. Then, by using the technique of serial dilution and seeding by spread plate in agar plate count supplemented with glucose and Nile Blue A, 44 isolates were obtained that showed orange fluorescence when viewed with ultraviolet light. Then, using analytical techniques it was established that the isolate E1M10 RP produces up to 5,24 gL<sup>-1</sup> of polyhydroxybutyrate in a medium without glucose as carbon source. Then, using the 16S rRNA sequence, the isolate E1M10 RP had 96% of identity with *Bacillus subtilis*. Finally, in upflow bioreactors operated under a continuous fermentation system with a working volume of 2L, it was determined the effect of nutritional and operational factors on the removal of organic matter from wastewater discharged to the river Pasto using this bacterium. The results obtained with these methodologies established that there was a 94.63% removal of organic matter and the nutritional factors KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> and the operational factor MVV significantly impact the process. Additionally, as a byproduct of the treatment, 0.111 gL<sup>-1</sup> of polyhydroxybutyrate was recovered. Therefore, it is possible to treat wastewater from the city of Pasto with wild bacteria producing PHAs.

Keywords: Bacteria, Polyhydroxyalkanoates, Removal of Organic Matter, Wastewater, Bioreactor, Hydraulic Retention Time



## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	21
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	23
2. JUSTIFICACIÓN .....	25
3. OBJETIVOS .....	26
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	26
4. MARCO TEORICO.....	27
4.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LOS RÍOS .....	27
4.2 EI RÍO PASTO. ....	29
4.3 COMPOSICION Y TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES .....	31
4.4 EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO .....	34
4.5 POLIHIDROXIALCANOATOS.....	35
4.5.1 Características generales de los PHAs .....	35
4.5.2 Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs.....	37
4.5.3 Polihidroxicanoatos acumulados a partir de muestras ambientales .....	39
4.5.4 Sistemas usados para la remoción de materia orgánica de aguas residuales con bacterias productoras de PHAs.....	41
4.6 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA. ....	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
5.1 DISEÑO DE MUESTREO PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs. ....	45
5.1.1 Área de muestreo.....	45
5.1.2 Muestreo .....	47
5.2 VALORACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHAs POR BACTERIAS SILVESTRES AISLADAS DEL RÍO PASTO. ....	47

5.2.1	Aislamiento presuntivo de bacterias acumuladoras de PHAs presentes en el río Pasto. ....	47
5.2.2	Pre-selección de aislamientos acumuladores de PHAs según la tinción con Negro Sudan B.....	48
5.2.3	Producción de PHAs en un medio sintético. ....	49
5.2.3.1	Caracterización del polímero acumulado por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).....	49
5.3	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA DEL AISLAMIENTO BACTERIANO QUE PRESENTO LA MAYOR ACUMULACIÓN DE PHAs.....	50
5.3.1	Extracción de DNA del aislamiento bacteriano seleccionado.....	50
5.3.2	Cuantificación de DNA por espectrofotometría. ....	51
5.3.3	Amplificación del gen 16S rRNA .....	51
5.3.4	Secuenciación y edición de secuencias.....	52
5.3.5.	Comparación con las bases de datos Ribosomal Database Project y GenBank. ....	52
5.4	EFFECTO DE FACTORES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES EN LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES VERTIDAS AL RÍO PASTO POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs. ....	53
5.4.1	Diseño experimental.....	53
5.4.2	Construcción de bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua.....	54
5.4.3	Operación de bioreactores:.....	57
5.4.3.1	Cálculo de tiempo de retención hidráulico (TRH) y caudal del agua residual.....	57
5.4.3.2	Preparación del inóculo para los bioreactores. ....	57
5.4.3.3	Medio de cultivo para los bioreactores.....	57
5.4.3.4	Evaluación de las variables de respuesta .....	58

5.5	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	58
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
6.1	AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs A PARTIR DE LAS AGUAS RESIDUALES DEL RÍO PASTO.....	60
6.2	PRE-SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS ACUMULADORES DE PHAs SEGÚN LA TINCIÓN CON NEGRO SUDAN B.....	65
6.3	PRODUCCIÓN DE PHAs POR LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.....	66
6.4	CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL AISLAMIENTO BACTERIANO QUE PRESENTÓ LA MAYOR PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN 16S rRNA.....	70
6.4.1	Extracción de DNA.....	70
6.4.2	Amplificación del gen 16S rRNA.....	71
6.5	EFEECTO DE FACTORES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES EN LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN UN REACTOR DE FLUJO CONTINUO.....	76
6.5.1	Cálculo de tiempo de retención y velocidad de ingreso de medio fresco.....	76
6.5.2	Remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de PHAs.....	77
6.5.3	Obtención de polihidroxicanoatos a partir de aguas residuales vertidas al río Pasto.....	82
	CONCLUSIONES.....	86
	RECOMENDACIONES.....	87
	APORTES.....	88
	DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	89

BIBLIOGRAFIA..... 90  
ANEXOS ..... 107

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales sustancias contaminantes provenientes de diferentes sectores industriales. ....	28
Tabla 2. Caracterización Físico-Química de diferentes sectores del río Pasto realizada por CORPONARIÑO en el año 2006.....	30
Tabla 3. Diseño experimental Plackett-Burman	54
Tabla 4. Niveles por factor empleados en el sistema de fermentación continua de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman.....	54
Tabla 5. Recuento de bacterias cultivables totales, colonias Nilo Azul A positivas y número de aislados obtenidos en los diferentes trayectos del río Pasto .....	60
Tabla 6: Variación de los parámetros DBO y DQO cuando el río Pasto ingresa a la ciudad y en una estación ubicada en el sector de Torobajo hacia la salida Norte de la ciudad. ....	64
Tabla 7. Determinación cualitativa de la presencia de gránulos intracelulares mediante la tinción con Negro Sudan B (MERCK) en diferentes fases de crecimiento de los aislamientos obtenidos del río Pasto. (+) Presencia baja, (++) presencia media, (+++) presencia alta. ....	65
Tabla 8. Producción de PHAs en $g L^{-1}$ de los aislamientos bacterianos seleccionados utilizando glucosa como fuente de carbono. ....	67
Tabla 9. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida en DQO y PHAs en $g L^{-1}$ obtenido en los diferentes tratamientos del diseño experimental Plackett Burman. ....	79

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad microbiana durante el proceso de descarga de aguas residuales. Fuente: Madigan <i>et al.</i> , 2004. ....	35
Figura 2. Micrografía de gránulos de PHAs acumulados por <i>Pseudomona aeruginosa</i> . Fuente: Rehm, 2007. ....	36
Figura 3. Degradación de un cilindro fabricado con poli-3-hidroxivalerato – co- 3-hidroxibutirato P(3HV-co-3HB). Fuente: Madison y Huisman, 1999. ....	36
Figura 4. Biosíntesis de PHAs en el contexto del metabolismo microbiano. Las enzimas más importantes se muestran en rojo: 3-cetotiolasa (PhaA); (R) – 3 – cetoacil-CoA reductasa (PhaB) (acetoacetyl-CoA reductasa para la biosíntesis de PHB); PHA sintasa o polimerasa (PhaC); (R) – 3-hidroxiacetyl ACP: CoA transacilasa (PhaG); (R) – enoyl CoA hidratasa específica (PhaJ). Fuente: Llana y Jay, 2003. ..	38
Figura 5. Síntesis de los copolímeros P(3HB-co-3HV-co-4HB), P(3HB-co-3HV) y P(3HB-co-4HB) en bacterias Gram positivas. Fuente: Valappil <i>et al.</i> , 2007. ....	39
Figura 6. Comparación de la concentración de PHAs ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de muestras tomadas en ambientes no contaminados (blanco) y muestras de ambientes contaminados (Negro). Fuente: Foster <i>et al.</i> , 2001. ....	40
Figura 7. Porcentaje de PHAs acumulado en cepas bacterianas aisladas de ambientes contaminados con malaza (MS) y aguas residuales (SEW) después de 72h a 37°C. Fuente: Usman <i>et al.</i> , 2007. ....	41
Figura 8. Sistema integral de producción de PHAs a partir de lodos de desecho de una planta de tratamiento de aguas residuales. Fuente: Arcos y Vargas, 2006. ....	42
Figura 9. Sistema en tres etapas para la producción de PHAs desde aguas residuales de una industria de papel. 1) Fermentación acidogénica;	

- 2) reactor de 125L, selector; 3) reactor principal de 2L; 4) clarificador; 5) bomba de retorno de los lodos. Fuente: Bengtsson *et al.*, 2008. .... 43
- Figura 10. Ubicación de estaciones de muestreo en el trayecto del río Pasto por la ciudad de San Juan de Pasto. (1): La Carolina, N: 01°12' 32,7", W: 077°15' 50,8". (2): Los Dos Puentes, N: 01°13' 16", W: 077°16' 44,5". (3): Avenida los estudiantes, N: 01°13' 47,7", W: 077°17' 4,1" (4): Pandiaco, N: 01°14' 5,1", W: 077°17' 35,9" y (5): Torobajo, N: 01°14'6,3", W: 077°17' 41,4". Fuente: Gobernación de Nariño, Oficina Departamental de turismo. 2007. .... 46
- Figura 11. Ubicación de las parcelas en el cauce del río Pasto para obtener una muestra compuesta con cinco réplicas por estación. Foto: Otero, I. Fuente: esta investigación. .... 47
- Figura 12: Esquema de bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua para el tratamiento de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de PHAs. a) esquema completo de 8 bioreactores donde se indica cada componente y las dimensiones del sitio donde se ubicaron: 1. Solución de nutrientes 0,01%, 2. Alimentador de agua residual, 3. Bioreactor, 4. Mezclador, 5. Válvula para regular caudal, 6. Válvulas para caudal del agua residual, 7. Sedimentador. b) esquema de 4 bioreactores con las dimensiones de cada componente. Software SolidWorks Educational Edition 2010 - 2011. .... 56
- Figura 13. Fluorescencia de colonias bacterianas aisladas del río Pasto (estación Pandiaco) en medio Plate Count y Nilo Azul A. a) siembra dilución  $10^{-4}$ . b) aislamiento. Foto: Otero, I. Fuente: este estudio ..... 61
- Figura 14. Morfología microscópica de aislamientos bacterianos fluorescentes obtenidos del río Pasto. a) Aislamiento E4M37 RP Bacilos Gram negativos; b) aislamiento E4M3 RP Estafilococos Gram positivos; c) aislamiento E4M26 RP Diplococos Gram negativos; d) aislamiento

	E4M35 RP Cocobacilos Gram negativos; e) aislamiento E5M13B RP Bacteria filamentosa Gram negativa. Foto: Otero, I. Fuente: Este estudio. ....	61
Figura 15.	Posible ruta del proceso de reducción del cromo hexavalente por bacterias productoras de PHAs. Fuente: Adaptado de: Sudesh <i>et al.</i> , 2000; Ramírez <i>et al.</i> , 2006; Murray <i>et al.</i> , 2009. ....	63
Figura 16.	Cinética de crecimiento y producción de PHAs por el aislamiento bacteriano E1M10 RP. Fuente: Este estudio. ....	67
Figura 17.	Cromatograma de éster de metilo 3 hidroxibutirato acumulado por el aislado E1M10 RP Fuente: Este estudio. ....	68
Figura 18.	Espectro de masas del compuesto 3-metil-hidroxibutirato sintetizado por el aislado E1M10RP. Fuente: Este estudio. ....	69
Figura 19.	Gel de agarosa al 1% para verificación de ADN extraído con el protocolo de Rivera, <i>et al.</i> , 1995. 1 y 5: marcador de tamaño molecular lambda Hind III, 2 muestra obtenida del aislamiento bacteriano E1M10 RP, 3 control positivo <i>Bacillus sp.</i> 4 control negativo agua. Fuente: Este estudio. ....	70
Figura 20.	Ensayo previo para estandarización de PCR con los primers 27F y 1041R. 1 y 20. Marcador de tamaño molecular de 1Kb; 2. <i>Bacillus sp.</i> , 3. <i>B. cereus</i> ; 4. <i>S. aureus</i> ; 5. <i>S. epidermidis</i> ; 6. <i>E. coli</i> , 7. <i>E. coli ATCC 13076</i> ; 8. <i>P. aeruginosa</i> ; 9. <i>P. putida</i> , 10. <i>Vibrio sp</i> ; 11. <i>V. cholerae RC 25</i> ; 12. <i>V. parahaemolyticus</i> ; 13. control negativo (agua); 14. <i>Salmonella sp.</i> ; 15. <i>B. subtilis</i> ; 16. <i>Listeria sp.</i> 17. <i>Candida sp.</i> 18. <i>Listeria innocua</i> y 19. <i>Proteus sp.</i> ....	72
Figura 21.	Gel de agarosa al 1% para verificación del amplificado del gen 16S rRNA. 1 y 5: marcador de tamaño molecular 1kb Ladder, 2 y 3: amplificado del aislamiento bacteriano E1M10 RP, 4: control positivo <i>Bacillus sp.</i> y 6: control negativo agua. Fuente: Este estudio. ....	73



Figura 22. Cromatograma en la región entre 189 a 210pb obtenida de la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10RP.....	74
Figura 23. Resultado obtenido al comparar la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10 RP en la base de datos Ribosomal Database Project ( <a href="http://rdp.cme.msu.edu/">http://rdp.cme.msu.edu/</a> ).....	74
Figura 24. Resultado obtenido al comparar la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10RP en la base de datos del GenBank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a> ). ....	75
Figura 25. Recuento en cámara de Neubauer de <i>Bacillus sp</i> E1M10RP en un medio con agua residual. Fuente: Este estudio. ....	77
Figura 26. Bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua para el tratamiento de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de polihidroxicanoatos. 1. Solución de Nutrientes 0,01%, 2. Alimentador de agua residual, 3. Válvulas solución de nutrientes, 4. Bioreactor, 5. Mezclador, 6. Válvula para regular caudal, 7. Válvulas para caudal del agua residual, 8. Sedimentador, 9. Aireador, 10. Colector final. Foto: Otero, I. ....	78
Figura 27. Incidencia de los factores sobre la remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto. Fuente: Este estudio.....	80
Figura 28. Incidencia de los factores sobre la síntesis de PHAs a partir de aguas residuales vertidas al río Pasto. Fuente: Este estudio.....	83
Figura 29. Obtención de PHAs en g L <sup>-1</sup> a partir del tratamiento de aguas residuales en un bioreactor de flujo ascendente operado bajo un sistema de fermentación continua. Fuente: Este estudio.....	83
Figura 30. Cromatograma del éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,850 minutos obtenido a partir de la remoción de materia orgánica de aguas vertidas al río Pasto. ....	84

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Dimensiones de los diferentes componentes de los bioreactores implementados para el desarrollo del tercer objetivo de esta investigación. ....	108
Anexo B: Descripción de las características culturales de los 44 aislamientos Nilo Azul A positivos obtenidos del río Pasto. ....	109
Anexo C: Evaluación de la fluorescencia en los 44 aislamientos bacterianos obtenidos del río Pasto y cultivados en agar Plate Count suplementado con Nilo Azul A. ....	112
Anexo D: Descripción microscópica de los 44 aislamientos bacterianos Nilo Azul A positivos obtenidos del río Pasto. ....	114
Anexo E: Curva de crecimiento de los aislamientos bacterianos acumuladores de PHAs pre-seleccionados con la tinción de Negro sudan B.....	116
Anexo F: Cromatograma del copolímero Poli-3-hidroxibutirato – co- 3-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) utilizado como patrón para determinar el tipo de PHAs sintetizado por el aislamiento bacteriano E1M10RP creciendo en medio sintético. Pico 2 éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,908 minutos. Pico 3 éster de metilo 3- hidroxivalerato con tiempo de retención de 7,060 minutos.....	118
Anexo G: Secuencia editada de 815pb del gen 16S rRNA obtenida del aislamiento bacteriano E1M10 RP.....	119
Anexo H: Análisis de cromatografía de gases para identificar la presencia de PHAs a partir del tratamiento de las aguas residuales vertidas al río Pasto, de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman.....	120

## GLOSARIO

**Aceptor de electrones:** sustancia que puede aceptar electrones de otra sustancia y que se reduce durante el proceso.

**Agente derivatizante:** reactivo químico que permite formar un derivado de una función química específica cuya volatilidad es más baja.

**Aguas residuales:** líquido derivado de fuentes domésticas o industriales que no puede descargarse sin tratamiento en lagos o ríos.

**Nilo Azul A:** colorante lipofílico, soluble en solventes orgánicos. Permite la detección presuntiva de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos por emisión de una fuerte fluorescencia cuando se observa el cultivo a luz ultravioleta.

**Bacterias cultivables:** bacterias que se pueden cultivar en el laboratorio utilizando medios de cultivo.

**Biopolímero:** macromolécula de origen biológico formada por unidades monoméricas.

**Bioreactor:** recipiente donde se realiza el cultivo, su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos.

**Cofactores redox:** moléculas intermediarias como el NAD y FAD que participan en el metabolismo, se reducen y luego se oxidan alternativamente.

**Cromatografía de gases (GC):** técnica analítica para la separación e identificación de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles empleando una columna (fase estacionaria) y un gas inerte (fase móvil).

**Cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS):** técnica analítica que acopla la cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación de compuestos orgánicos.

**Cultivo continuo:** sistema de cultivo en el que continuamente se alimenta medio fresco a un caudal determinado y se mantiene un volumen constante.

**Demanda Bioquímica de Oxígeno:** es una estimación semi-cuantitativa de la cantidad de materia orgánica fácilmente biodegradable que contiene una muestra de agua.

**Demanda Química de Oxígeno:** medida aproximada del contenido total de materia orgánica presente en una muestra de agua.

**Espectrofotometría:** método cuantitativo de análisis químico que utiliza la luz para medir la concentración de una sustancia.

**Ester de metilo:** grupo de compuestos orgánicos formados entre una cadena de carbonilo y un grupo metilo.

**Fermentación:** en un contexto industrial, cualquier proceso microbiano a escala que se realice aeróbica o anaeróbicamente.

**Gravimetría:** método analítico cuantitativo para determinar la cantidad de una sustancia midiendo su peso.

**Metabolismo:** conjunto de reacciones bioquímicas de una célula.

**Oxidación:** reacción química donde un elemento cede electrones y por lo tanto aumenta su estado de oxidación.

**Plackett – Burman:** diseño experimental factorial fraccionado que se utiliza para buscar y evaluar la influencia de factores sobre la variable de respuesta.

**Polihidroxicanoatos:** son poliésteres intracelulares que se agrupan formando gránulos acumulados por bacterias sometidas a estrés nutricional y que actúan principalmente como reserva de carbono y energía. A nivel biotecnológico tienen propiedades similares a los plásticos de origen petroquímico, pero son biodegradables.

**Reducción:** reacción química donde un elemento gana electrones y por lo tanto disminuye su estado de oxidación.

**Respiración aerobia:** proceso en el que un compuesto se oxida usando  $O_2$  como aceptor terminal de electrones.

**Velocidad de dilución:** se define como la relación entre el caudal de alimentación y el volumen del cultivo. Se considera como una variable de operación fundamental en cultivos continuos.

## INTRODUCCIÓN

Los ríos son una de las principales fuentes de abastecimiento de agua de las ciudades (Arcos *et al.*, 2005), tienen propiedades físicas, químicas y biológicas particulares que permiten el establecimiento de una flora y fauna característica representada en organismos tipo neuston, plancton y bentos (Roldán, 1994). Estos ecosistemas son afectados por una alta carga contaminante que llega hasta su cauce, modifica notoriamente sus propiedades y supera los niveles de auto-purificación (Guerrero y Guzmán, 2007).

Bajo estas circunstancias, se busca implementar sistemas de tratamiento que permitan la recuperación de estos cursos de agua; sin embargo, estos procesos pueden generar un costo de inversión muy alto, por consiguiente los ríos corren por las ciudades arrastrando una gran cantidad de desechos derivados de la actividad antrópica y comúnmente se los considera como aguas residuales que generan un gran problema ambiental.

Desde el punto de vista del metabolismo microbiano, estas aguas residuales pueden considerarse como un “medio de cultivo” que permite el crecimiento de determinadas poblaciones microbianas, las cuales, interactúan entre si y llevan a cabo una gran cantidad de reacciones que conllevan a la degradación de materia orgánica y la remoción de nutrientes; estos procesos de bioconversión, pueden ser de gran impacto e interés a escala industrial, ya que es posible desarrollar sistemas de tratamiento económicos, eficientes, sin subproductos contaminantes y además permiten la recuperación de metabolitos con amplias aplicaciones industriales, tales como los PHAs (Bitton, 2005; Bravo *et al.*, 2005).

Los PHAs son gránulos intracelulares que se acumulan en diferentes especies bacterianas mediante un proceso de bioconversión metabólica bajo estrés nutricional generado por exceso en una fuente de carbono y déficit de otros nutrientes. Estos polímeros biodegradables, tienen propiedades físicas, químicas y mecánicas similares a los plásticos de origen petroquímico, los cuales representan un serio problema ecológico mundial debido a su difícil degradación (Rhu *et al.*, 2003; Volova *et al.*, 2007). Sin embargo, la obtención de los PHAs se ha limitado debido a que los costos de producción pueden ser muy elevados, por esta razón, en las últimas décadas las investigaciones se enfocan a diseñar estrategias de producción con la menor inversión posible, dentro de este grupo de estrategias está la síntesis de PHAs a partir de sustancias de desecho como las aguas residuales domésticas (Arcos y Vargas, 2006). Al respecto, se ha mencionado que la acumulación de PHAs en estos ambientes se da por exceso en la fuente de carbono la cual, está disponible para los microorganismos por la degradación de los diversos compuestos presentes en las aguas residuales (Vishnuvardhan *et al.*, 2008). No obstante, para obtener PHAs a partir del tratamiento de aguas residuales se debe conocer la tendencia aparente de los consorcios microbianos

silvestres para sintetizar el biopolímero (Ma *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 2003; Chun *et al.*, 2005; Coats<sup>b</sup>*et al.*, 2007; Wook *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2011).

En atención a los anteriores planteamientos, en este proyecto de investigación se estableció a escala de laboratorio, la viabilidad de una estrategia para el tratamiento de las aguas residuales que se descargan al río Pasto, haciendo uso de bacterias que tienen la capacidad de acumular polímeros de interés industrial como los PHAs.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El río Pasto, es la principal fuente de suministro de agua potable para los habitantes de la ciudad de San Juan de Pasto, sin embargo, durante la trayectoria por la ciudad al río se descargan aguas residuales que modifican las propiedades físico-químicas de este cuerpo de agua. Al respecto, se ha reportado que los valores de oxígeno disuelto, DQO y DBO antes de que el río ingrese a la ciudad son de  $7.9 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ,  $20,8 \text{ mg L}^{-1}$  y  $7,6 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, en contraste, cuando el río finaliza su recorrido por la ciudad se registran valores de  $0.61 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ ,  $304 \text{ mg L}^{-1}$  y  $240 \text{ mg L}^{-1}$  para los mismos parámetros respectivamente (Paredes y Vallejo, 1994; Bastidas, 2006; Otero y Fernández, 2008)

Entre las principales fuentes de contaminación del río Pasto se encuentran residuos químicos y orgánicos del sector agrícola, aceites de motores producto del lavado y mantenimiento de vehículos en empresas particulares, de lavado de filtros del acueducto y principalmente aguas residuales (Burbano *et al.*, 1995; Henao y Rosero, 1996). Las aguas residuales se constituyen como una combinación de fluidos de origen doméstico, comercial e industrial que contienen sólidos totales (TS), Sólidos totales disueltos (TDS), carbono orgánico total, nitrógeno, amonio, fósforo, cloro, sulfatos, aceites, grasas y compuestos orgánicos volátiles (Mahvi *et al.*, 2004; Kling, 2007).

Es oportuno mencionar que la composición y concentración de las aguas residuales varía considerablemente desde una comunidad a otra por varias razones como: diferencias en la gastronomía, en el uso del agua, en las prácticas de higiene e inclusive por diferencias en el estatus socioeconómico. Por tal razón, el diseño de un sistema de tratamiento para aguas residuales requiere de estudios prolongados para determinar la variabilidad en términos de composición, concentración y carga orgánica de este tipo de aguas (Kling, 2007).

Al respecto, el tratamiento biológico utilizando microorganismos se considera como uno de los procesos eficientes para descontaminar aguas residuales porque tiene alto contenido de materia orgánica como fuente de carbono, nitrógeno y otros nutrientes (López, 1981; Suntud *et al.*, 1999) y además es económico comparado con procesos químicos porque la actividad metabólica de los microorganismos transforma la carga orgánica biodegradable en biomasa y otros productos menos contaminantes (Algeciras *et al.*, 2002).

Considerando que el río Pasto tiene una alta carga de contaminación orgánica (Paredes y Vallejo, 1994; Bastidas, 2006; Otero y Fernández, 2008) que aporta carbono, fósforo, nitrógeno, magnesio, azufre y aluminio entre otros, puede considerarse como un “medio de cultivo” para el crecimiento de los microorganismos productores de sustancias de interés industrial. En este sentido, trabajos de exploración realizados por Otero y Fernández, (2008) indican que las

relaciones carbono/nitrógeno detectadas en el río son de 13:1, las cuales son similares a las establecidas para la producción de PHAs a partir de aguas residuales (Anshuman *et al.*, 2007; Charuvan y Chalermraj, 2007; Wang *et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2008). Este aspecto indica que es factible utilizar las bacterias productoras de PHAs aisladas del río Pasto como una alternativa para el tratamiento de las aguas residuales que se descargan en este cuerpo de agua y probablemente con el desarrollo de este tipo de tecnologías se obtendría un doble beneficio: aportar a la remoción de materia orgánica y producir un biopolímero con amplias aplicaciones industriales.

En atención a los anteriores argumentos, en el presente trabajo, se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible utilizar bacterias que sintetizan polihidroxialcanoatos como estrategia eficiente para la remoción de la materia orgánica acumulada en las aguas residuales que llegan al río Pasto?



## 2. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento de la población y el desarrollo de las regiones requieren también reducir la dependencia de los combustibles fósiles y la cantidad de contaminantes que se generan. El tratamiento de aguas residuales es un proceso que permite cumplir con estos dos propósitos de manera simultánea, ya que, existen varios procesos biológicos en los que se produce bioenergía o productos de interés como los PHAs a partir del tratamiento. Sin embargo, existen barreras científicas y técnicas para el desarrollo de estas alternativas (Angenent *et al.*, 2004). Así mismo, extender los servicios de saneamiento al contar con alternativas para el tratamiento de aguas residuales promueve la “reutilización” de estas aguas, como por ejemplo para riego agrícola (Kassab *et al.*, 2010).

El río Pasto durante su recorrido por la ciudad se ha convertido en depósito permanente de una gran cantidad de sustancias contaminantes y de aguas residuales; lo anterior, afecta la disponibilidad de oxígeno, incrementa la materia orgánica y varía las condiciones físicas, químicas y biológicas presentes en este cuerpo de agua. Bajo esta perspectiva, se generan las condiciones medioambientales especiales que permiten el establecimiento de diferentes grupos de microorganismos con capacidad para transformar la materia orgánica y demás productos contaminantes en biomasa y otros polímeros de interés como los PHAs; por lo cual, pueden ser utilizados como actores principales en los sistemas de tratamiento de las aguas residuales que se vierten al río Pasto y a futuro contribuirían a la recuperación de este cuerpo de agua. Adicionalmente, en el Departamento de Nariño no existe un desarrollo tecnológico para el tratamiento de aguas residuales que se vierten al río Pasto.

En este orden de ideas, a través de este trabajo es posible conocer a escala de laboratorio, que tan eficientes pueden ser las bacterias productoras de PHAs como una estrategia para la remoción de materia orgánica de las aguas residuales que se descargan en el río Pasto. Además, se pretende recuperar un biopolímero de interés industrial como los PHAs a partir de un sustrato barato. De esta manera se contribuye al tratamiento de las aguas residuales de la ciudad de Pasto y potencialmente se reduce la dependencia de los combustibles fósiles al recuperar PHAs como subproducto del tratamiento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la síntesis de polihidroxicanoatos como una estrategia para disminuir la carga orgánica acumulada en las aguas residuales vertidas al río Pasto.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar la síntesis de polihidroxicanoatos por las bacterias silvestres aisladas del río Pasto.
- Caracterizar el aislamiento bacteriano que presente la mayor acumulación de PHAs mediante la secuencia parcial del gen 16S rRNA.
- Establecer el efecto de factores nutricionales y operacionales en la remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de polihidroxicanoatos.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LOS RÍOS

El agua por sus múltiples propiedades se constituye como uno de los recursos naturales imprescindibles para el sostenimiento de todas las formas de vida sobre el planeta (Arcos *et al.*, 2005); su empleo con fines domésticos, agropecuarios, industriales, recreativos y de transporte no siempre es racional y las fuentes de agua son impactadas por diferentes concentraciones de sustancias contaminantes que permanecen en ella el periodo de tiempo suficiente para provocar efectos identificables y que de una u otra forma modifican sus propiedades (Guerrero y Guzmán, 2007).

De acuerdo a su origen la contaminación de las fuentes de agua se ha dividido en dos grupos: contaminación natural o geoquímica y contaminación antropogénica (Gray, 1994). La contaminación geoquímica normalmente es muy dispersa y no provoca concentraciones altas de polución excepto en algunos lugares muy concretos como por ejemplo, sitios que contienen hidrocarburos (Guerrero y Guzmán, 2007). Su impacto depende de factores como la naturaleza del agua de lluvia, los tipos de aguas subterráneas y el tipo de suelo y roca que forman el acuífero (González *et al.*, 2007), Estas causas naturales pueden ocasionar colmatación de los bordes del cauce, la variación ligera del curso del mismo, y disminución en la diversidad del ecosistema (Bolaños y Carranza, 2006). En contraste, la contaminación antropogénica causa efectos muy negativos sobre el equilibrio ecosistémico y puede generarse a partir de residuos industriales (Tabla 1), urbanos (residuos sólidos orgánicos e inorgánicos y aguas residuales domésticas), agropecuarios y ganaderos (pesticidas, fertilizantes y restos orgánicos de animales y plantas) (Guerrero y Guzmán, 2007).

Tabla 1. Principales sustancias contaminantes provenientes de diferentes sectores industriales.

Sector	Sustancia contaminante
Construcción	Sólidos en suspensión, metales, pH.
Minería	Sólidos en suspensión, metales pesados, materia orgánica, cianuros, pH.
Energía	Calor, hidrocarburos y productos químicos.
Textil y pieles.	Cromo, taninos, tensoactivos, sulfuros, colorantes, grasas, disolventes orgánicos, ácido acético, ácido fórmico, sólidos en suspensión.
Automoción	Aceites lubricantes, pinturas y aguas residuales.
Navales	Petróleo, productos químicos, disolventes y pigmentos.
Siderurgia	Aceites, metales disueltos, emulsiones y ácidos.
Química inorgánica	Hg, P, fluoruros, cianuros, amoníaco, nitritos, H <sub>2</sub> S, F, Mn, Mo, Pb, Ag, Se, Zn, etc.
Química orgánica	Organohalogenados, compuestos cancerígenos y otros que afectan el balance de oxígeno.
Fertilizantes	Nitratos y fosfatos.
Pasta y papel	Sólidos en suspensión y otros que afectan el balance de oxígeno
Plaguicidas	Órgano halogenados, órgano fosforados, compuestos cancerígenos, biocidas, etc.
Fibras químicas	Aceites minerales y otros que afectan el balance de oxígeno.
Pinturas, barnices y tintas	Compuestos organoestámicos, compuestos de Zn, Cr, Se, Mo, Sn, Ba, Co, etc.

Fuente: Guerrero y Guzmán, 2007.

Los ríos o ecosistemas lóticos hacen parte de los diferentes ambientes que conforma el agua en su estado natural. La calidad de estos cursos de agua está determinada por las características físico-químicas y biológicas, las cuales pueden estar relacionadas con la geología de la cuenca, la composición y cantidad de precipitación, el tipo de suelos, la vegetación terrestre y los procesos biológicos. Estos ecosistemas son notoriamente alterados por los grandes focos de contaminación antropogénica, la magnitud con que cada uno de estos factores impacta el medio acuático afecta directamente la biodiversidad y determina el tipo de ecosistema particular para cada río (Toro *et al.*, 2002; Apella y Araujo, 2005).

En los últimos años, los ríos se han convertido en depósito constante de grandes volúmenes de contaminantes entre los que se destacan las aguas residuales de origen doméstico e industrial que han llevado al deterioro de muchos cursos de agua (Madigan *et al.*, 2004; Otiniano *et al.*, 2007); debido a que estas aguas

residuales están cargadas de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros compuestos químicos que saturan las fuentes de agua y pueden generar una serie de efectos negativos entre los que se pueden mencionar: acumulación de compuestos orgánicos biodegradables, compuestos orgánicos volátiles, xenobióticos recalcitrantes, residuos sólidos gruesos sobre la vegetación de la ribera, sedimentación de sólidos suspendidos (limos, materia orgánica) en el fondo y orillas, incremento de la microbiota alóctona, contaminación por compuestos tóxicos e inhibitorios, eutrofización por aporte de nitrógeno y fósforo, malos olores y consumo del oxígeno disuelto al descomponerse la materia orgánica (Bitton, 2005), sin duda ocurre una transformación de estos ecosistemas a tal punto de ser incompatibles con la mayoría de formas de vida. No obstante, estas condiciones medioambientales pueden ser aprovechadas por algunos microorganismos como sustrato para su crecimiento de acuerdo a sus necesidades metabólicas.

#### 4.2 EL RÍO PASTO.

El río Pasto, nace hacia el oriente de la ciudad de San Juan de Pasto entre el páramo el Bordoncillo y Tábano por arriba de los 3200 msnm. Se conforma por 18 microcuencas y alcanza una longitud de 58 Km hasta su desembocadura en el río Juanambú (Henaó y Rosero, 1996).

En su nacimiento recibe el nombre de Quebrada Las Tiendas; 8 Km más abajo, a la altura del puente de San Luís, corregimiento de La Laguna, recibe las aguas de la quebrada Agua Pamba y conserva este nombre hasta donde desembocan las quebradas La Chorrera y El Barbero 500 m abajo del puente de San Francisco. Desde aquí, hasta el puente de Buesaquillo en un tramo de aproximadamente 3,5 Km se le conoce como río Negro, el cual recibe las aguas de las quebradas Purgatorio, Tejar (margen izquierdo) y Dolores (margen derecho). Desde Buesaquillo hasta su entrada a la ciudad de San Juan de Pasto se le conoce como río Buesaquillo y finalmente, desde su recorrido por la ciudad hasta su desembocadura en el río Juanambú se le conoce como río Pasto (Burbano *et al.*, 1995).

En la ciudad, el cauce principal del río Pasto recibe las aguas de diez quebradas total o parcialmente canalizadas conocidas como: quebrada Guachucal, Miraflóres, Mijitayo, Rosales, Los Chanchos, El Chilco, Patacones y río Chapal por el margen izquierdo; y las quebradas Cujacal y Blanca por el margen derecho (Burbano *et al.*, 1995).

Durante este recorrido el río Pasto se ha convertido en depósito permanente de toda clase de vertimientos que modifican notoriamente sus características físico-químicas y biológicas transformándolo en una corriente con alta concentración de materia orgánica (Paredes y Vallejo, 1994). Estudios físico-químicos realizados por CORPONARIÑO en el año 2006 (Bastidas, 2006) ponen en evidencia una

reducción significativa del oxígeno disuelto pasando de  $7.15 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  en una estación ubicada en la parte alta de la cuenca a  $1 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  en el sector de torobajo. Así mismo, se observa un importante incremento de los parámetros  $\text{DBO}^5$  y  $\text{DQO}$  pasando de 9.5 y  $19.2 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  respectivamente en la estación El retiro, a 240 y  $304 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  respectivamente, en la estación Torobajo (Tabla 2). Esto indica que debido a los continuos vertimientos de tipo doméstico, agropecuario e industrial, el río Pasto se ha transformado de un ecosistema acuático natural a una corriente altamente poluída, caracterizada por una alta concentración de materia orgánica y bajas concentraciones de oxígeno que llevan al río a un punto próximo a la anoxia. Bajo estas condiciones solo es posible encontrar unas pocas formas de vida especializadas para resistir este tipo de ambientales como bacterias y macro-invertebrados.

Es de destacar que continuando su recorrido hacia la hidroeléctrica Julio Bravo, a las afueras de la ciudad, el río Pasto sufre una recuperación al alcanzar valores de  $6.75 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  de Oxígeno Disuelto y de 87.5 y  $160 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  de  $\text{DBO}^5$  y  $\text{DQO}$  respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización Físico-Química de diferentes sectores del río Pasto realizada por CORPONARIÑO en el año 2006.

Estación	Msnm	Caudal (L/s)	pH	Turbiedad	O.D. ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	$\text{DBO}^5$ ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	$\text{DQO}$ ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )
El Retiro	2949	172	7,65	1,4	6,25	9,5	19,2
El Tambor	2952	449	7,3	4,21	7,15	15,65	16
Estación Centenario	2672	1040	7,36	13,8	6,3	7,6	20,8
Estación Carolina	2582	534	7,31	12,3	4,9	168,75	256
Estación Dos Puentes	2578	2028	7,15	75,9	1,35	228,75	288
Estación Morasurco	2508	2257	7,17	62,8	1,25	243,75	256
Estación UDENAR	2501	2882	7,1	90	1	240	304
Hidroeléctrica Julio Bravo	2272	4461	7,08	36,4	6,75	87,5	160

Fuente: Bastidas, 2006.

### 4.3 COMPOSICION Y TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

La composición de las aguas residuales puede cambiar en diferentes países debido a los hábitos propios de cada región, sin embargo, en términos generales están constituidas por compuestos inorgánicos entre los que se destaca la presencia de calcio (Ca), cloruro (Cl), hierro (Fe), cromo (Cr), nitratos (NO<sub>3</sub>), amoníaco libre, nitrógeno orgánico, nitritos, sulfatos (SO<sub>4</sub>) y zinc (Zn). Así mismo, presenta compuestos orgánicos individuales y agregados como la materia orgánica, la cual contiene sustancias de varios pesos moleculares. Esta materia orgánica se compone de proteínas, carbohidratos, grasas y aceite, no obstante, sus proporciones son variables y pueden estar en el rango de 40 a 60%, 25 a 50%, 8 a 12% o 28%, 31% y 18% respectivamente, lo que pone de manifiesto que la materia orgánica de las aguas residuales es altamente heterogénea (Crites y Tchobanoglous, 2000; Huang *et al.*, 2010). En consecuencia, cuando estas aguas residuales se descargan a las fuentes de agua incrementan los sólidos suspendidos totales, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sup>5</sup>) y demanda química de oxígeno (DQO) (Chan *et al.*, 2009; Vassallo *et al.*, 2009).

Frente a esta problemática, las normas nacionales e internacionales que regulan la descarga de efluentes a los ecosistemas naturales se vuelven cada vez más rigurosas, por esta razón se han desarrollado una serie de procesos que mejoran los sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales (Wijekoon *et al.*, 2011), en este sentido, los primeros intentos en diseñar procesos y plantas de tratamiento para la descontaminación de aguas residuales domésticas, eutrofizadas o receptoras de efluentes industriales, se basaban en el empleo secuencial de métodos físicos y químicos, con el fin de remover principalmente un buen porcentaje de materia orgánica y sólidos suspendidos (Fontúrbel y Ibáñez, 2004; Bitton, 2005).

Actualmente, los tratamientos de descontaminación son más completos y requieren de fuerzas físicas o unidades operacionales que permiten la sedimentación y filtración; procedimientos químicos a través de los cuales se consigue la desinfección, adsorción y precipitación; y procesos biológicos donde los microorganismos juegan un papel muy importante. Los procesos químicos y biológicos se conocen también como unidades de proceso (Madigan *et al.*, 2004; Bitton, 2005; Bravo *et al.*, 2005). En síntesis, un sistema de tratamiento de aguas residuales comprende cuatro etapas (Crites y Tchobanoglous, 2000; Bitton, 2005):

- ✓ Tratamiento preliminar: el objetivo de esta operación es remover todos los elementos más gruesos que se puedan encontrar en el afluente de agua.
- ✓ Tratamiento primario: incluye las unidades operacionales y tiene como propósito remover sólidos y materia orgánica particulada.

- ✓ Tratamiento secundario: hace referencia al proceso de tratamiento biológico que permite principalmente la remoción de nutrientes y materia orgánica.
- ✓ Tratamiento terciario o avanzado: involucra unidades operacionales y las unidades de proceso químicas que tiene como fin remover DBO, nutrientes, patógenos, parásitos y algunas sustancias tóxicas.

De estas alternativas, el tratamiento biológico de aguas residuales parece ser una tecnología promisoría para alcanzar los niveles de reducción de emisiones certificadas, ya que en comparación a otros métodos tiene la ventaja de disminuir costos sin contaminación secundaria (Yoon *et al.*, 2004). Este tipo de procesos puede dividirse en anaerobios, aerobios, o una combinación de ambos (anaerobio-aerobio).

El tratamiento anaerobio puede ser una alternativa viable y costo-efectiva para el tratamiento secundario de aguas residuales debido principalmente a: que sus costos operacionales y de construcción son relativamente bajos, no se requiere oxígeno, la producción de lodos es baja, se obtiene energía en forma de biogás y puede aplicarse en pequeña y gran escala. No obstante, durante periodos de baja temperatura la alta concentración de sólidos suspendidos en las aguas residuales puede tener un efecto negativo sobre el rendimiento del reactor (Lew *et al.*, 2009; Kassab *et al.*, 2010). Además, se ha sugerido que este tipo de tratamientos requiere de un sistema de post-tratamiento para alcanzar los estándares de descarga de aguas residuales para reutilización ya que la remoción de indicadores microbiológicos como coliformes es baja y la concentración de sólidos suspendidos y de materia orgánica del efluente de un sistema anaerobio se reduce significativamente si continua en un sistema aerobio (Kassab *et al.*, 2010).

En los procesos aerobios los residuos orgánicos se convierten en biomasa y CO<sub>2</sub>, sin embargo, existe una mayor generación de lodos en comparación a un sistema anaerobio y la aireación es el factor más costoso en términos de consumo de energía (Sonune y Ghate, 2004; Rahimi *et al.*, 2011). Al respecto, se conoce que la aireación es un importante parámetro de diseño y operación en diferentes sistemas de fermentación para el tratamiento de aguas residuales (Rahimi *et al.*, 2011). En este sentido, Peng *et al.*, (2011) evaluaron la remoción de DQO, nitrógeno amoniacal y fósforo total en un sistema SBEP- BAF (proceso bioecológico secuencial – filtro biológico aireado) para el tratamiento de aguas residuales domésticas usando diferentes concentraciones de flujo de aire y tasas de recirculación. El sistema integrado alcanzó niveles de remoción del 90.61% y concluyeron que la aireación artificial es el factor más importante que limita la eficiencia de purificación. Nhu *et al.*, (2009) probaron tres reactores, el primero con aireación intermitente (IAR), el segundo con aireación continua (CAR) y el tercero un reactor control. Los efectos positivos de la aireación fueron evidentes en la disminución de la materia orgánica y las concentraciones de nitrógeno en los residuos sólidos y en el lixiviado procedente de los reactores IAR y CAR.



Luanmanee *et al.*, (2001) evaluaron el tratamiento de aguas residuales domésticas en un sistema de suelo multicapas (MSL). Proponen que la aireación del sistema podría acelerar la actividad microbiana y mejorar la descomposición del material orgánico; concluyeron que la eficiencia del sistema en remoción de DBO y DQO varía en función de la aireación, el pre-tratamiento y la temperatura.

Los procesos anaerobio-aerobio en secuencia aprovechan las ventajas de los dos sistemas. En comparación con las tecnologías aeróbicas convencionales, la combinación anaerobio-aerobio consume menos energía, produce menos lodos y su operación es menos compleja (Kassab *et al.*, 2010). Para citar algunos ejemplos, un sistema interconectado de reactor UASB (lecho de lodos anaerobio de flujo ascendente) y CSTR (reactor de tanque agitado) presenta una eficiencia en remoción de DQO entre 83 a 98% en un tiempo de retención de 11,54h a 6 días. Si el sistema es UASB y AFB (lecho fluidizado aeróbico) alcanza remociones de DQO del 82% a partir de agua residual sintética y si se trata de un RBC (Contactador biológico rotativo anaerobio) y SBR (reactor batch secuencial) alcanzan una eficiencia del 98% (Chan *et al.*, 2009).

Así mismo, se han establecido reactores integrados donde se realiza la combinación de vías de degradación anaerobia-aerobia en un solo reactor para incrementar la eficiencia de degradación total y disminuir los costos. A pesar que el diseño y operación de estos sistemas aun es limitado se pueden distinguir cuatro tipos de bioreactores anaerobio-aerobio integrados: 1) Bioreactores integrados con separación física de zonas anaerobia-aerobia, 2) Bioreactores integrados sin separación física de zonas anaerobia-aerobia, 3) Reactores batch secuencial (SBR) basados en separación temporal de la fase anaerobia y aerobia y 4) Sistemas de cultivo anaerobio-aerobio combinado basados en el principio de difusión de oxígeno limitada en biofilms microbianos (Chan *et al.*, 2009).

Sin embargo, existen otros procesos para el tratamiento de aguas residuales por ejemplo, Linlin *et al.*, (2011) utilizaron aguas residuales provenientes de la planta de tratamiento Gaobeidian (Beijing); reportaron un 85% de remoción de carbono orgánico disuelto, 94% de cloruro y 99% de sulfato en un sistema complementario de ozonización (O<sub>3</sub>), filtración lenta en arena (SSF) y nanofiltración (NF). Van der Hoek *et al.*, (1999) afirma que la ozonización desintegra las moléculas orgánicas grandes para transformarlas en carbono orgánico fácilmente asimilable y así mejorar la actividad microbiana.

Matilainen *et al.*, (2006) evaluaron la remoción de materia orgánica natural en el proceso de tratamiento de aguas residuales implementado en la planta de tratamiento de Rusko (Finlandia). El tratamiento consiste en adición química de Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, seguido por floculación y clarificación, filtración con carbón activado granular (GAC) y post cloración. En promedio reportan una remoción del 69% de materia orgánica medida en DQO.

Humbert *et al.*, (2008) estudiaron la remoción de materia orgánica natural de aguas residuales obtenidas de la planta de tratamiento Villejean – Rennes (Francia) utilizando carbón activado en polvo (PAC) y resinas de intercambio aniónico (AERs). Encontraron que el carbono orgánico disuelto se redujo en un 75% con las resinas MIEXs e IRA938s, mientras que con PAC solo se redujo el 12%.

#### 4.4 EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Las bacterias debido a su variada habilidad metabólica dirigen el flujo de materia y energía en los ecosistemas mundiales y controlan en gran medida la actividad de la biosfera (Fontúrbel y Ibáñez, 2004; Smith, 2004).

En condiciones naturales, el crecimiento microbiano depende en gran medida de la disponibilidad de recursos (carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, hierro, manganeso, sodio), aceptores de electrones ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}_3^+$ ,  $\text{O}_2$ ), donadores de electrones inorgánicos ( $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ) y de otros factores como: temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno, intensidad de luz y condiciones osmóticas (agua dulce, agua marina, híper salinidad). Es de destacar que bajo las condiciones ambientales adecuadas todo compuesto orgánico natural puede ser degradado y aprovecharse como reserva de carbono y energía por la microbiota nativa o silvestre presente en un ecosistema (Smith, 2004).

La velocidad de crecimiento microbiano en condiciones naturales puede estar muy por debajo de las velocidades máximas que se alcanzan en laboratorio, esto puede darse por la baja disponibilidad de nutrientes y al efecto competitivo con otros microorganismos (Madigan *et al.*, 2004), por lo tanto, la diversidad de comunidades microbianas que se encuentran en un ecosistema pueden disminuir en respuesta a perturbaciones o estrés ambiental, es decir, solo aquellas poblaciones con propiedades específicas pueden persistir dentro de las comunidades (Bastardo *et al.*, 2007).

Cuando un río recibe una descarga considerable de materia orgánica, se genera un incremento en el número de bacterias heterotróficas y se disminuyen los niveles de oxígeno; a medida que se ha consumido la mayor parte de compuestos orgánicos oxidables y los inorgánicos, el nivel de oxígeno se recupera en cantidades próximas previo a la descarga de aguas residuales (Figura 1) (Madigan *et al.*, 2004).

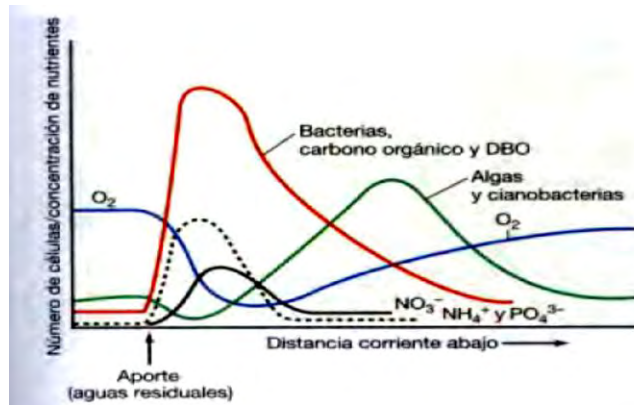


Figura 1. Actividad microbiana durante el proceso de descarga de aguas residuales. Fuente: Madigan *et al.*, 2004.

Diferentes estudios en la bioquímica del metabolismo microbiano indican que en el planeta existen microorganismos capaces de producir o degradar prácticamente cualquier tipo de sustancia natural, por lo tanto, se convierten en una de las principales alternativas para el tratamiento de fuentes de agua y suelos contaminados (Fontúrbel y Ibáñez, 2004). Dado que en estos ambientes, la cantidad de recursos disponibles para los microorganismos puede variar constantemente en un periodo de tiempo, se han desarrollado sistemas bioquímicos de producción de polímeros como material de reserva; es decir, los nutrientes que se encuentran en exceso en el medio se acumulan para ser aprovechados durante las épocas de escasez. Dentro de este tipo de inclusiones celulares se destacan los polisacáridos, el polifosfato y los PHAs (Madigan *et al.*, 2004).

## 4.5 POLIHIDROXIALCANOATOS

4.5.1 Características generales de los PHAs. Los PHAs son poli-ésteres naturales que se acumulan en forma de inclusiones celulares (Figura 2) en una amplia variedad de especies bacterianas como reserva de carbono y energía, genera equivalentes de reducción, brinda protección contra la luz ultravioleta, proporciona resistencia a estrés hídrico o al pH y genera mayor capacidad de competencia (Kadouri *et al.*, 2005; Rehm, 2007; Valappil *et al.*, 2007).

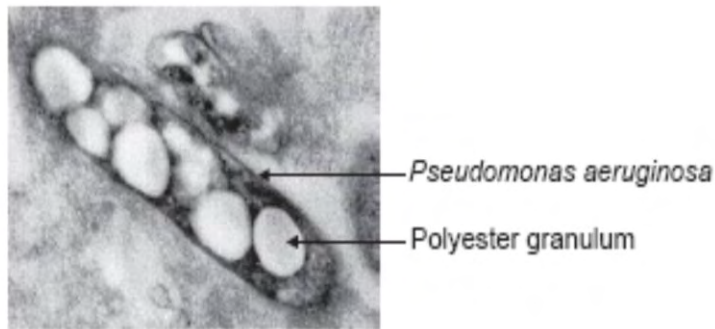


Figura 2. Micrografía de gránulos de PHAs acumulados por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: Rehm, 2007.

Estos biopolímeros tienen un amplio rango de aplicación en la industria, la medicina, la farmacología y la agricultura, puesto que, al contrario de los polímeros convencionales derivados del petróleo como el polipropileno o el polietileno, los PHAs pueden ser sintetizados bioquímicamente desde recursos renovables (Ruiz *et al.*, 2004; Anastassios *et al.*, 2008) y son biodegradables (Figura 3), insolubles en agua, no tóxicos y exhiben propiedades termoplásticas (Llana y Jay, 2003; Rehm, 2007).



Figura 3. Degradación de un cilindro fabricado con poli-3-hidroxicvalerato – co- 3-hidroxi butirato P(3HV-co-3HB). Fuente: Madison y Huisman, 1999.

Los PHAs se sintetizan bajo condiciones de crecimiento no balanceado ocasionado por el déficit de nutrientes como nitrógeno, fósforo y magnesio y exceso en la fuente de carbono principal (Anderson y Dawes, 1990). Bioquímicamente están conformados por monómeros de cadena corta SCL (de 3

a 5 carbonos), media MCL (entre 6 a 16 átomos de carbono) y larga LCL (más de 16 átomos de carbono) (Carminatti *et al.*, 2006). De igual manera, dependiendo del número de unidades monoméricas que lo componen se pueden clasificar como homopolímeros (con un solo tipo de unidad monomérica) y copolímeros (con dos o más unidades monoméricas diferentes) (Valappil *et al.*, 2007). Estas condiciones pueden afectar las características físicas y mecánicas propias de cada polímero (Lee *et al.*, 2000). Se ha reportado que las bacterias pueden almacenar PHAs hasta el 90% del peso seco celular (Anastassios *et al.*, 2008).

Estos polímeros se degradan a nivel intracelular y extracelular por depolimerasas microbianas, algunos autores sostienen que la degradación está influenciada por las propiedades del polímero y la especificidad de la depolimerasa extracelular, así como, por la temperatura, salinidad y pH del medio (Volova *et al.*, 2007).

4.5.2 Rutas metabólicas para la síntesis de PHAs. Como es bien conocido, la Acetil CoA que se forma después de la degradación de los carbohidratos vía Entner – Duderoff (glicólisis) en condiciones normales puede dar inicio a una serie de reacciones de tipo REDOX a través del ciclo de Krebs cuyo objetivo final es la producción de energía; sin embargo, también puede participar en otro tipo de reacciones que llevan a la síntesis de PHAs (Llana y Jay, 2003). En este sentido, se ha reportado que el tipo particular de poliéster acumulado es una característica propia del conjunto de enzimas presentes en cada microorganismo los cuales, se pueden dividir en dos grupos: aquellos que acumulan PHAs por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso y los que acumulan PHAs durante su crecimiento (Rojas *et al.*, 2006).

Como se ilustra en la figura 4 existen varias vías metabólicas a partir de las cuales se puede obtener PHAs así (Llana y Jay, 2003):

- La  $\beta$ -cetotiolasa A cataliza la condensación de dos moléculas de Acetil CoA, formando una molécula de Acetoacetil CoA, la cual es reducida a D (-) 3-hidroxiacetil CoA, por la enzima Cetoacetil CoA reductasa dependiente de NADPH; y finalmente el D (-) 3-hidroxiacetil CoA se polimeriza por acción de la enzima PHA sintasa formándose el homopolímero Polihidroxiacetato (PHA).
- Una molécula de Acetil CoA se une al 3-cetoacetil –ACP que participa en el ciclo de síntesis de ácidos grasos y luego se transforma en (R) – 3-Hidroxiacetil-ACP, el cual por intervención de la enzima (R) – 3-hidroxiacetil ACP: CoA transacetilasa (PhaG) se transforma en R – 3 Hidroxiacetil CoA que posteriormente formará el polímero por acción de la PHA sintasa (PhaC).
- Mediante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos puede suceder que una molécula de Acil CoA producto de la degradación de ácidos grasos se transforme en Trans-

2-Enoil CoA, el cual por medio de la enzima (R) –enoil CoA hidratasa específica (PhaJ), pasa a (R)-3-hidroxiacil-CoA, el cual es polimerizado por acción de la PHA sintasa (PhaC) que finalmente formará el PHAs. Por otro lado, puede que el Trans-2-Enoil CoA continúe el ciclo hasta (S)-3-Hidroxiacil CoA, que formará (R)-3-hidroxiacil-CoA y finalmente el polímero por acción de la PHA sintasa (PhaC). De igual manera, este (S)-3-Hidroxiacil CoA puede continuar el ciclo hasta 3-cetoacil CoA, el cual puede transformarse en (R)-3-hidroxiacil-CoA por la enzima (R) – 3 – cetoacil-CoA reductasa (PhaB), a partir del cual mediante acción de la PHA sintasa (PhaC) se obtiene el polímero.

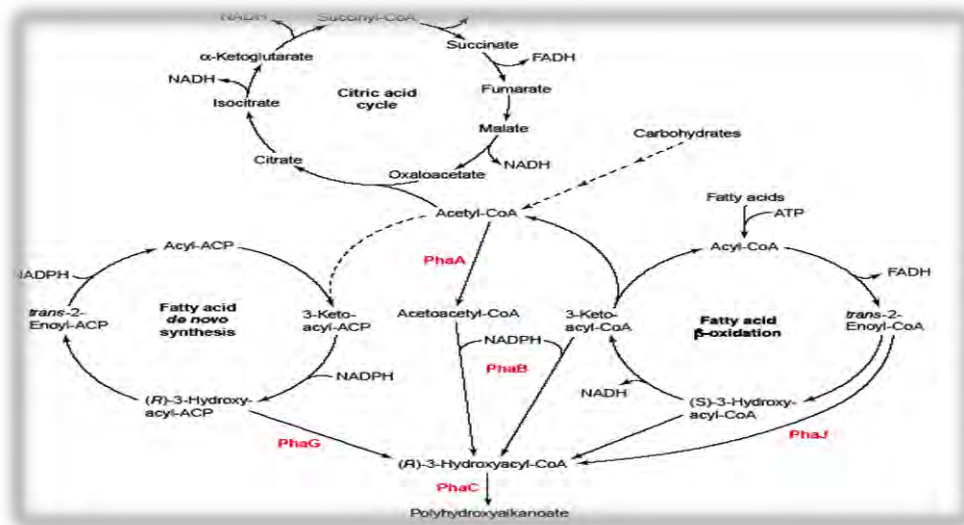


Figura 4. Biosíntesis de PHAs en el contexto del metabolismo microbiano. Las enzimas más importantes se muestran en rojo: 3-cetotiolasa (PhaA); (R) – 3 – cetoacil-CoA reductasa (PhaB) (acetoacetyl-CoA reductasa para la biosíntesis de PHB); PHA sintasa o polimerasa (PhaC); (R) – 3-hidroxiacetyl ACP: CoA transacilasa (PhaG); (R) –enoil CoA hidratasa específica (PhaJ). Fuente: Llana y Jay, 2003.

Por otra parte, Valappil *et al.*, (2007), propone una ruta putativa de síntesis de copolímeros en bacterias Gram positivas a partir de precursores del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En esta ruta el piruvato formado durante la degradación de la glucosa vía Entner Doudoroff es convertido a Acetyl CoA que continúa el ciclo de los ácidos tricarboxílicos hasta succinil CoA; este compuesto vía metilmalonil CoA es convertido a propionil CoA por acción de la enzima metilmalonil CoA mutasa, epimerasa o descarboxilasa; sin embargo, hasta ahora solo la enzima metilmalonil CoA epimerasa ha sido detectada en *Bacillus cereus*, *Nocardia corolina* y *Rhodococcus ruber*. El propionil CoA se condensa con una molécula de acetyl CoA (por la enzima 3 cetoacil CoA tiolasa) formando 3 cetovaleril CoA que

es reducido a (R)-3-Hidroxivaleril CoA por la enzima acetoacetyl CoA reductasa suministrando el monómero 3HV para la síntesis del polímero. Alternativamente la enzima succinil semialdehido deshidrogenasa puede reducir el succinil CoA para formar succinil semialdehido, el cual es reducido al monómero 4HB por una 4-hidroxibutirato deshidrogenasa. Estos monómeros al igual que el 3HB sintetizado de la misma forma descrita por Llana y Jay, (2003) se polimerizan por acción de una PHA sintasa y dan lugar a la formación de los copolímeros: poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-4-hidroxibutirato P(3HB-co-3HV-co-4HB), poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) y poli-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato P(3HB-co-4HB) (Figura 5).

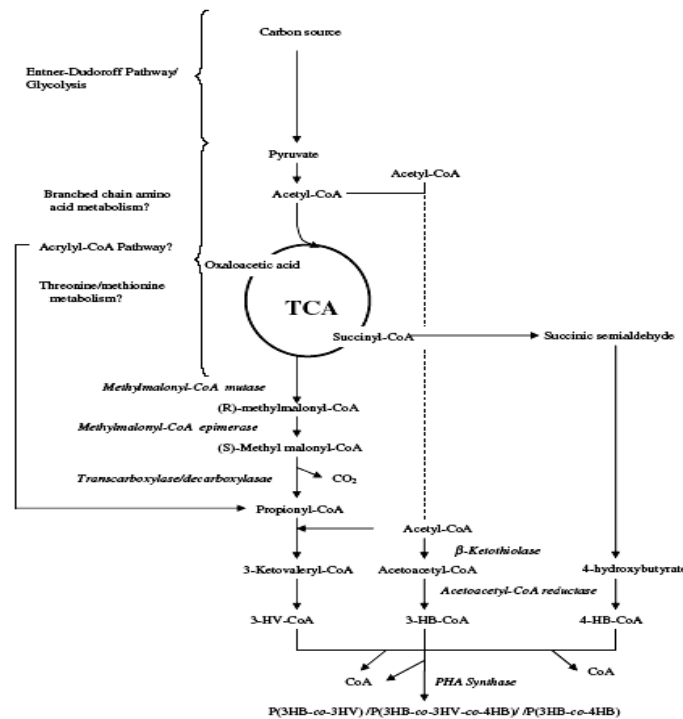


Figura 5. Síntesis de los copolímeros P(3HB-co-3HV-co-4HB), P(3HB-co-3HV) y P(3HB-co-4HB) en bacterias Gram positivas. Fuente: Valappil *et al.*, 2007.

4.5.3 Polihidroxicanoatos acumulados a partir de muestras ambientales. Las concentraciones naturales de PHAs son significativamente bajas; sin embargo, la biota de muestras ambientales puede ser inducida para mejorar significativamente la producción (Foster *et al.*, 2001), dentro de este grupo de microorganismos se destacan algunas bacterias Gram negativas (las más utilizadas a escala industrial) como *Wautersia eutropha*, *Methylobacterium organophyllum*, *Pseudomonas oleovorans* y recombinantes de *Escherichia coli*, entre otras; no obstante estos biopolímeros también se han reportado en bacterias Gram positivas de los géneros *Bacillus* (*B. mycoides*, *B. cereus* y *B. megaterium*), *Clostridium*,

*Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Valappil *et al.*, 2007).

Hacia 1983 Findley y White especulan que los PHAs pueden utilizarse como indicadores para concluir acerca de la historia nutritiva de las muestras ambientales.

Satoh *et al.*, (1994) investigaron los mecanismos de consumo de acetato, propionato y lactato en el lodo obtenido de un proceso anaerobio-aerobio de remoción de fósforo, reportan que estos sustratos se pueden acumular en los lodos en forma de PHAs compuestos de 3-hidroxi-2-metilbutirato (3HMB), 3-hidroxi-2-metilvalerato (3H2MV), y 3-hidroxi-2-metilvalerato (3H2MV).

Foster *et al.*, (2001) estudiaron la concentración de PHAs desde una variedad de ambientes y discutieron la posibilidad de utilizar estos biopolímeros como indicadores preliminares de la calidad ambiental. Dentro de sus resultados encontraron que aquellas muestras que se tomaron de sitios aparentemente no contaminados caracterizados por actividades agrícolas o vegetación nativa alcanzaron concentraciones de 0,12 a 0,4 mg de PHAs/g de muestra, mientras que las muestras tomadas de sitios impactados por actividad antrópica alcanzaron concentraciones de 14 a 40 veces más altas de PHAs (Figura 6). Estos resultados sugieren que el estrés ambiental generado en ambientes contaminados puede promover la acumulación de PHAs.

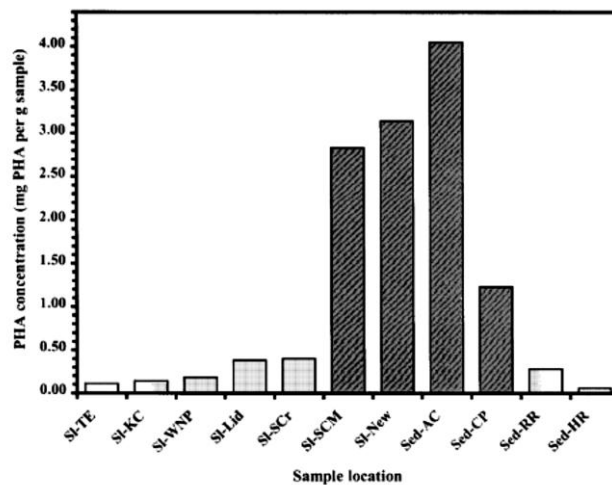


Figura 6. Comparación de la concentración de PHAs ( $\text{mg g}^{-1}$ ) de muestras tomadas en ambientes no contaminados (blanco) y muestras de ambientes contaminados (Negro). Fuente: Foster *et al.*, 2001.



Usman *et al.*, (2007) aislaron 9 cepas bacterianas de ambientes contaminados con malazas y aguas residuales, las cuales tenían la capacidad de acumular PHAs a diferentes niveles (Figura 7).

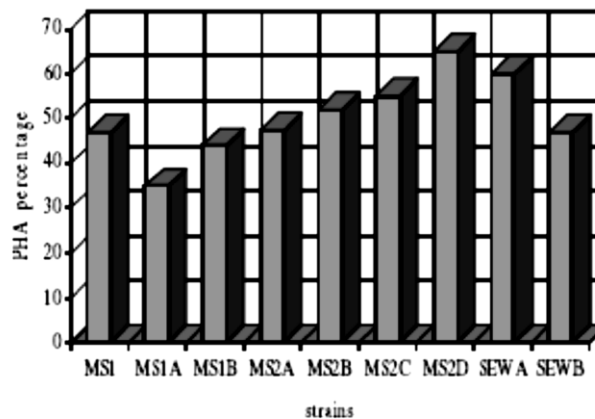


Figura 7. Porcentaje de PHAs acumulado en cepas bacterianas aisladas de ambientes contaminados con malaza (MS) y aguas residuales (SEW) después de 72h a 37°C. Fuente: Usman *et al.*, 2007.

4.5.4 Sistemas usados para la remoción de materia orgánica de aguas residuales con bacterias productoras de PHAs. La remoción de materia orgánica en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, a menudo se explica por los procesos de asimilación y no asimilación que realizan los microorganismos en lodos activados; sin embargo, una porción de esa materia orgánica absorbida por las bacterias es almacenada como material de reserva de carbono temporal al interior celular; el más conocido de estos materiales de reserva en los procesos de lodos activados son los PHAs. No obstante, en contraste al reconocimiento de los procesos de acumulación de PHAs, su contribución para la remoción de materia orgánica biodegradable no es bien entendida aun (Osihiki *et al.*, 2008).

Ntaikou *et al.*, (2009) obtuvieron polihidroxibutirato mediante el tratamiento microbiológico de aguas residuales del molido de aceite de oliva para la producción combinada de biohidrógeno y biopolímeros. Estas aguas residuales se caracterizan por su turbidez, pH ácido y tienen una alta carga orgánica que presenta baja biodegradabilidad debido a la presencia de compuestos inhibitorios como fenoles, lo cual dificulta el tratamiento biológico directo. El sistema implementado consto de dos bioreactores diferentes: la producción de hidrogeno y ácidos grasos volátiles se realizo vía degradación anaeróbica en un reactor CSRT, subsecuentemente, el agua residual acidificada se utilizó como sustrato para la producción del polímero biodegradable en un bioreactor tipo SBR.

Arcos y Vargas, (2006) proponen un sistema integral para la degradación de aguas residuales y producción de PHAs. El sistema consiste en un prototipo experimental compuesto por un reactor discontinuo secuencial (SBR) y un reactor Batch conectados en línea. El reactor SBR contiene los lodos de recirculación del sedimentador secundario al tanque de aeración de una planta de tratamiento de agua residual de lodos activados. Estos lodos se alimentan de desechos orgánicos que son degradados hasta ácidos grasos volátiles (acético, láctico y propiónico) en un fermentador. En el reactor batch, al cultivo purgado del SBR se le harán ligeras modificaciones en la alimentación para lograr la máxima acumulación posible de PHAs y la inhibición de cualquier actividad para evitar degradación del polímero (Figura 8).

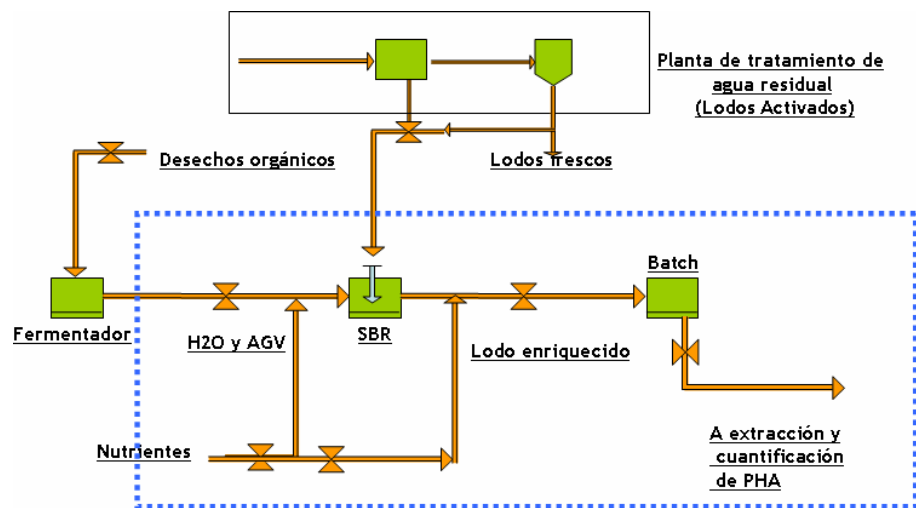


Figura 8. Sistema integral de producción de PHAs a partir de lodos de desecho de una planta de tratamiento de aguas residuales. Fuente: Arcos y Vargas, 2006.

Arcos y Vargas, (2006) comprobaron que cultivos mixtos de cualquier planta de lodos activados pueden producir PHAs utilizando la estrategia de alimentación correcta y concluyen que esta estrategia representaría una gran ventaja ya que implicaría la obtención de PHAs a partir de un sustrato barato.

Bengtsson *et al.*, (2008) plantean un sistema en tres etapas para la producción de PHAs desde aguas residuales de una industria de papel: primero, una fermentación acidogénica para la conversión de materia orgánica a ácidos grasos volátiles, luego, se aplica un sistema de flujo continuo con lodos activados para incrementar los organismos productores de PHAs y finalmente, se realizan experimentos Batch para acumular PHAs por exceso de lodos desde la etapa de enriquecimiento (Figura 9). Las tres etapas del proceso mostraron un potencial para producir 0,11kg de PHAs por Kg de carbono orgánico disuelto en el influente.

Es de destacar que la composición de los ácidos grasos volátiles puede influir en las características físicas y mecánicas del polímero.

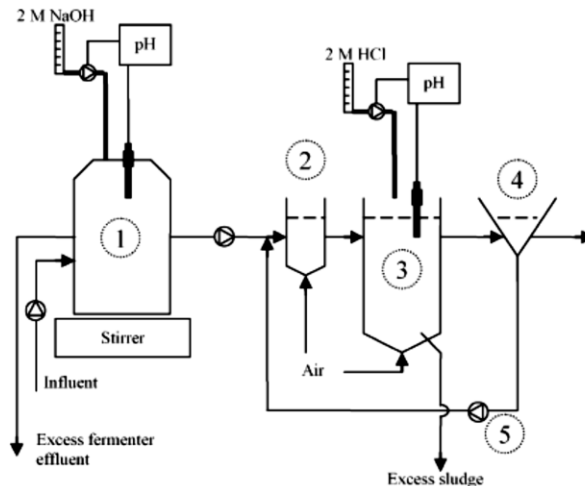


Figura 9. Sistema en tres etapas para la producción de PHAs desde aguas residuales de una industria de papel. 1) Fermentación acidogénica; 2) reactor de 125L, selector; 3) reactor principal de 2L; 4) clarificador; 5) bomba de retorno de los lodos. Fuente: Bengtsson *et al.*, 2008.

#### 4.6 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA.

Los métodos de laboratorio tradicionales para identificar bacterias incluyen las pruebas de diferenciación por tinciones, como la tinción de Gram, el crecimiento en cultivos enriquecidos o diferenciales y el uso de kits de pruebas bioquímicas (Xua *et al.*, 2004). No obstante, actualmente se dispone de una serie de técnicas que permiten la caracterización e identificación de especies utilizando marcadores moleculares, como por ejemplo, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic ADN-PCR); AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism); Microsatélites; Microarrays, y la secuenciación de genes ribosomales (16S rRNA) entre otros (Baruzzi *et al.*, 2006; Trevors *et al.*, 2004).

El 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 n t, codificado por el gen *r r s*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Esta macromolécula se utiliza ampliamente en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana desde la propuesta de Carl Woese a principios de la década de 1970 (Wang y Qian 2009; Rodicio y Mendoza, 2004)

El gen 16S DNA ribosomal contiene información que lo hace un excelente marcador de microorganismos ya que posee regiones altamente conservadas encontradas en todos los organismos y regiones variables que son únicas de organismos particulares o grupos de organismos relacionados (Ros *et al.*, 2008), la utilidad de esta secuencia ha redefinido completamente relaciones filogenéticas previamente dependientes del metabolismo celular (Janssen, 2006).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo se efectuó en dos etapas, primero, una fase de campo en la cual se realizó la colecta de muestras de agua en diferentes trayectos del río Pasto y en el colector Juan 23 de aguas residuales; luego, una fase de laboratorio donde se desarrollaron una serie de experimentos con el fin de aislar bacterias productoras de PHAs, evaluar la producción de PHAs por las bacterias seleccionadas, caracterizar el aislamiento que presentó la mayor producción de PHAs y determinar el efecto de factores nutricionales y operacionales en la remoción de materia orgánica de las aguas vertidas al río Pasto utilizando como inóculo adicional el aislamiento caracterizado.

### 5.1 DISEÑO DE MUESTREO PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs.

5.1.1 Área de muestreo. Para el desarrollo de este estudio se ubicaron cinco estaciones de muestreo en el cauce principal del río Pasto cuando este hace su recorrido por la ciudad en sentido Oriente – Norte. La ubicación de las estaciones se realizó teniendo en cuenta condiciones de accesibilidad y se buscaron sitios estratégicos con el fin de cubrir todo el recorrido que hace el río Pasto por la ciudad. De esta manera la estación Carolina (E1) se ubicó en el oriente por donde ingresa el río a la ciudad; la estación Los Dos Puentes (E2) correspondió al sector conocido como Los Dos Puentes, cerca de este sitio se encuentra una plaza de mercado; la estación Avenida los estudiante (E3) se ubicó en la Avenida los estudiantes, cerca de este punto se encuentran un hospital, canteras, porquerizas y empresas públicas de la ciudad como CEDENAR. La estación Pandiaco (E4) y la estación Torobajo (E5) se ubicaron en el sector de Torobajo hacia el norte de la ciudad, este sector se caracteriza principalmente por ser una zona de alta industrialización para el curtido del cuero, además, en sus alrededores se encuentra la zona universitaria de la ciudad. En la figura 10 se indica la ubicación de las diferentes estaciones en el cauce principal del río Pasto con sus respectivas coordenadas geográficas.

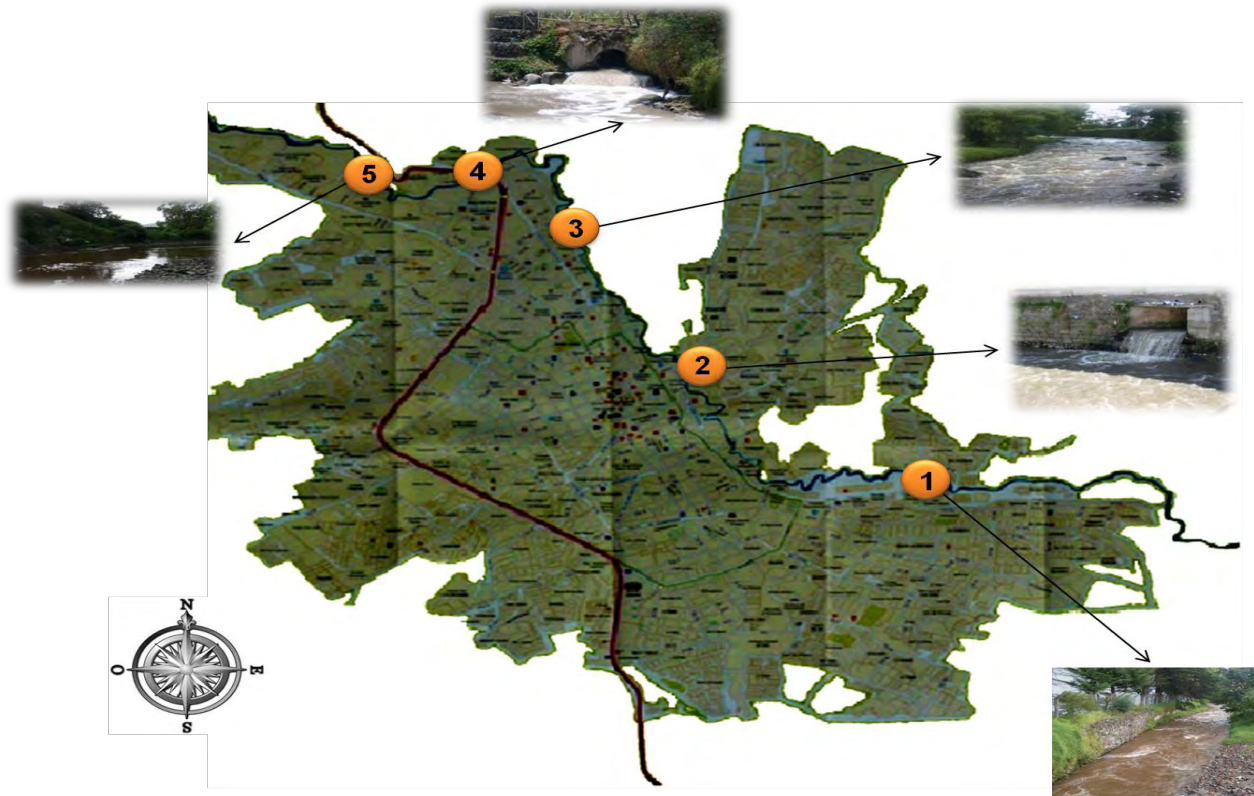


Figura 10. Ubicación de estaciones de muestreo en el trayecto del río Pasto por la ciudad de San Juan de Pasto. (1): La Carolina, N:  $01^{\circ}12' 32,7''$ , W:  $077^{\circ}15' 50,8''$ . (2): Los Dos Puentes, N:  $01^{\circ}13' 16''$ , W:  $077^{\circ}16' 44,5''$ . (3): Avenida los estudiantes, N:  $01^{\circ}13' 47,7''$ , W:  $077^{\circ}17' 4,1''$  (4): Pandiaco, N:  $01^{\circ}14' 5,1''$ , W:  $077^{\circ}17' 35,9''$  y (5): Torobajo, N:  $01^{\circ}14'6,3''$ , W:  $077^{\circ}17' 41,4''$ . Fuente: Gobernación de Nariño, Oficina Departamental de turismo. 2007.

5.1.2 Muestreo. En cada sitio de muestreo se definieron parcelas de cinco metros de longitud con un ancho determinado por el cauce del río. Se colectó una muestra compuesta, superficial y en puntos al azar hasta conformar cinco réplicas cada una con litro y medio de agua (Mostacedo y Fredericksen, 2000; APHA, AWWA y WEF, 2005) (Figura 11). Las muestras se refrigeraron a 4°C, se llevaron al laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño en un tiempo no mayor a 60 minutos y se procesaron inmediatamente.



Figura 11. Ubicación de las parcelas en el cauce del río Pasto para obtener una muestra compuesta con cinco réplicas por estación. Foto: Otero, I. Fuente: Este estudio

## 5.2 VALORACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHAs POR BACTERIAS SILVESTRES AISLADAS DEL RÍO PASTO.

5.2.1 Aislamiento presuntivo de bacterias acumuladoras de PHAs presentes en el río Pasto. Para el aislamiento presuntivo de los microorganismos acumuladores de PHAs a partir de las muestras de agua del río Pasto se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$ ; de cada dilución se tomó 0,1 mL y se inoculó en cajas de Agar Plate Count suplementado con glucosa  $15 \text{ g L}^{-1}$  y Nilo Azul A (ALDRICH CHEM) al 0,1% preparado en acetona (Fernández *et al.*, 2006). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se llevaron a incubación por un periodo de 72h a temperatura ambiente.

La detección presuntiva de bacterias acumuladoras de PHAs se evaluó cada 24 horas mediante observación de los cultivos en placas de petri bajo luz ultravioleta por un periodo de tiempo aproximado de 1 minuto, la longitud de onda utilizada fue de 365nm en el equipo Benchtop 3UV Transilluminator y la distancia a la que se observaron los cultivos fue de 37cm de acuerdo a las especificaciones del equipo. Las colonias que presentaron fluorescencia rosada y naranja con borde rojo se seleccionaron como positivas para la síntesis del polímero (Ostle y Holt, 1982; Spiekermann *et al.*, 1999). Posteriormente, se realizó recuento de colonias totales y las colonias Nilo Azul A positivas.

Las colonias seleccionadas como Nilo Azul A positivas se purificaron en agar nutriente y se conservaron a -20°C en caldos con glicerol y a temperatura ambiente en tubos de ensayo con agar nutritivo inclinado (Tortora *et al.*, 2010). Posteriormente, se les realizó la caracterización fenotípica en agar nutriente a través de la descripción de atributos culturales como: forma, margen, elevación, superficie, textura o consistencia, propiedad óptica, tamaño, configuración y color. Así mismo, se realizó una descripción microscópica por respuesta a la tinción de Gram teniendo en cuenta la forma y agrupación celular (Koneman *et al.*, 1997; Benson, 2001; Pérez y Mota, 2006; Díaz, 2009).

5.2.2 Pre-selección de aislamientos acumuladores de PHAs según la tinción con Negro Sudan B. Los aislamientos Nilo Azul A positivos se sometieron a una fermentación tipo Batch a 30°C y 100 rpm con el fin de determinar en qué fase del crecimiento se inicia la formación de gránulos intracelulares. La fermentación se realizó en erlenmeyers de 250 mL con 90 mL de caldo base constituido por glucosa 15 g L<sup>-1</sup>, peptona bacteriológica 2.5 g L<sup>-1</sup> y extracto de levadura 2,5 g L<sup>-1</sup> (Fernández *et al.*, 2006). Se utilizó un inóculo al 10% de 24h de incubación a 30°C y previamente activado. Cada 6h de fermentación se midió biomasa por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR 2010, así mismo, para determinar la presencia de gránulo en los aislamientos evaluados se realizó la tinción de placas con Negro Sudan B (MERCK) para lo cual se tomó 100 µL de caldo de fermentación y se fijo por calor en portaobjetos, posteriormente, se cubrió el extendido con Negro Sudan B (MERCK) al 0,1% (preparado en n-Butanol y etilen glicol) por 15 minutos, se lavó con agua destilada y se agregó safranina como colorante de contraste por 1 minuto, nuevamente se lavó con agua destilada, se secó y se observó al microscopio en objetivo de 100X (Akar *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que en el tercer objetivo de esta investigación se implementaría un bioreactor operado bajo un sistema de fermentación continua, se seleccionaron aquellos aislamientos en los cuales fue posible observar gránulos intracelulares en la fase de crecimiento exponencial para continuar con las siguientes etapas de esta investigación.



5.2.3 Producción de PHAs en un medio sintético. Los aislamientos pre-seleccionados en el Ítem 5.2.2 se sometieron a una fermentación tipo batch para evaluar la producción de PHAs en caldo base (Fernández *et al.*, 2006); la fermentación tuvo un tiempo de duración de 84h y se aplicó un diseño experimental de bloques al azar con tres réplicas por aislamiento (Segura, 2000).

Las unidades experimentales fueron balones de 500 mL con 250 mL de caldo base (Fernández *et al.*, 2006) y se utilizó un inóculo al 10% de los aislamientos bacterianos seleccionados. Posteriormente, los balones se llevaron a incubación a 30°C y 100 rpm en un shaker termostatado marca DiES. Como variables de respuesta se midieron biomasa por espectrofotometría y producción de PHAs según la metodología estandarizada en el laboratorio de biotecnología microbiana modificando el tiempo y la temperatura de exposición de las muestras en baño maría.

Para cuantificar biomasa se tomo 1 mL de muestra y se midió absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro marca JENWAY Genova. De igual manera, para cuantificar la producción de polímero se tomaron 10 mL de muestra y se centrifugaron a 6461 g por 5 minutos, el *pellet* se resuspendió en 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% y EDTA 10 mM, se llevó a baño maría por 1 hora y 15 minutos a 60°C, posteriormente, se centrifugó a 6461 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizaron lavados sucesivos con 1 mL de agua destilada, 1 mL de acetona y 1 mL de metanol frío; después de cada lavado se realizaron centrifugaciones a 6461 g por 5 minutos y finalmente el polímero obtenido se llevó a secar hasta peso constante.

El aislamiento que presentó la mejor producción de PHAs se seleccionó para las siguientes etapas de esta investigación.

5.2.3.1 Caracterización del polímero acumulado por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). El polímero obtenido a partir del aislamiento que presentó la mejor producción en  $\text{g L}^{-1}$  de PHAs se diluyó en 1 mL de cloroformo (grado HPLC) y 1 mL de agente derivatizante metanol: ácido sulfúrico (85:15 v/v). Esta mezcla se sometió por dos horas a 90°C; se enfrió rápidamente y se adicionó 1 mL de NaCl al 0,1%; finalmente, se eliminó la fase acuosa (fase superior) y se adicionó sulfato de sodio anhídrido puro (SIGMA) para deshidratar completamente la muestra (Braunegg *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2006).

El análisis de cromatografía de gases se realizó en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño, para esto, se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica en el cromatógrafo de gases GCMS – QP5000 Shimadzu, equipado con una columna capilar de sílica fundida MDNS de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película. El inyector y el detector de temperaturas de

flama ionizante se configuraron a 250°C. El programa de temperatura fue de 60°C durante 2 minutos incrementándose 6°C por minuto hasta un máximo de temperatura de 220°C (Fernández *et al.*, 2006).

Por otra parte, para el análisis de masas las muestras se enviaron a los laboratorios de ASINAL LTDA donde se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) marca Trace GC y Trace DSQ dotado con un auto inyector AI 3000 de *ThermoFinnigan*. Los perfiles cromatográficos se obtuvieron con una columna capilar RTX-5MS y los compuestos se identificaron comparándolos con la base de datos NIST.

### 5.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE LA SECUENCIA DEL GEN 16S rRNA DEL AISLAMIENTO BACTERIANO QUE PRESENTO LA MAYOR ACUMULACIÓN DE PHAs.

5.3.1 Extracción de DNA del aislamiento bacteriano seleccionado. Para la extracción de DNA bacteriano se aplicó el protocolo de Rivera *et al.*, (1995) modificando las gravedades (g) en la centrifugación así: inicialmente, se inoculó una colonia en 25mL de caldo Luria Bertani (LB) el cual se llevó a incubación por 24 horas; después de este tiempo se realizó una centrifugación a 6461 g por 10 minutos, el *pellet* celular se trató con 2,4 mL de tampón TE 1 M, los tubos se mantuvieron en hielo y posteriormente se les adicionó 62,5 µL de SDS al 10% y 6,25 µL de proteinasa K en una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, se agitó suavemente y se llevó a baño maría por 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se colocaron nuevamente los tubos sobre hielo y se les adicionó 300 µL de NaCl 5 M, 188 µL de CTAB 10%, se agitó vigorosamente y se llevó a baño maría por 20 minutos a 65°C. Después de este tiempo, se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente para agregarles igual volumen de cloroformo - alcohol isoamilico (24:1). Se centrifugó a 6461 g por 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se le agregó 3 µL de RNasa (10 mg mL<sup>-1</sup>), se incubó por 1 hora a 37°C. Después de este tiempo se adicionó igual volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 6461 g por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó el DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol frío, se dejó a -20°C *over night*, se centrifugó nuevamente a 6461 g por 20 minutos, el *pellet* obtenido se lavó con 200 µL de etanol, se centrifugó nuevamente a 6461 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente por 12h. Finalmente se resuspendió el DNA en 500 µL de TE 1 M (Souza *et al.*, 2012). Todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Para verificar la integridad del DNA extraído fueron preparados geles de agarosa al 1% a los cuales se les adicionó 1µL de eZ- visión, 1µL de azul de bromofenol, 2 µL de TE y 2 µL de DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de tamaño molecular se utilizó lambda Hind III y las condiciones de corrida fueron 60V, 73mA, 37w por 2 horas y 15 minutos (Gómez y Concha, 2012). El gel fue visualizado en

el foto-documentador Benchtop 3UV Transilluminator a una longitud de onda de 302nm.

5.3.2 Cuantificación de DNA por espectrofotometría. Para cuantificar el DNA por espectrofotometría inicialmente se realizó una dilución 1/1000 para lo cual se tomó 1  $\mu\text{L}$  de muestra de DNA y 999  $\mu\text{L}$  de buffer TE, se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3h y se procedió a medir absorbancia en el espectrofotómetro marca JENWAY Genova a través de la opción DNA/RNA 260/280. Posteriormente, para determinar la concentración de DNA en  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  se aplicó la siguiente fórmula (Sambrook *et al.*, 1989):

$$\text{ADN ng } \mu\text{L}^{-1} = 50 * \text{DO (260nm)} * \text{FD}$$

Donde:

50: constante de la concentración de DNA duplafita o doble cadena cuando la densidad óptica a 260 nm es = 1.

DO (260): es la densidad óptica a 260 nm

FD: factor de dilución.

La concentración obtenida fue la solución stock de la muestra de DNA la cual fue conservada a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación se procedió a preparar la solución de trabajo a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

5.3.3 Amplificación del gen 16S rRNA. Para la amplificación del gen 16S rRNA se realizó un ensayo previo para la estandarización de la técnica. En este estudio piloto se utilizaron muestras de DNA ajustadas a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de las bacterias *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Escherichia coli*; *Escherichia coli ATCC 13076*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas putida*; *Vibrio sp*; *Vibrio cholerae RC 25*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Salmonella sp.*; *Bacillus subtilis*; *Listeria sp.*; *Candida sp.*; *Listeria innocua*; y *Proteus sp.*

Para la reacción de PCR se utilizaron los primers 27F 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' (Lane, 1991) y 1041R 5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3' (Nubel *et al.*, 1996) los cuales amplifican un fragmento aproximado de 1500 pb. El volumen de PCR por reacción fue de 50  $\mu\text{L}$  distribuidos de la siguiente manera: buffer [5 x] Gotaq 10  $\mu\text{L}$  (PROMEGA), DNTPs [2,5 mM] 1  $\mu\text{L}$  (PROMEGA),  $\text{MgCl}_2$  [25 mM] 1,5  $\mu\text{L}$  (PROMEGA), primer 27F [20  $\mu\text{M}$ ] 1  $\mu\text{L}$ , primer 1041R [20  $\mu\text{M}$ ] 1  $\mu\text{L}$ , agua miliq 34,1  $\mu\text{L}$ , Gotaq polimerasa 0,4  $\mu\text{L}$  (PROMEGA) y DNA 1  $\mu\text{L}$  a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Finalmente, la PCR se realizó en un termociclador marca Labnet MULTIGENE, modelo Multigene Gradient con las siguientes condiciones de corrida:  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos; 30 ciclos de:  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos,  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto y  $72^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos y una extensión final de 10 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  (Souza *et al.*, 2012). Estas condiciones

se aplicaron tanto para el ensayo piloto como para el aislamiento seleccionado en esta investigación.

Los amplicones fueron corridos en un gel de agarosa 1%, por 2 horas y 15 minutos a 60 V, 73 mA, 37 w (Gómez y Concha, 2012), en cada pozo se adicionó 1  $\mu$ L de eZ- visión, 1  $\mu$ L de azul de bromofenol y 2  $\mu$ L de amplificado (Sambrook *et al.*, 1989). Los fragmentos visualizados fueron comparados con el marcador de tamaño molecular 1kb Ladder marca PROMEGA para verificar el tamaño esperado del amplicon (aproximadamente 1500pb).

5.3.4 Secuenciación y edición de secuencias. Los amplificados obtenidos se enviaron a la compañía MACROGEN (Corea) para su secuenciación. Esta empresa utiliza el método de Sanger con terminadores BigDye, las reacciones de secuenciación se realizan en un termociclador Engine Tetrad 2 (BIO-RAD), los productos se purifican por precipitación etanólica y se inyectan para electroforesis en un secuenciador automatizado ABI3730XL (Gómez y Concha, 2012).

Una vez obtenidas las secuencias se visualizaron en el programa Chromas lite versión 2.01. Cada secuencia fue verificada en su totalidad y se descartaron las que presentaron ruidos por contaminación, por falta de purificación o errores de traqueado propios del secuenciador utilizado en el proceso de secuenciación por MACROGEN. Teniendo en cuenta que se utilizaron dos primers (27F y 1041R) por cada muestra se generaron dos secuencias que permitirían trabajar con complemento reverso, sin embargo, se utilizó la secuencia del primer que mejor calidad presentó en su cromatograma. Posteriormente, la secuencia seleccionada fue editada, es decir, se procedió a recorrer la totalidad de la secuencia para corroborar que las bases correspondan a los picos de detección, también se verificaron aquellas bases asignadas como N y, cuando el pico no tenía su base correspondiente le fue asignada. Como es recomendado por algunos autores, se cortaron las caudas (colas de la secuencia) en el programa BioEdit versión 7.0.4 para obtener mayor fiabilidad de los resultados cuando fueron comparados en los bancos de datos (Altschul *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012).

5.3.5. Comparación con las bases de datos Ribosomal Database Project y GenBank. Para comparar la secuencia parcial final obtenida después del proceso de edición en la base de datos Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) se ingresó al link *Classifier* y se cargo el archivo que se guardo en BioEdit con la secuencia de interés, se dio la opción *Submit*, se obtuvo una información preliminar de la secuenciación pero esta no fue tomada como resultado final, por lo cual se procedió a ingresar en el link *Seqmatch*, aquí se cargo nuevamente la secuencia que se guardo en BioEdit y se seleccionaron las opciones: *Strain (Both)*, *Source (Both)*, *Size (>1200)*, *Quality (Good)*, *Taxonomy (Nomenclatural)*, *KNN Matches (5)*. Una vez hecho esto se dio la opción *Submit*.

Finalmente se seleccionó la opción *Show printer friendly results* para visualizar el resultado de acuerdo con el número de KNN Matches escogido (Cole *et al.*, 2009).

Por otra parte, para comparar la secuencia parcial final obtenida después del proceso de edición en la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) se ingresó en la opción BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) específicamente nucleotide blast, se cargó la secuencia editada en formato fasta, se seleccionó *nucleotide collection (nr/nt)*, *Highly similar sequences (megablast)* y finalmente se aplicó la opción BLAST para visualizar el resultado (Altschul *et al.*, 1990).

#### 5.4 EFECTO DE FACTORES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES EN LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DE LAS AGUAS RESIDUALES VERTIDAS AL RÍO PASTO POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs.

5.4.1 Diseño experimental. Se aplicó el diseño experimental Plackett-Burman  $2^8 \cdot 3$ , con 12 corridas y 3 puntos centrales, teniendo en cuenta 6 factores nutricionales: nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), fósforo ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), potasio (KCl), sulfatos ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) y 2 factores operacionales aireación (medido en VVM) y tiempo de retención hidráulico (TRH)) (Tabla 3). Los factores nutricionales se definieron teniendo en cuenta estudios previos realizados por el grupo de Biotecnología Microbiana en el Departamento de Nariño (Otero y Fernández, 2008; Fernández y Bravo, 2009); estos nutrientes se adicionaron en 2 niveles a partir de una solución madre al 0,01% (Tabla 4). Como variables de respuesta se tuvo en cuenta el porcentaje de remoción de materia orgánica y la producción de PHAs.

Tabla 3. Diseño experimental Plackett-Burman

Tratamiento	Factores								Variables de respuesta			
	NH <sub>4</sub> Cl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	TRH h	VVM min <sup>-1</sup>	% de Remoción de Materia Orgánica	PHAs g L <sup>-1</sup>		
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1				
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1				
3	1	1	1	-1	1	1	-1	1				
4	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1				
5	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1				
6	-1	1	1	1	-1	1	1	-1				
7	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1				
8	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1				
9	-1	-1	1	1	1	-1	1	1				
10	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1				
11	1	1	-1	1	1	-1	1	-1				
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1				
13	0	0	0	0	0	0	0	0				
14	0	0	0	0	0	0	0	0				
15	0	0	0	0	0	0	0	0				

Fuente: este estudio

Tabla 4. Niveles por factor empleados en el sistema de fermentación continua de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman.

NIVEL	FACTORES NUTRICIONALES (ml h <sup>-1</sup> )						FACTORES OPERACIONALES	
	NH <sub>4</sub> Cl	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ZnCl <sub>2</sub>	VVM min <sup>-1</sup>	TRH
0	25	15	5	5	5	0,83	0,1	12
-1	33	20	6,66	6,66	6,66	1,11	0,075	9
1	20	12	4	4	4	0,66	0,125	15

Fuente: este estudio

5.4.2 Construcción de bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua. Para el cumplimiento del tercer objetivo de esta investigación teniendo en cuenta las características del diseño experimental se construyeron 8 bioreactores de flujo ascendente operados en un sistema de fermentación continua. Cada uno de los bioreactores tenían 60 cm de alto, un

volumen total de 5,5 L y volumen efectivo de 2 L, el área fue de 96,769 cm<sup>2</sup> y la altura del líquido fue de 20,66 cm (Doran, 1995; Rittmann y McCarty, 2001). También se contó con 2 alimentadores de agua residual doméstica de 12 L (cada uno para 4 bioreactores), 8 mezcladores de nutrientes y agua residual (1 para cada reactor), 8 sedimentadores y 8 colectores finales. Además se implementaron recipientes de 1 L que contenían la solución madre de nutrientes (NH<sub>4</sub>Cl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>) al 0,01%, se realizó suministro de aire con bombas de aire para acuario y se ubicaron 16 válvulas para regular caudal (2 para cada reactor). Los materiales utilizados fueron tubos de PVC de ½", 2" y 4", ángulos de aluminio, acrílico, manguera y recipientes plásticos. En la figura 12 se muestra un esquema de los bioreactores realizado con el software SolidWord VERSION 2010, y en el ANEXO A se indican las dimensiones de cada componente.

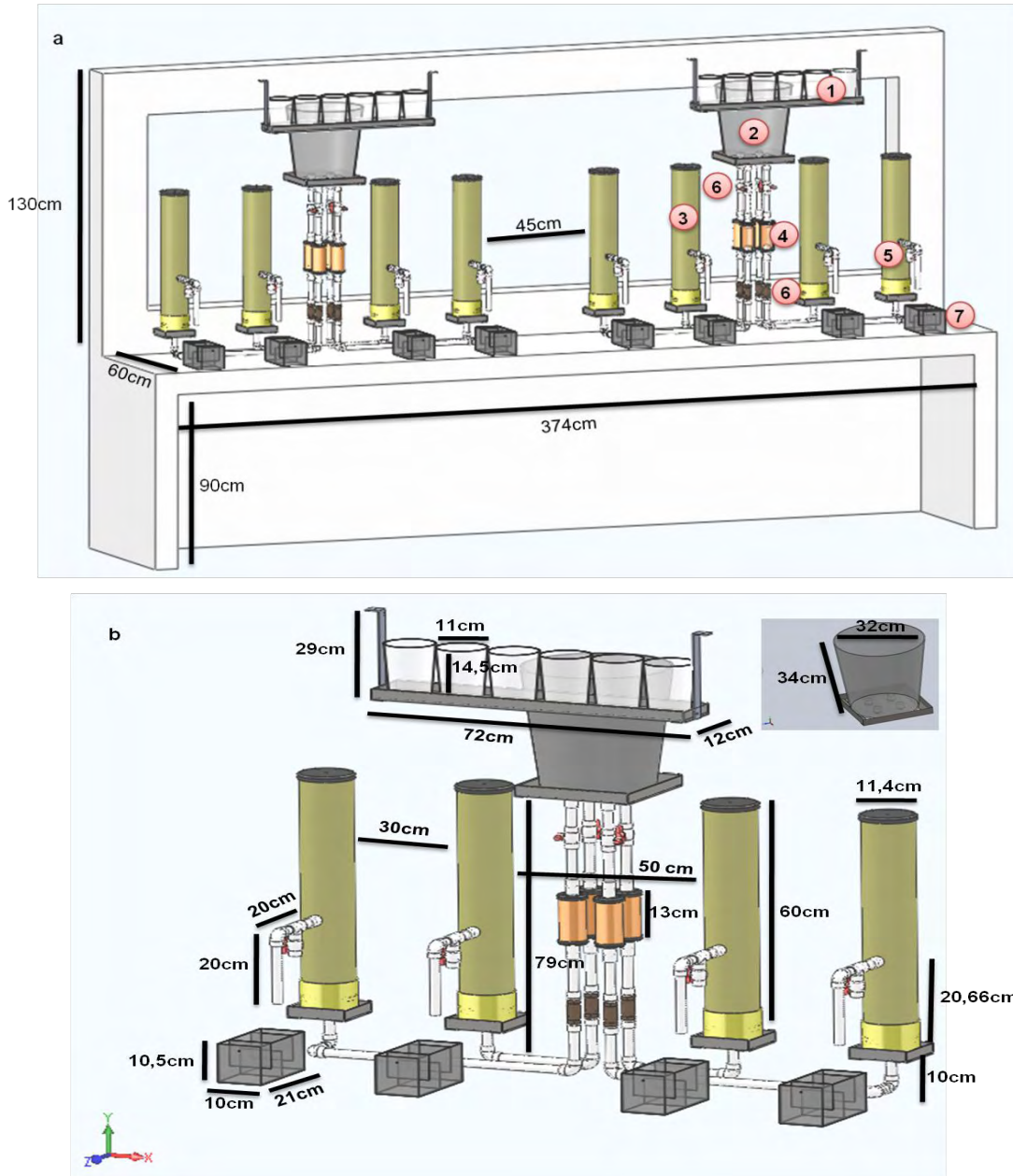


Figura 12: Esquema de bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua para el tratamiento de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de PHAs. a) esquema completo de 8 bioreactores donde se indica cada componente y las dimensiones del sitio donde se ubicaron: 1. Solución de nutrientes 0,01%, 2. Alimentador de agua residual, 3. Bioreactor, 4. Mezclador, 5. Válvula para regular caudal, 6. Válvulas para caudal del agua residual, 7. Sedimentador. b) esquema de 4 bioreactores con las dimensiones de cada componente. Software SolidWorks Educational Edition 2010 - 2011. Fuente: este estudio.



### 5.4.3 Operación de bioreactores:

5.4.3.1 Cálculo de tiempo de retención hidráulico (TRH) y caudal del agua residual. El TRH se calculó teniendo en cuenta el punto más alto de la fase exponencial del aislamiento seleccionado sometido a crecimiento en un medio con agua residual filtrada y estéril. Este dato fue el punto central para el factor TRH del diseño experimental Plackett-Burman.

Así mismo, para determinar el caudal del agua residual se tuvo en cuenta la siguiente ecuación (Sánchez, 2011):

$$D = F/V$$

Donde: D = Velocidad de dilución  
F = Velocidad de ingreso de medio fresco  
V = Volumen de operación del reactor.

Si  $D = \mu$ , entonces,  $F = \mu * V$ .

Por consiguiente, para determinar estos parámetros se realizó una fermentación tipo batch con tres replicas para lo cual, se utilizaron como unidades experimentales balones de 500 mL con 250 mL de agua residual y un inóculo al 10% del aislamiento seleccionado preactivado. El agua residual se obtuvo del colector Juan 23, la cual se filtro en un tamiz N° 200 con algodón y gasa, y se esterilizó a 15 Lb de presión. Los balones se llevaron a incubación a 100 rpm y 30°C. Cada seis horas de fermentación se realizó recuento de células en cámara de NeuBauer.

5.4.3.2 Preparación del inóculo para los bioreactores. Como inóculo de los reactores se utilizó el aislamiento seleccionado como mejor productor de PHAs en medio sintético (Ítem 5.2.3) el cual, se activó en caldo base (Fernández *et al.*, 2006) y se llevó a incubación por 12 horas a 100 rpm y 30°C; después de este tiempo se pasó a 300 mL de caldo de cultivo compuesto por agua residual filtrada y estéril, se llevó nuevamente a incubación a 100 rpm y 30°C por 12 horas. A continuación se procedió a inocular los reactores al 15% y una concentración de  $3,7 \cdot 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>, 12h después de la inoculación se comenzó a alimentar el sistema con agua residual sin esterilizar y las soluciones de nutrientes al 0,01% de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental.

5.4.3.3 Medio de cultivo para los bioreactores. El medio de cultivo suministrado en los bioreactores fue agua residual sin esterilizar obtenida directamente desde el colector Juan 23 ubicado en el sector de Torobajo en la salida Norte de la ciudad. El muestreo del agua residual se realizaba cada 48 horas en 3 recipientes plásticos de 20 L. Para evitar el ingreso de partículas gruesas esta agua residual fue filtrada con algodón, gasa y un tamiz N° 200.

Los bioreactores se operaron por 42 días así: durante los primeros 21 días se mantuvieron en funcionamiento de acuerdo al diseño experimental y se realizaron inoculaciones periódicas cada 7 días para un total de 3 inoculaciones por tratamiento. Después, durante los 21 días restantes se realizó la evaluación de las variables de respuesta. Es de aclarar que para cumplir con el diseño experimental inicialmente se corrieron 8 tratamientos y después los 7 restantes.

5.4.3.4 Evaluación de las variables de respuesta. Para determinar el porcentaje de remoción de materia orgánica se aplicó la siguiente fórmula (Caicedo y Molina, 2003):

Donde:

$$\text{Remoción de DQO (\%)} = \frac{[DQO]_A - [DQO]_E}{[DQO]_A} \cdot 100$$

$[DQO]_A$  = Concentración de DQO en el caudal de entrada expresado en  $\text{mg L}^{-1}$   
 $[DQO]_E$  = Concentración de DQO en el caudal de salida expresado en  $\text{mg L}^{-1}$ .

Así mismo, para obtener PHAs a partir de aguas residuales, de cada bioreactor se colectó 90 mL de muestra y se centrifugó a 6461 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se trató con 3 o 5 mL de hipoclorito de sodio al 5% y EDTA 10 mM, se llevó a baño maría por hora y media a 60°C, transcurrido este tiempo se centrifugó a 6461 g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y al precipitado obtenido se le realizaron lavados sucesivos con 3 mL de agua destilada, acetona y metanol frío, realizando una centrifugación a 6461 g por 10 minutos entre cada lavado. Posteriormente, el *pellet* se llevó a secar a temperatura ambiente hasta peso constante. A continuación el producto obtenido se resuspendió en 3 mL de cloroformo grado HPLC, se maceró y se centrifugó a 6461 g por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante, se agregó igual volumen de metanol frío y se dejó a -20°C *over night*. Al día siguiente se centrifugó a 6461 g por 20 minutos y el precipitado obtenido se dejó secar por 12h a temperatura ambiente.

Finalmente, se realizó la caracterización del polímero por cromatografía de gases según la metodología descrita en el ítem 5.2.3.1.

## 5.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de bacterias totales y acumuladoras de PHAs presentes en los diferentes trayectos del río Pasto (Ítem 5.2.1); así como en la producción de PHAs por los aislados seleccionados (Ítem 5.2.3) se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis.

Para determinar cuáles son los factores significativos que afectan la remoción de materia orgánica de las aguas residuales se aplicó el diseño experimental de Plackett-Burman  $2^8 \cdot 3$ , con 12 corridas y 3 puntos centrales. El experimento se corrió por triplicado.

Debido a que no se encontraron factores significativos que inciden en la síntesis de PHAs se realizó la prueba del rango múltiple de Duncan para establecer el tratamiento que favoreció la acumulación de PHAs.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs A PARTIR DE LAS AGUAS RESIDUALES DEL RÍO PASTO.

Al realizar el análisis estadístico del recuento de bacterias cultivables totales se obtuvo un  $p$  valor = 0,116 por lo tanto no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se observó un incremento gradual de la cantidad de bacterias totales a medida que el río atraviesa la ciudad en sentido Oriente – Norte, excepto en la estación de Pandiaco (Figura 10), donde se evidenció una disminución importante de las UFC mL<sup>-1</sup>. En contraste, las bacterias Nilo Azul A positivas de esta estación se incrementaron considerablemente en comparación con las otras estaciones de muestreo (Tabla 5).

Tabla 5. Recuento de bacterias cultivables totales, colonias Nilo Azul A positivas y número de aislamientos obtenidos en los diferentes trayectos del río Pasto

ESTACIÓN	UFC/mL	Colonias Nilo Azul A positivas	N° de Aislamientos
La Carolina (E1)	1,80E+07	255	7
Dos Puentes (E2)	1,40E+09	622	5
Av. Los Estudiantes (E3)	2,40E+09	550	7
Pandiaco (E4)	1,80E+07	865	23
Torobajo (E5)	3,20E+09	340	2
Total	7,04E+09	2632	44

Fuente: este estudio

Con respecto a las bacterias fluorescentes se observaron un total de 2632 colonias de las cuales se lograron diferenciar 44 de acuerdo a las características culturales (ANEXO B). Estos aislamientos presentaron fluorescencia naranja, naranja con borde rojo o rosada cuando se observaron bajo luz ultravioleta (ANEXO C, Figura 13), el 68% corresponden a bacterias Gram positivas, el 32% a Gram negativas y en su morfología microscópica sobresalen Bacilos (89%), y en menor cantidad estafilococos (2%), diplococos (2%), cocobacilos (2%) y bacterias filamentosas (5%) (ANEXO D, Figura 14).

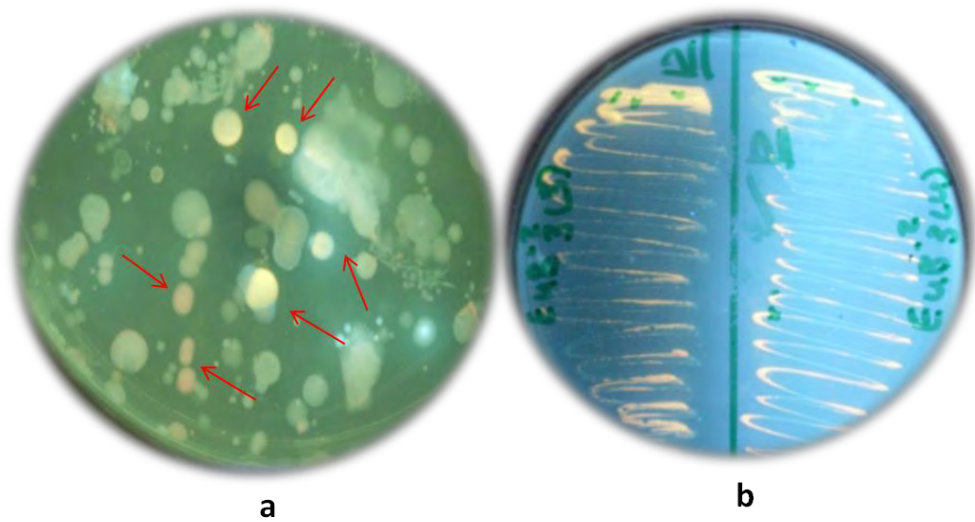


Figura 13. Fluorescencia de colonias bacterianas aisladas del río Pasto (estación Pandiaco) en medio Plate Count y Nilo Azul A. a) siembra dilución  $10^{-4}$ . b) aislamiento. Foto: Otero, I. Fuente: este estudio

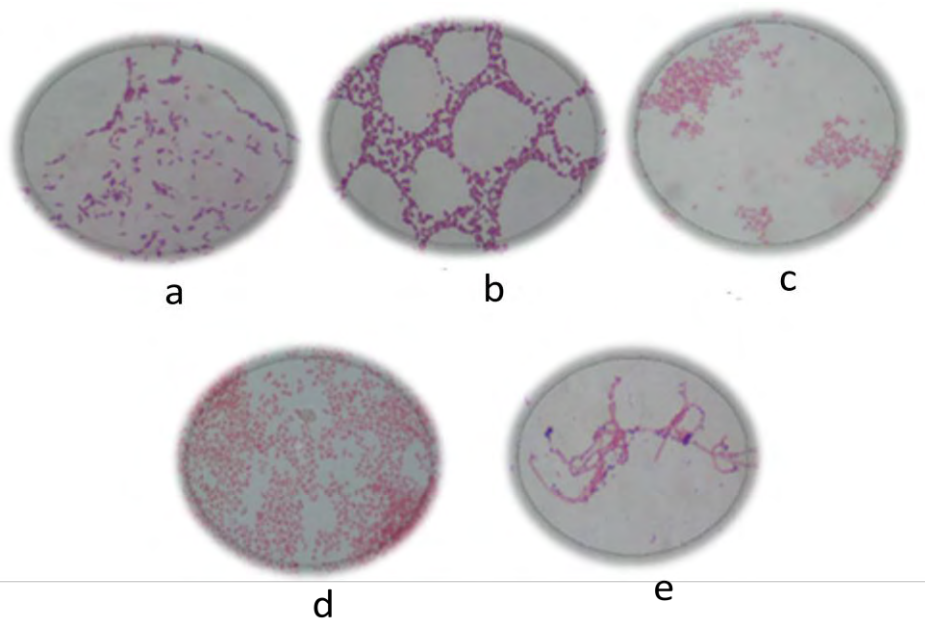


Figura 14. Morfología microscópica de aislamientos bacterianos fluorescentes obtenidos del río Pasto. a) Aislamiento E4M37 RP Bacilos Gram negativos; b) aislamiento E4M3 RP Estafilococos Gram positivos; c) aislamiento E4M26 RP Diplococos Gram negativos; d) aislamiento E4M35 RP Cocobacilos Gram negativos; e) aislamiento E5M13B RP Bacteria filamentosa Gram negativa. Foto: Otero, I. Fuente: Este estudio.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en esta investigación es probable que el descenso en la población de bacterias cultivables totales observado en la estación Pandiaco esté relacionado con las condiciones físico-químicas propias de este sitio generadas por la descarga de efluentes contaminados con metales pesados como el cromo producto de la actividad de las curtiembres localizadas en el sector; es de resaltar que el crecimiento y metabolismo microbiano es inhibido parcial o completamente cuando las células se exponen a concentraciones de metales pesados, cuyos efectos varían de acuerdo a la especie (Yuncu *et al.*, 2006; Das y Santra, 2007).

Así mismo, el incremento notorio de bacterias acumuladoras de PHAs observado en la estación Pandiaco posiblemente esté relacionado con factores ambientales como: incremento de materia orgánica, disminución en la concentración de oxígeno y la contaminación con Cr (VI).

El Cr(VI) es uno de los principales contaminantes industriales del río Pasto en el sector de Pandiaco, se considera la forma más tóxica del metal debido a su alta solubilidad, su ingreso al interior celular en forma de cromatos a través del transportador de sulfato y, la subsecuente interacción con proteínas intracelulares y ácidos nucleicos (Kocberber *et al.* 2010; Patra *et al.* 2010). Así mismo, se ha reportado que el estrés generado por la exposición continua de bacterias a ambientes contaminados con cromo puede desencadenar la sobre expresión de 21 proteínas diferentes, 10 del citosol y 11 ligadas a la membrana (Kocberber *et al.* 2010). Frente a esto, los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos de tolerancia al cromo, uno de ellos es la reducción de Cr (VI) a Cr (III) por la intervención de enzimas cromato reductasas que usan NADH o NADPH como cofactores (Cervantes *et al.* 2001; Ramírez *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2008; Gutiérrez y Cervantes, 2008; Ramírez *et al.*, 2009).

En este orden de ideas, se conoce que la síntesis de PHAs se afecta por la exposición de las bacterias a determinadas concentraciones de metales, al respecto, You *et al.*, 2011 proponen que organismos acumuladores de fosfato (PAOs) cuando se exponen a concentraciones de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de plomo en condiciones anaerobias pueden sintetizar PHB, sin embargo, no lo pueden utilizar normalmente en condiciones aerobias. Concluyen que el metabolismo de los PAOs bajo condiciones aerobias es más sensible a la toxicidad del plomo que bajo condiciones anaerobias. Por otra parte, Wang *et al.*, 2011 indica que concentraciones de  $4 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$  induce la supresión de la síntesis de PHAs. No obstante, la información acerca de la relación entre los PHAs y el cromo hexavalente (Cr (VI)) no es bien conocida aun, sin embargo, es probable que la síntesis de PHAs contribuya al proceso de detoxificación bacteriana por contaminación con Cr(VI), ya que estos biopolímeros son material de reserva de hidrogeniones (Trostenko y Belova, 2000) y en su proceso de depolimerización forman NADH el cual se podría utilizar como cofactor en el proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III). En la figura 15 se propone un mecanismo por el cual

probablemente se utiliza el poder reductor generado por la depolimerización de PHAs para la reducción de Cr (VI) a Cr (III).

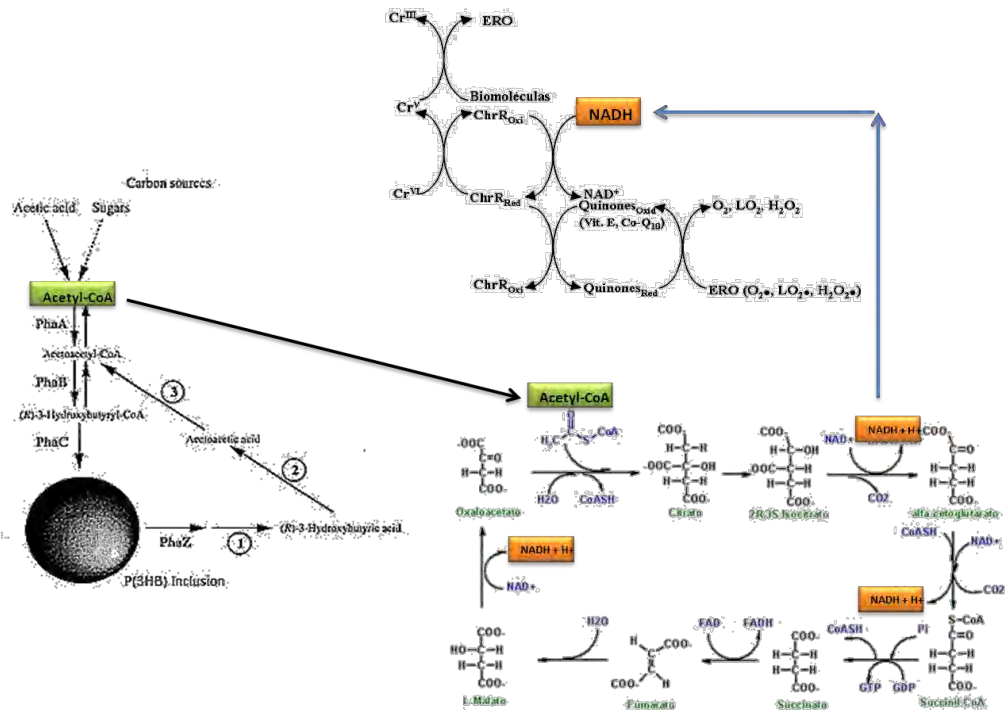


Figura 15. Posible ruta del proceso de reducción del cromo hexavalente por bacterias productoras de PHAs. Fuente: Adaptado de: Sudesh *et al.*, 2000; Ramírez *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2009.

Por otra parte, se ha establecido que la materia orgánica se incrementa gradualmente a medida que el río Pasto hace su recorrido por la ciudad (Tabla 6) (Bastidas, 2006; Bastidas, 2008; Otero y Fernández, 2008) y en la zona de Pandiaco se encuentran unas relaciones C/N altas (13:1) (Otero y Fernández, 2008) lo cual favorece la acumulación de PHAs.

Tabla 6: Variación de los parámetros DBO y DQO cuando el río Pasto ingresa a la ciudad y en una estación ubicada en el sector de Torobajo hacia la salida Norte de la ciudad.

Estación	DBO mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	DQO mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	Referencia
Ingreso del río a la ciudad	7,6	20,8	Bastidas, 2006
Torobajo	240	304	
Ingreso del río a la ciudad	3,75	31,6	Bastidas, 2008
Torobajo	52,2	172	
Ingreso del río a la ciudad	13	39	Otero y Fernández, 2008
Torobajo	125	150	

Fuente: Bastidas, 2006; Bastidas, 2008; Otero y Fernández, 2008.

Con respecto al oxígeno, se ha establecido que la concentración de oxígeno afecta la síntesis de PHAs, en el río Pasto la concentración de oxígeno pasa de 7,5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> por el sector de la Carolina (E1), hasta 4,55 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> en el sector de Pandiaco (Bastidas, 2008). Durante la respiración aerobia las coenzimas NADH y FADH<sub>2</sub> obtenidas del ciclo de Krebs transfieren la mayor parte de la energía almacenada originalmente en la glucosa a la cadena transportadora de electrones donde el aceptor final es el oxígeno (Madigan *et al.*, 2009; Tortora *et al.*, 2010); si en el agua del río Pasto en la estación Pandiaco disminuye la concentración de oxígeno entonces se provocaría un incremento en los niveles intracelulares de NADH o NAD(P)H lo cual inhibe la actividad de la citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa dando lugar a una desaceleración del ciclo de Krebs, por consiguiente, la Acetil CoA se acumula y toma otra ruta metabólica que para el caso de las bacterias productoras de PHAs conduce a la síntesis de estos biopolímeros (Kessler y Witholt, 2001).

En conclusión, factores como la alta concentración de materia orgánica, la baja concentración de oxígeno y la descarga de efluentes industriales que contienen cromo hexavalente podrían explicar el incremento de bacterias acumuladoras de PHAs observadas en la estación Pandiaco; ya que, está claramente establecido que en condiciones ambientales la acumulación, degradación y utilización de PHAs es un mecanismo que favorece la estabilidad, proliferación, supervivencia y competición de los microorganismos frente a los grupos bacterianos que no sintetizan el biopolímero (Razzaq *et al.*, 2010; Rehm, 2010).



## 6.2 PRE-SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS ACUMULADORES DE PHAs SEGÚN LA TINCIÓN CON NEGRO SUDAN B.

De los 44 aislamientos bacterianos evaluados mediante la tinción con Negro Sudan B, 7 presentaron gránulos solo en la fase exponencial, 6 en la fase estacionaria y 7 en las dos fases (Tabla 7). En los 24 aislamientos restantes no fue posible observar gránulos intracelulares. Teniendo en cuenta el tercer objetivo de esta investigación se buscaron los aislamientos que acumularon PHAs preferiblemente en la fase exponencial de crecimiento, en este sentido, se seleccionaron los aislamientos E1M10 RP, E4M15 RP, E4M23 RP y E4M34 RP ya que permitieron observar gránulos en un periodo de tiempo mayor durante la fase exponencial y con una presencia entre media (++) y alta (+++) (ANEXO E).

Tabla 7. Determinación cualitativa de la presencia de gránulos intracelulares mediante la tinción con Negro Sudan B (MERCK) en diferentes fases de crecimiento de los aislamientos obtenidos del río Pasto. (+) Presencia baja, (++) presencia media, (+++) presencia alta. Fuente: este estudio

Fase de Crecimiento	Aislamiento	Presencia de Gránulos	Horas en fase exponencial con presencia de gránulos	Horas en fase estacionaria con presencia de gránulos
EXPONENCIAL	E2M23 RP	+	12	
	E2M29 RP	+	72	
	E4M8 RP	++	12	
	E4M32 RP	+	24	
	E4M36 RP	++	24	
	E1M10 RP	++	36	
	E4M15 RP	++	48	
ESTACIONARIA	E1M7 RP	++		24
	E1M9 RP	+		12
	E3M5 RP	+		12
	E3M6 RP	+		12
	E4M24 RP	+++		72
	E4M26 RP	+++		60
EXPONENCIAL Y ESTACIONARIA	E1M4 RP	++	60	36
	E1M19 RP	++	48	36
	E2M21 RP	+	48	24
	E2M26 RP	++	84	12
	E3M9 RP	+	36	24
	E4M23 RP	+++	66	21
	E4M34 RP	+++	60	24

Como se ha reportado por diferentes autores la tinción con Negro Sudan B permite realizar una detección presuntiva de bacterias acumuladoras de PHAs (Alias y Tan, 2005; Akar *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2007; Garcez *et al.*, 2009; Khardenavis *et al.*, 2009; Pijuan *et al.*, 2009). Este colorante tiñe diferentes materiales lipofílicos almacenados por los microorganismos; sin embargo, presenta una alta afinidad por los PHAs y permite observar gránulos de color azul oscuro o negros (Sheu *et al.*, 2009; Legat *et al.*, 2010; Chen<sup>b</sup> *et al.*, 2011).

Por otra parte, la síntesis de PHAs asociado al crecimiento puede relacionarse con varios factores como: la expresión de genes inducibles, la concentración intracelular de NADH y la velocidad de reacción enzimática. Los genes inducibles se expresan en momentos concretos como respuesta a estímulos ambientales o presencia del sustrato precursor (Dong *et al.*, 2012). En el caso de los PHAs la expresión de genes que codifican para determinadas enzimas implicadas en el metabolismo de estos biopolímeros se activa debido a señales ambientales específicas como limitación de nutrientes o, por la presencia de intermediarios metabólicos que actúan como precursores (Kessler y Witholt, 2001; Park *et al.*, 2005) que durante el crecimiento exponencial podrían provenir del ciclo de Krebs, por ejemplo, oxaloacetato y succinil CoA (Reddy *et al.*, 2003; Valappil *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2011).

Así mismo, se conoce que el flujo de metabolitos hacia el ciclo de Krebs está altamente regulado por la actividad enzimática y depende de factores como: la disponibilidad de sustrato (precursores), la velocidad de reacción enzimática, acumulación de productos como el NADH e inhibición de enzimas que catalizan algunos pasos del ciclo de Krebs (Nelson y Cox, 2004). Al respecto, se ha sugerido que la síntesis de PHAs asociada al crecimiento refleja la habilidad de un microorganismo para utilizar la Acetil CoA en propósitos diferentes de la oxidación (Braunegg *et al.*, 1998) y que altas concentraciones de NADH producido en el ciclo de Krebs inhibe la actividad de la citrato sintasa y como mecanismo adicional la Acetil CoA acumulada se dirige a la síntesis de PHAs (Kessler y Witholt, 2001).

En este sentido, si se tiene en cuenta que durante el crecimiento bacteriano el ciclo de Krebs se encuentra activo para cumplir con los diferentes requerimientos de la célula, es posible que en las bacterias que sintetizan PHAs en la fase exponencial se presenten las condiciones genéticas y metabólicas necesarias para la síntesis de PHAs asociado al crecimiento.

### 6.3 PRODUCCIÓN DE PHAs POR LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS UTILIZANDO GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO.

Al evaluar la producción de PHAs entre las 4 bacterias pre-seleccionadas en el ítem 6.2 se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas con un p valor = 0,0015 en la producción del biopolímero. Entre estas bacterias se

destacó el aislamiento bacteriano E1M10 RP ya que alcanzó la mayor producción de PHAs con  $5,24 \text{ g.L}^{-1}$  (Tabla 8), por consiguiente se seleccionó para continuar con las siguientes etapas de esta investigación.

Tabla 8. Producción de PHAs en  $\text{g L}^{-1}$  de los aislamientos bacterianos seleccionados utilizando glucosa como fuente de carbono.

Aislado	Producción de PHAs en $\text{g.L}^{-1}$	Desviación estándar
E4M34 RP	3,86	+/- 0,17
E1M10 RP	5,24	+/- 0,52
E4M23 RP	0,88	+/- 0,12
E4M15 RP	4	+/- 0,08

Fuente: Este estudio

De igual manera, según la figura 16 con respecto al perfil de crecimiento del aislamiento bacteriano E1M10 RP se puede decir que se observó una fase exponencial durante las primeras 24 h y una fase estacionaria que se extiende desde las 30 h hasta después de las 84 h de cultivo. La velocidad específica de crecimiento fue de  $0,020 \text{ h}^{-1}$  y además, se observó que la síntesis de PHAs es parcialmente asociada al crecimiento.

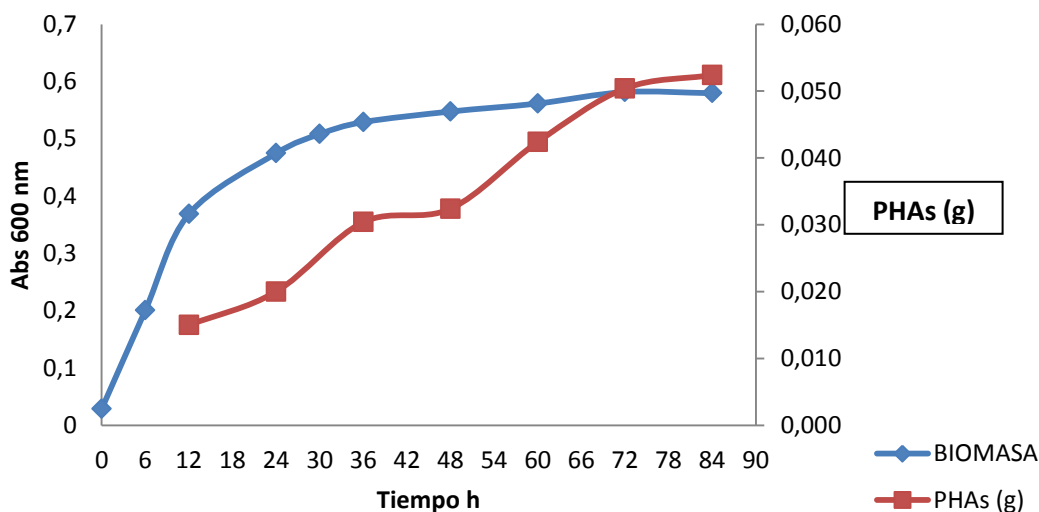


Figura 16: Cinética de crecimiento y producción de PHAs por el aislamiento bacteriano E1M10 RP. Fuente: Este estudio.

De igual manera, mediante análisis por cromatografía de gases se estableció que la muestra obtenida del aislamiento E1M10 RP forma un pico con tiempo de retención de 4,928 minutos (Figura 17), el cual coincide con el tiempo de retención del éster de metilo 3 hidroxibutirato utilizado como patrón (ANEXO F).

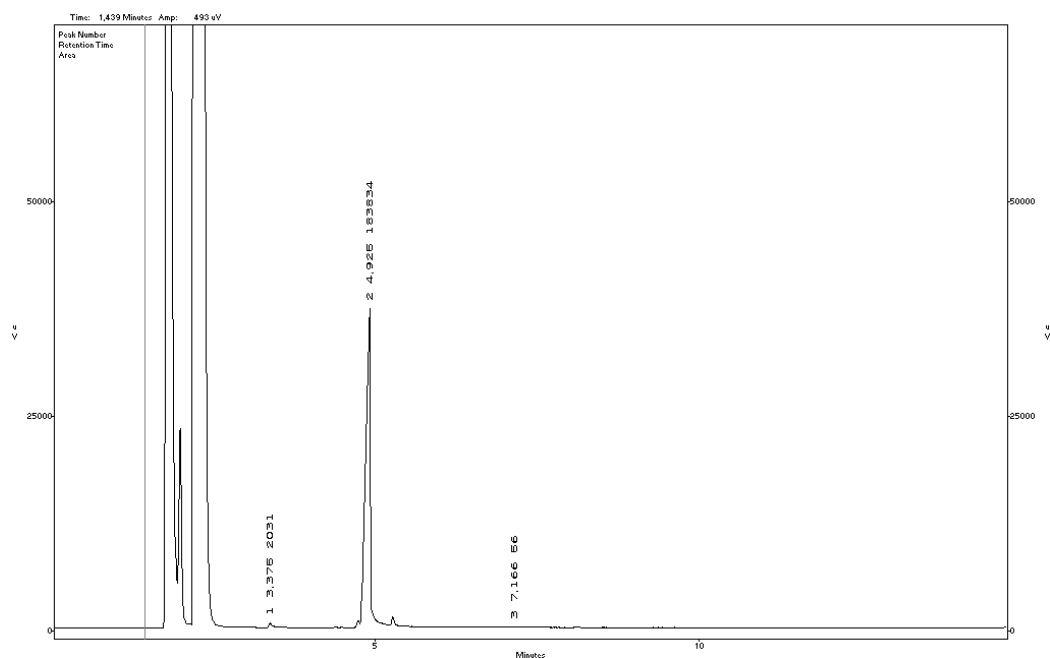


Figura 17. Cromatograma de éster de metilo 3 hidroxibutirato acumulado por el aislado E1M10 RP Fuente: Este estudio.

Posteriormente, mediante un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) se identificó que el biopolímero sintetizado por esta bacteria se conforma por unidades monoméricas de 3-metil hidroxibutirato (Figura 18), por lo tanto, se puede afirmar que el polímero sintetizado por el aislamiento E1M10 RP es poli-3- hidroxibutirato P(3HB).

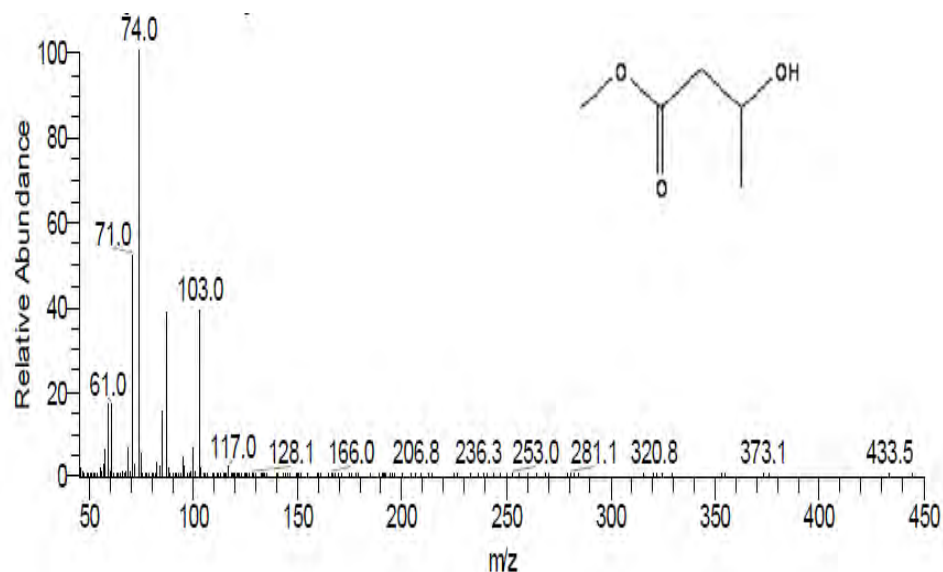


Figura 18. Espectro de masas del compuesto 3-metil-hidroxibutirato sintetizado por el aislado E1M10RP. Fuente: Este estudio.

En esta fase del estudio se comprobó que la síntesis del polímero poli – 3-hidroxibutirato P(3HB) por el aislamiento E1M10 RP ocurre parcialmente asociado al crecimiento (Bolivar, 2004) este hecho es importante ya que sería posible implementar sistemas de fermentación batch o continuos para la obtención de este biopolímero y de esta manera se amplían las posibilidades de uso de este aislamiento en diferentes procesos biotecnológicos.

Es oportuno mencionar que el PHB es un producto modelo en el desarrollo de estrategias biotecnológicas (Sangkharak *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010). Cuando se extrae tiene propiedades mecánicas similares a los plásticos convencionales como polipropileno o polietileno, no es tóxico, insoluble en agua y puede ser extruido, moldeado, convertido a fibras y utilizado para hacer heteropolímeros con otros polímeros sintéticos (Qaid *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). Las aplicaciones del PHB se deben principalmente a su biodegradabilidad, capacidad de reabsorción y biocompatibilidad (Shahhosseini, 2004). Este biopolímero puede ser de interés como materia prima para la fabricación de diferentes productos en el campo biomédico como por ejemplo, hilo quirúrgico, válvulas cardíacas, injertos vasculares, implantes temporales de placas óseas, clavos, tornillos, micro y nano-esferas para liberación controlada de drogas (Qaid *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2009) y en la agricultura puede utilizarse en la liberación controlada de productos agrícolas (Wang y Yu, 2007; Chen<sup>a</sup> *et al.*, 2011)

#### 6.4 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL AISLAMIENTO BACTERIANO QUE PRESENTÓ LA MAYOR PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS MEDIANTE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN 16S rRNA.

6.4.1 Extracción de DNA. La calidad del ácido nucleico obtenido del aislamiento bacteriano E1M10 RP se verificó en geles de agarosa al 1% (Figura 19). Los resultados obtenidos permitieron ejecutar las pruebas moleculares complementarias.

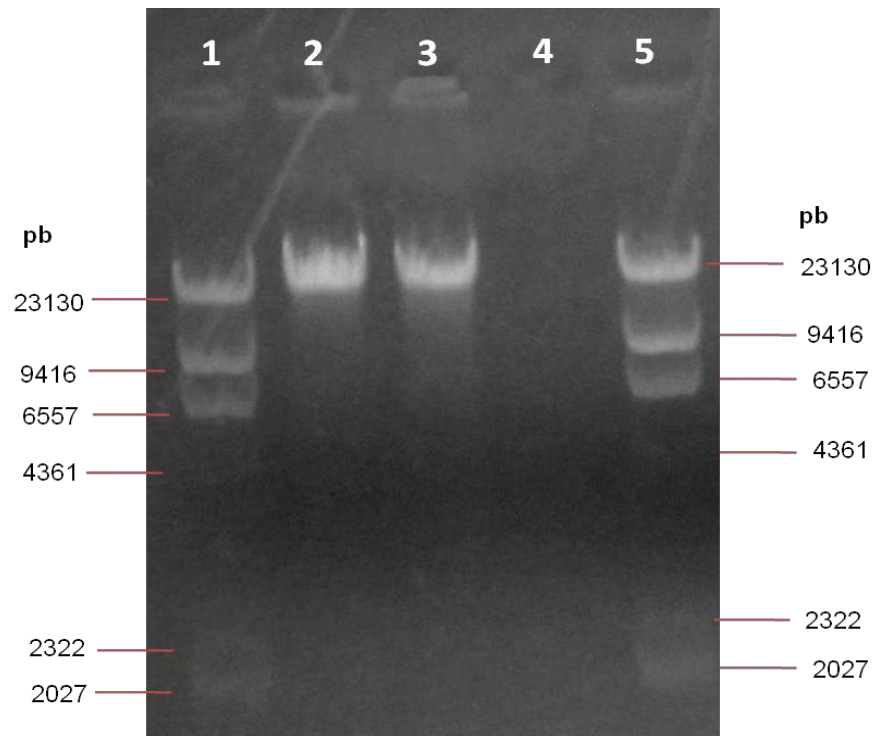


Figura 19. Gel de agarosa al 1% para verificación de ADN extraído con el protocolo de Rivera, *et al.*, 1995. 1 y 5: marcador de tamaño molecular lambda Hind III, 2 muestra obtenida del aislamiento bacteriano E1M10 RP, 3 control positivo *Bacillus sp.* 4 control negativo agua. Fuente: Este estudio.

En este sentido, al realizar la cuantificación de DNA se encontraron absorbancias de 0,071 y 0,039 para las longitudes de onda de 260nm y 280nm respectivamente y una relación 260/280 de 1,82. A partir de estos datos se calculó la concentración del DNA en  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  así:

$$\text{ADN ng } \mu\text{L}^{-1} = 50 * \text{DO (260nm)} * \text{FD} \rightarrow 50 * 0,071 * 1000 = 3550 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$$

A continuación se preparó la solución de trabajo a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para los ensayos de PCR:

$$C1V1 = C2V2 \rightarrow (3550 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}) * V1 = (100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}) * (100 \mu\text{L})$$

$$\rightarrow V1 = (100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}) * (100 \mu\text{L}) / 3550 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1} = 2,81 \mu\text{L}.$$

Por lo tanto, para obtener la solución de trabajo a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  se tomaron  $2,81 \mu\text{L}$  de la solución stock de la muestra de DNA y se adicionaron  $97,19 \mu\text{L}$  de buffer TE.

6.4.2 Amplificación del gen 16S rRNA. El ensayo piloto de PCR con muestras de DNA ajustadas a  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de las bacterias *Bacillus sp.*, *B. cereus*; *S. aureus*; *S. epidermidis*; *E. coli*; *E. coli ATCC 13076*; *P. aeruginosa*; *P. putida*; *Vibrio sp*; *V. cholerae RC 25*; *V. parahaemolyticus*; *Salmonella sp.*; *B. subtilis*; *Listeria sp.*; *Candida sp.*; *L. innocua*; y *Proteus sp*, permitió observar una banda cercana al fragmento de 1500pb del marcador de tamaño molecular; por lo tanto, se puede decir que se obtuvo el amplificado esperado (Figura 20).

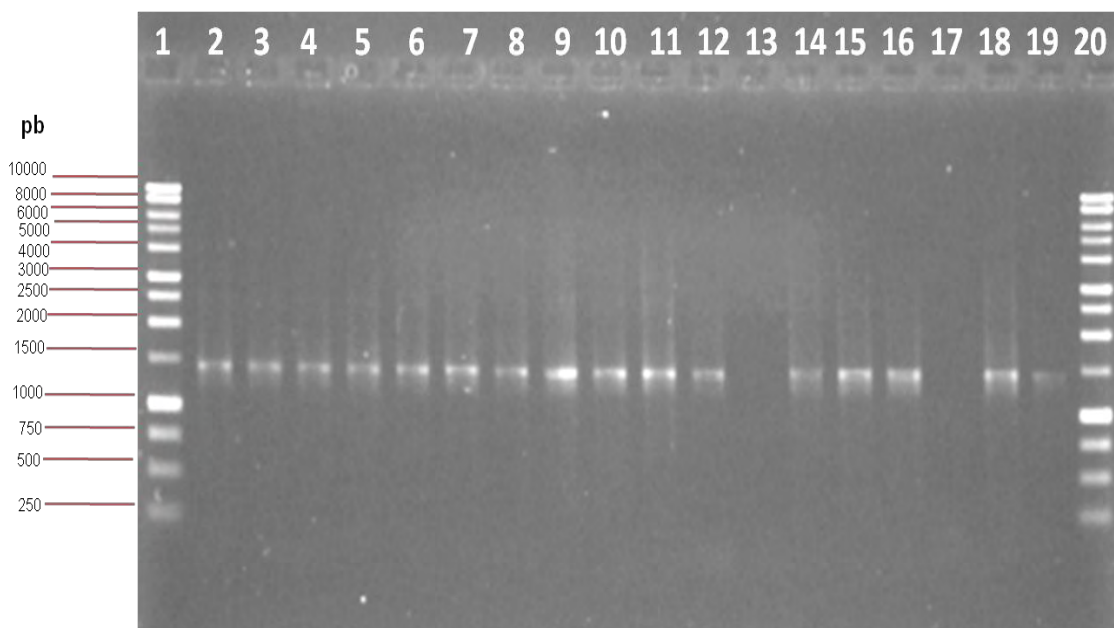


Figura 20: Ensayo previo para estandarización de PCR con los primers 27F y 1041R. 1 y 20. Marcador de tamaño molecular de 1Kb; 2. *Bacillus sp.*, 3. *B. cereus*; 4. *S. aureus*; 5. *S. epidermidis*; 6. *E. coli*, 7. *E. coli* ATCC 13076; 8. *P. aeruginosa*; 9. *P. putida*, 10. *Vibrio sp*; 11. *V. cholerae* RC 25; 12. *V. parahaemolyticus*; 13. control negativo (agua); 14. *Salmonella sp.*; 15. *B. subtilis*; 16. *Listeria sp.* 17. *Candida sp.* 18. *Listeria innocua* y 19. *Proteus sp.* Fuente: Este estudio

Posteriormente, al realizar la PCR con las muestras de DNA del aislamiento bacteriano E1M10 RP también fue posible observar una banda cercana al fragmento de 1500pb del marcador de tamaño molecular 1 Kb, por lo tanto, se puede concluir que se obtuvo el amplificado esperado del gen 16S rRNA (Figura 21).



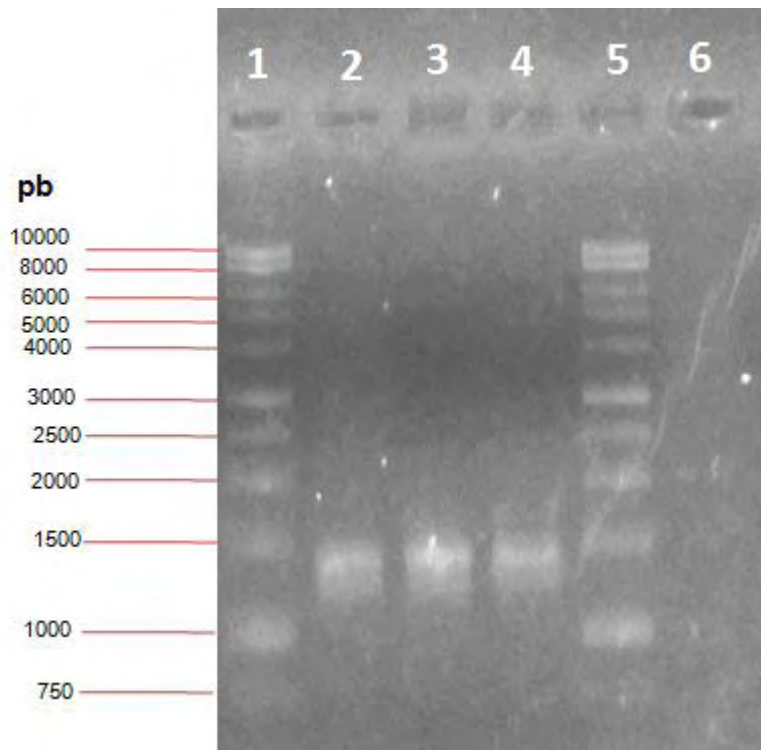


Figura 21. Gel de agarosa al 1% para verificación del amplificado del gen 16S rRNA. 1 y 5: marcador de tamaño molecular 1kb Ladder, 2 y 3: amplificado del aislamiento bacteriano E1M10 RP, 4: control positivo *Bacillus sp.* y 6: control negativo agua. Fuente: Este estudio.

Finalmente, una vez verificada la calidad de las secuencias obtenidas del proceso de secuenciación (Figura 22) se procedió a realizar la edición hasta obtener una secuencia parcial final de 815 pb (ANEXO G).

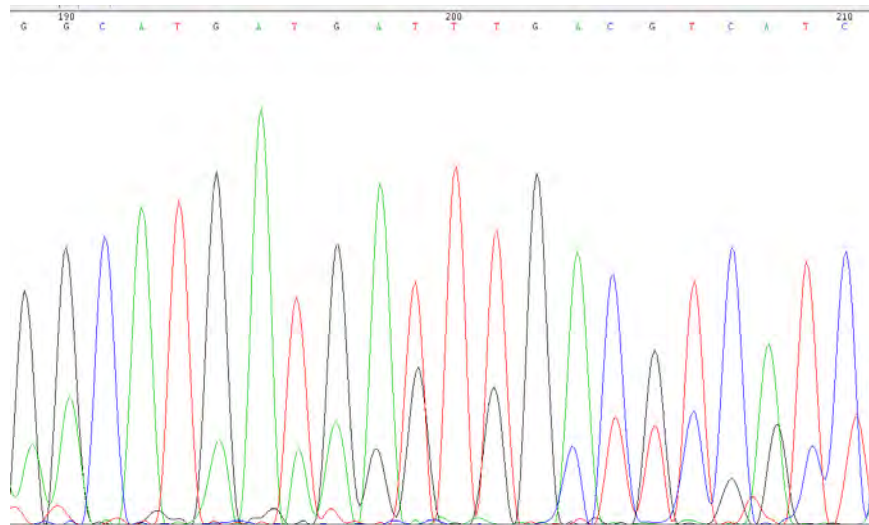


Figura 22: Cromatograma en la región entre 189 a 210pb obtenida de la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10RP. Fuente: Este estudio

Al comparar la secuencia editada con la base de datos Ribosomal Database Project se encontró que la secuencia parcial final del aislamiento bacteriano E1M10 RP tiene entre 84,6% y 84,8% de identidad con *Bacillus subtilis* y un 84,3 con un *Bacillus sp.* no cultivable (Figura 23).

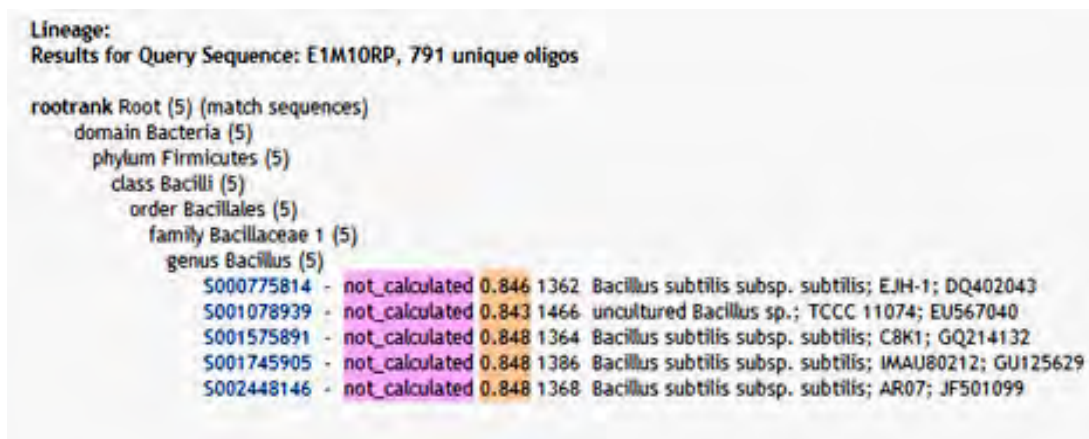


Figura 23: Resultado obtenido al comparar la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10 RP en la base de datos Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Fuente: Este estudio

Por otra parte, en la base de datos del GenBank se encontró un resultado similar ya que la secuencia parcial final del aislamiento bacteriano E1M10 RP presentó un 96% de identidad con *Bacillus subtilis* y con un *Bacillus sp.* (Figura 24). Por lo tanto, se concluye que el aislamiento bacteriano E1M10 RP corresponde a una bacteria del genero *Bacillus* y tiene un 96% de probabilidad que pertenezca a la especie *Bacillus subtilis*.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<a href="#">JF501099.1</a>	Bacillus subtilis strain AR07 16S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">1312</a>	1312	100%	0.0	96%
<a href="#">GU125629.1</a>	Bacillus subtilis strain IMAU80212 16S ribosomal RNA gene, par	<a href="#">1312</a>	1312	100%	0.0	96%
<a href="#">GQ214132.1</a>	Bacillus subtilis strain C8K1 16S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">1312</a>	1312	100%	0.0	96%
<a href="#">JN104596.1</a>	Bacillus sp. J9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	<a href="#">1308</a>	1308	100%	0.0	96%
<a href="#">HQ536000.1</a>	Bacillus subtilis strain CCM9 16S ribosomal RNA gene, partial se	<a href="#">1308</a>	1308	100%	0.0	96%

Figura 24: Resultado obtenido al comparar la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano E1M10RP en la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Fuente: Este estudio

Existen muchos estudios donde se ha evaluado la producción de PHAs a partir de aislamientos ambientales (Amirul *et al.*, 2008) entre los cuales se destacan bacterias del genero *Bacillus* como: *Bacillus sp.* JMa5 (Wu *et al.*, 2001), *B. mycoides* RLJ B-017 (Borah *et al.*, 2002), *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus* G2, *B. sphaericus* X3, *B. megaterium* Y6 (Katircioglu *et al.*, 2003), *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. sphaericus* ATCC 14577 (Yilmaz *et al.*, 2005), *B. thuringiensis* (Porwal *et al.*, 2008). Estos microorganismos se han caracterizado por sintetizar diferentes homo y copolímeros tales como P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-4HB-co-3HHx), P(3HB-co-6HHx-co-3HHx) dependiendo del sustrato suministrado o de la estrategia de alimentación empleada (Labuzek y Radecka, 2001; Valappil *et al.*, 2008). Sin embargo, la información acerca de *B. subtilis* como productor de PHAs aún es escasa (Singh *et al.*, 2009). No obstante, Aslim *et al.*, (2002) en suelos de diferentes pastizales de Ankara en Turquía identificaron 8 cepas de *B. subtilis* que produjeron hasta 0,204 g L<sup>-1</sup> de PHB en un medio con caldo nutritivo. Por su parte, Bello y Brandl, (2007) reportaron una producción de 3337 mg L<sup>-1</sup> de PHB por la cepa *B. subtilis* 2344 en dos medios diferentes compuestos por sacarosa y glucosa. Porwal *et al.*, (2008) reportaron la producción 190 mg L<sup>-1</sup> de PHB por *B. subtilis* en un medio suplementado con glucosa como fuente de carbono, y Tamdogan y Sidal, (2011) determinaron que *B. subtilis* ATCC 6633 produjo 10.4981 µg mL<sup>-1</sup> con manitol como fuente de carbono. El aislamiento bacteriano E1M10RP obtenido en este estudio caracterizado mediante

secuenciación parcial del gen 16S rRNA como una bacteria del genero *Bacillus* con 96% de probabilidad con la especie *B. subtilis*, produce 5,24 g L<sup>-1</sup> de P(3HB) en caldo base (Fernández *et al.*, 2006); teniendo en cuenta los trabajos citados anteriormente la bacteria obtenida en este estudio alcanzó uno de los rendimientos más altos en producción del homopolímero P(3HB) y es posible que optimizando las condiciones de cultivo, el sistema de fermentación y los regímenes de alimentación se mejore significativamente la producción de este biopolímero.

En este sentido, vale la pena mencionar que *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva incrementando su interés por las posibles aplicaciones, pues se ha reportado que este grupo de microorganismos puede utilizar fuentes de carbono no convencionales para sintetizar biopolímeros. Por lo tanto, es una alternativa viable para la reducción considerable de los costos asociados a la producción a gran escala (Lisboa, 2003; Mizuno *et al.*, 2010). Además se conoce que bacterias Gram positivas como *B. subtilis* no producen endotoxinas (Espinosa, 2005; Singh *et al.*, 2009), por consiguiente, el polihidroxitirato sintetizado por esta bacteria puede ser de interés como materia prima para la fabricación de diferentes productos en el campo biomédico (Qaid *et al.*, 2008; Castilho *et al.*, 2009) agrícola e industrial (Wang y Yu, 2007; Chen<sup>a</sup> *et al.*, 2011).

## 6.5 EFECTO DE FACTORES NUTRICIONALES Y OPERACIONALES EN LA REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA POR BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN UN REACTOR DE FLUJO CONTINUO.

6.5.1 Cálculo de tiempo de retención y velocidad de ingreso de medio fresco. Utilizando como medio de cultivo agua residual filtrada y estéril se determinó por la técnica de recuento celular en placa de NeuBauer que *Bacillus sp* E1M10RP tiene una fase de crecimiento exponencial hasta las 12h y una fase estacionaria desde las 12h hasta después de las 24h (Figura 25).

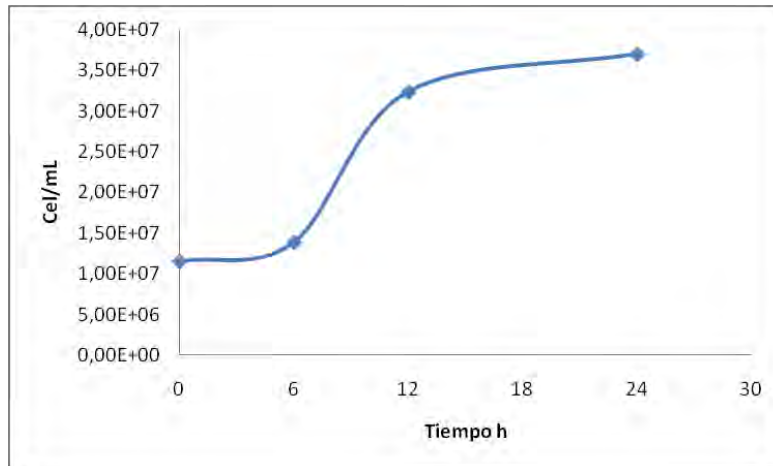


Figura 25. Recuento en cámara de NeuBauer de *Bacillus sp* E1M10RP en un medio con agua residual. Fuente: Este estudio.

Bajo estas condiciones, la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus sp* E1M10RP fue de  $0,086\text{h}^{-1}$ . Debido a que el punto más alto de la fase exponencial fue a las 12h, teniendo en cuenta la ecuación 1 (Sánchez, (2011):

$$D = F/V, \text{ Si } D = \mu, \text{ entonces, } F = \mu * V \quad (\text{ecu 1})$$

$$F = (0,086 \text{ h}^{-1}) * (2000\text{ml}) \rightarrow F = 172\text{mL h}^{-1}$$

Se definió que al bioreactor ingresarían  $172 \text{ mL h}^{-1}$  en 12 h; a partir de aquí se establecieron tres horas por debajo y tres horas por encima para los niveles -1 y +1 del diseño experimental, es decir, una velocidad de ingreso de medio fresco de  $222 \text{ mL h}^{-1}$  y  $133 \text{ mL h}^{-1}$  para los tiempos de retención de 9 h y 15 h respectivamente.

6.5.2 Remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de PHAs. Los bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua implementados para el desarrollo de esta investigación se ilustran en la figura 26.



Figura 26. Bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua para el tratamiento de aguas residuales vertidas al río Pasto con bacterias productoras de polihidroxialcanoatos. 1. Solución de Nutrientes 0,01%, 2. Alimentador de agua residual, 3. Válvulas solución de nutrientes, 4. Bioreactor, 5. Mezclador, 6. Válvula para regular caudal, 7. Válvulas para caudal del agua residual, 8. Sedimentador, 9. Aireador, 10. Colector final. Foto: Otero, I. Fuente: Este estudio

Al observar los resultados obtenidos en cada tratamiento de acuerdo al diseño experimental de Plackett Burman con respecto al porcentaje de remoción de la materia orgánica presente en las aguas residuales que se vierten al río Pasto se logro remover hasta el 94,63% (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de remoción de materia orgánica medida en DQO y PHAs en  $\text{g L}^{-1}$  obtenido en los diferentes tratamientos del diseño experimental Plackett Burman.

Tratamiento	FACTORES NUTRICIONALES $\text{mL h}^{-1}$						F. OPERACIONALES		% REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA	PHAs $\text{g L}^{-1}$
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	$\text{MgCl}_2$	KCl	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{ZnCl}_2$	TRH (h)	VVM $\text{min}^{-1}$		
1	20	20	4	4	6,66	0,66	9	0,075	86,14	0,038
2	20	12	6,66	4	6,66	1,11	9	0,125	93,37	0,042
3	20	12	4	6,66	4	0,66	9	0,125	88,01	0,041
4	33	12	6,66	6,66	6,66	0,66	15	0,125	94,63	0,039
5	33	12	4	6,66	4	1,11	9	0,075	60,26	0,111
6	33	12	4	4	6,66	0,66	15	0,075	91,75	0,041
7	20	20	4	6,66	6,66	1,11	15	0,125	91,13	0,052
8	20	20	6,66	6,66	4	0,66	15	0,075	77,19	0,050
9	33	20	4	4	4	1,11	15	0,125	86,90	0,029
10	33	20	6,66	4	4	0,66	9	0,125	93,46	0,042
11	20	12	6,66	4	4	1,11	15	0,075	80,88	0,009
12	33	20	6,66	6,66	6,66	1,11	9	0,075	79,07	0,044
13	25	15	5	5	5	0,83	12	0,075	91,10	0,047
14	25	15	5	5	5	0,83	12	0,075	82,09	0,020
15	25	15	5	5	5	0,83	12	0,075	85,64	0,004

Fuente: Este estudio

También, se determinó que los factores nutricionales KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y el factor operacional VVM tienen efecto significativo en la remoción de la materia orgánica presente en las aguas residuales vertidas al río Pasto con un p-valor de 0,0014, 0,0002, 0,0024 y 0,000 respectivamente. El orden de significancia del efecto de los factores sobre la remoción de materia orgánica se ilustra en el gráfico de Pareto (Figura 27). El  $R^2$  del experimento indica que el modelo explica el 70,69% de la variabilidad en porcentaje de remoción.

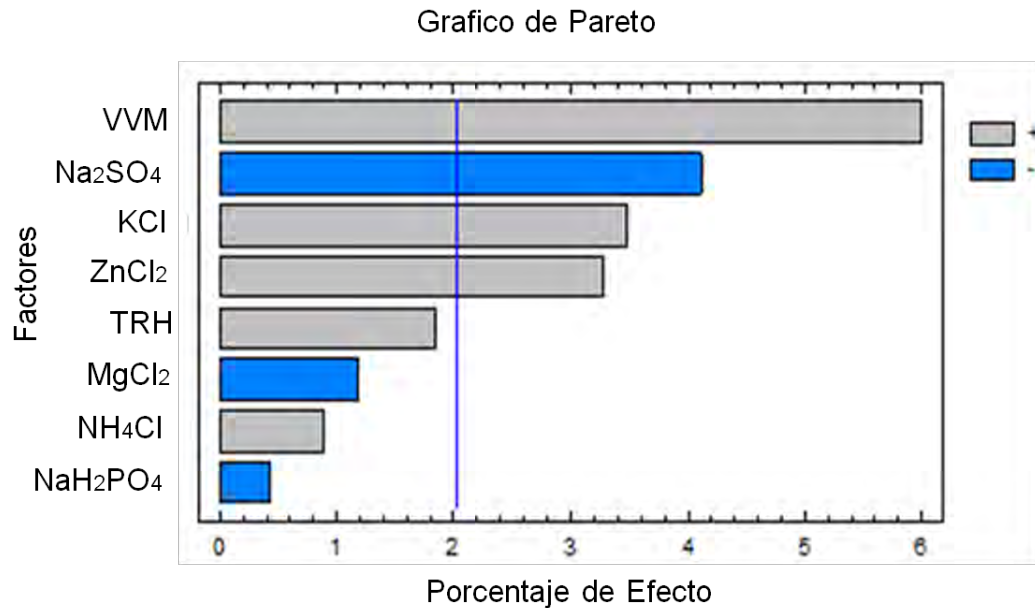


Figura 27. Incidencia de los factores sobre la remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto. Fuente: Este estudio.

Con respecto a los efectos de mayor incidencia en la remoción de materia orgánica se puede decir que el Potasio, el Zinc y la aireación tienen un efecto positivo, mientras que el Sulfato un efecto negativo.

Se conoce que la aireación es un importante parámetro de diseño y operación en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales (Luanmanee *et al.*, 2001; Ndegwa *et al.*, 2007; Guardia *et al.*, 2008; Nhu *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2011; Rahimi *et al.*, 2011), lo cual, coincide con lo reportado en esta investigación donde la aireación es el factor de mayor incidencia en el proceso de remoción de materia orgánica de las aguas residuales del colector Juan 23 de la ciudad de Pasto. Este hecho posiblemente se debe a que durante los procesos anaerobios no existen aceptores de electrones externos y por lo tanto, ocurre un proceso de fermentación donde la glucosa se transforma a piruvato y posteriormente a productos de las fermentaciones alcohólica o láctica. Así mismo, durante este proceso se generan únicamente 2 moléculas de ATP y los NADH se utilizan para reducir intermediarios metabólicos como el piruvato. En cambio, si está presente el oxígeno, la glucosa puede oxidarse completamente hasta CO<sub>2</sub> en el ciclo de Krebs, los electrones de los NADH generados se transfieren al aceptor terminal de electrones y como resultado final se obtiene 38 moléculas de ATP. Es oportuno mencionar que para los microorganismos el producto importante es el ATP ya que lo utilizan en una gran cantidad de reacciones que requieren energía, mientras que los productos de la fermentación son sustancias de desecho (Sonune y Ghate, 2004; Vassallo *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2009; Rahimi *et al.*, 2011).



En este orden de ideas, el suministro de aire en los bioreactores favorece la disponibilidad de un aceptor final de electrones y por consiguiente la oxidación completa de la materia orgánica presente en las aguas residuales a través del ciclo de Krebs, y de esta manera se libera mayor energía que es aprovechada para el cumplimiento de las funciones metabólicas básicas de la célula, así como para incrementar la población bacteriana, lo cual se traduce en un mayor consumo de sustrato y por consiguiente en la disminución de la materia orgánica presente en las aguas a tratar. Por lo tanto, la aireación se convierte en un factor importante a tener en cuenta en los procesos de optimización y escalado posterior a este estudio.

En lo referente a los demás factores nutricionales que tuvieron un efecto significativo en los ensayos realizados se conoce que hacen parte de los constituyentes naturales de las células bacterianas ya que según Crites y Tchobanoglous, (2000) las células bacterianas se componen de carbono (50%), oxígeno (24%), nitrógeno (12%), hidrogeno (6%), fosforo (3%), azufre (1%), potasio (1%) sodio (1%), calcio (0,5%), magnesio (0,5%), cloro (0,5%), hierro (0,2%) y otros micronutrientes (Zn, Mn, Mo, Se, Co, Cu, Ni, y W) 0,3%; la ausencia de alguna de estas sustancias en el ambiente limita el crecimiento biológico. En este sentido, el azufre que se obtiene de fuentes inorgánicas como sulfatos  $\text{SO}_4^{2-}$  o sulfuros  $\text{HS}^-$  se requiere porque es un componente estructural de los aminoácidos cisteína y metionina, también se presenta en el ácido lipoico, y en la coenzima A, esta coenzima juega un rol importante en la síntesis y degradación de grasas y en una serie de reacciones de oxidación del ciclo de Krebs (Tortora *et al.*, 2010) de hecho, sin la actuación de la coenzima A no se desencadenarían las reacciones del ciclo de Krebs ni las reacciones de síntesis de PHAs, por tanto, en el caso particular de esta investigación no se produciría una completa degradación de la materia orgánica presente en las aguas residuales.

Así mismo, se ha reportado que el potasio es el principal catión inorgánico en las células y actúa como cofactor de algunas enzimas como la piruvato kinasa; esta enzima participa en la glucólisis en el paso de hidrólisis del fosfoenol piruvato para formar piruvato, como resultado de esta reacción se libera energía en forma de ATP (Gottschalk, 1986; Ayar y Tarhan, 2007; Madigan *et al.*, 2009; Tortora *et al.*, 2010). Por lo tanto, es probable que el potasio contribuya al proceso de remoción de materia orgánica al promover la actividad catalítica de la enzima piruvato quinasa y de esta manera se generaría energía para otras funciones celulares que en última instancia podrían favorecer la actividad microbiana dentro del reactor.

Con respecto al Zinc, participa como cofactor de enzimas polimerasas y depolimerasas (Gottschalk, 1986; Madigan *et al.*, 2009; Tortora *et al.*, 2010) por tanto, es un elemento importante para el funcionamiento de la PHA sintasa, enzima que une los residuos de 3 hidroxibutirato a cadenas preexistentes de PHAs.

El tratamiento biológico de aguas residuales domésticas e industriales parece ser una tecnología promisoría para alcanzar los niveles de reducción de emisiones certificadas, ya que, en comparación a otros métodos tiene la ventaja de disminuir costos sin contaminación secundaria (Yoon *et al.*, 2004; Wijekoon *et al.*, 2011). En esta investigación se implementó un sistema de flujo continuo en reactores aerobios de flujo ascendente y se alcanzó una remoción de materia orgánica del 94,63% en un tiempo de retención de 15h y utilizando como inóculo adicional una bacteria productora de P(3HB) del género *Bacillus* con un 96% de identidad con la especie *B. subtilis*. Claramente, el sistema presenta altos porcentajes de remoción aun sin cumplir con un proceso de optimización y en comparación con otros sistemas utilizados para el mismo fin (Matilainen *et al.*, 2006; Humbert *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Linlin *et al.*, 2011) es de más fácil implementación y operación; es de anotar que al evaluar el tratamiento que presentó este porcentaje de remoción de materia orgánica con aguas residuales del colector Juan 23 sin inocular la bacteria obtenida en este estudio, se obtuvo un porcentaje de remoción de materia orgánica del 30,66%. Por lo tanto, el sistema implementado en esta investigación se convierte en una alternativa promisoría para el tratamiento de las aguas residuales que se vierten al río Pasto y del Departamento de Nariño.

6.5.3 Obtención de PHAs a partir de aguas residuales vertidas al río Pasto. En cuanto a la síntesis de PHAs a partir de aguas residuales vertidas al río Pasto fue posible recuperar biopolímero de todos los tratamientos que oscila en un intervalo de  $0,004\text{g L}^{-1}$  hasta  $0,111\text{g L}^{-1}$  (Tabla 9). Sin embargo, al realizar el análisis del diseño experimental de Plackett – Burman para identificar los factores que inciden en el proceso de obtención de PHAs a partir de aguas residuales no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para los factores evaluados (Figura 28).

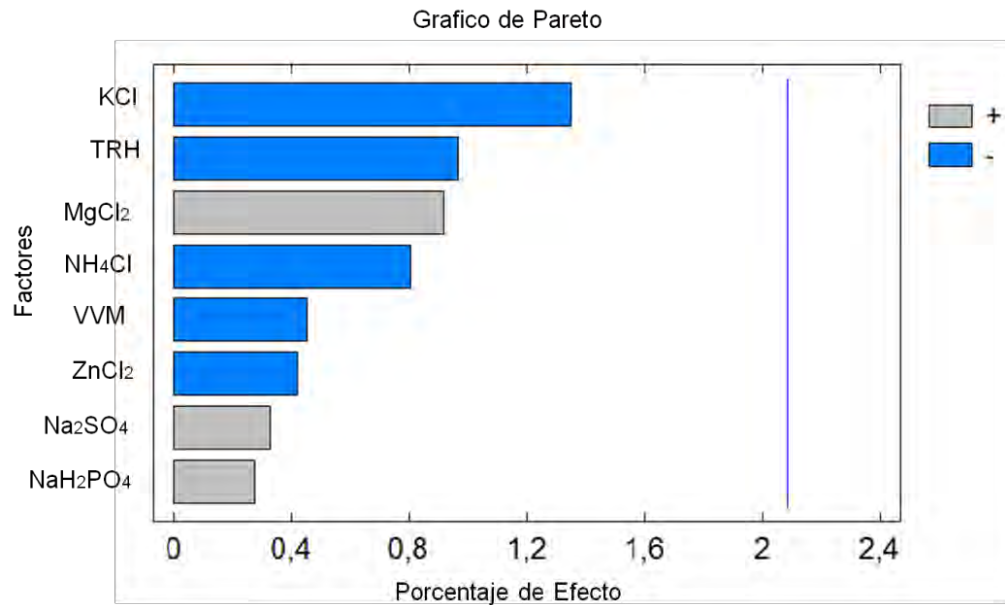


Figura 28. Incidencia de los factores sobre la síntesis de PHAs a partir de aguas residuales vertidas al río Pasto. Fuente: Este estudio.

No obstante, para determinar que tratamiento favoreció la acumulación de PHAs se realizó la prueba de rango múltiple de Duncan y se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas con un p-valor de 0,0307 siendo el tratamiento 5 (T5) el que marcó la diferencia con la producción máxima de 0,111g L<sup>-1</sup> (Figura 29).

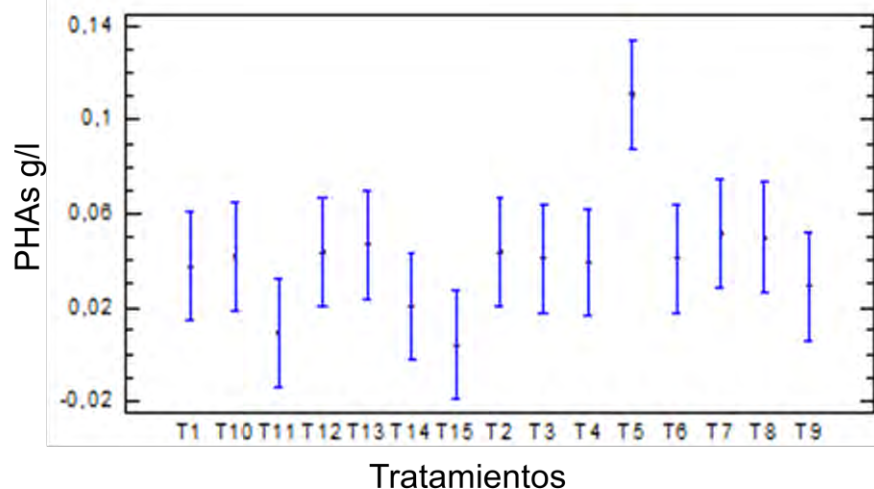


Figura 29. Obtención de PHAs en g L<sup>-1</sup> a partir del tratamiento de aguas residuales en un bioreactor de flujo ascendente operado bajo un sistema de fermentación continua. Fuente: Este estudio.

Así mismo, al realizar los análisis por cromatografía de gases de las muestras provenientes de los diferentes tratamientos, en los cromatogramas obtenidos se detectaron picos con tiempos de retención similares al del éster de metilo 3 hidroxibutirato observado en el patrón (ANEXO H). Con respecto al tratamiento 5, por ejemplo, el pico 5 del cromatograma tiene un tiempo de retención de 4,850 minutos (Figura 30) el cual es igual al tiempo de retención del éster de metilo 3 hidroxibutirato (4,850 minutos) utilizado como patrón. Por esta razón, se puede afirmar que en este trabajo fue posible recuperar poli-3- hidroxibutirato P(3HB) a partir del tratamiento de aguas residuales en un sistema de fermentación continua.

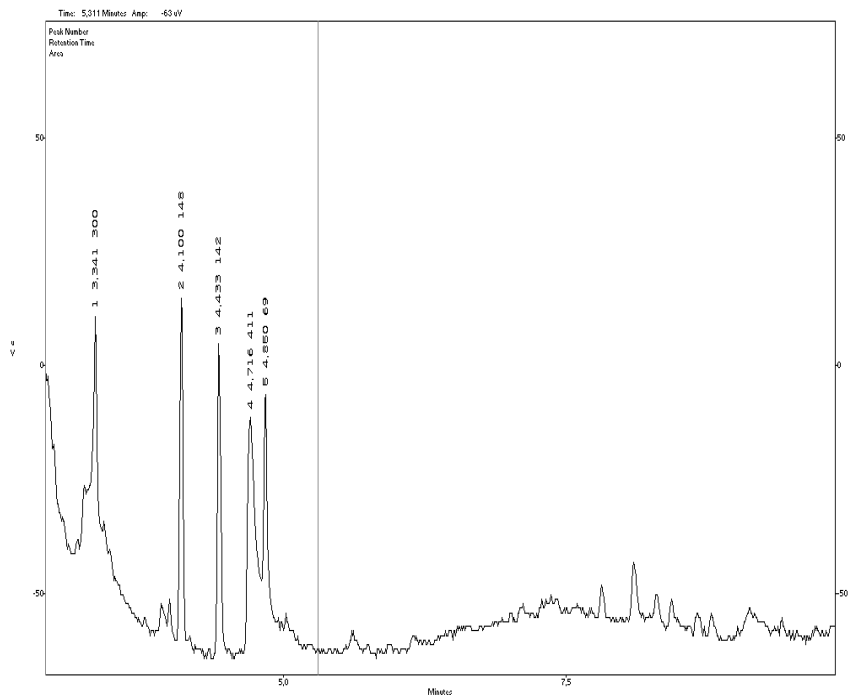


Figura 30: Cromatograma del éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,850 minutos obtenido a partir de la remoción de materia orgánica de aguas residuales vertidas al río Pasto. Fuente: Este estudio

Cabe aclarar que en esta investigación se utilizó agua residual sin optimizar las condiciones de fermentación, por lo tanto, es posible mejorar los rendimientos, ya que, es probable que bajo las condiciones del experimento realizado y teniendo en cuenta que el caudal de las aguas residuales que se vierten al río Pasto en promedio es de  $3195 \text{ L s}^{-1}$  se podrían obtener hasta 1,2 toneladas de polímero en 9 horas de tratamiento.

De esta manera, los datos aportados en esta investigación se convierten en la base para adelantar otros procesos que permitan el tratamiento de las aguas

residuales en el departamento de Nariño y recuperar un biopolímero con potencial industrial ya que, se ha establecido que los costos de obtención de los PHAs se pueden reducir más de la mitad si se utilizan subproductos o sustancias de desecho como sustrato para los microorganismos productores (Dionisi *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2007; Coats<sup>a</sup>*et al.*, 2007; Bengtsson *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2010). Todos estos procesos contribuyen a mejorar la eficiencia en la producción del polímero y así ampliar sus aplicaciones (Chua *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2011).

## CONCLUSIONES

Se demostró que es posible remover materia orgánica de las aguas residuales y producir un biopolímero de interés industrial.

Las concentraciones de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias Nilo azul A positivas se incrementan a lo largo del recorrido del río Pasto por la ciudad.

En la estación Pandiaco la cual recibe las descargas de las curtiembres se detectó el mayor número de bacterias acumuladoras de compuestos lipofílicos y un menor número de bacterias totales.

A través de análisis químicos se estableció que en el río Pasto existen bacterias productoras de PHAs, las cuales producen en términos generales entre 0,88 g L<sup>-1</sup> y 5,24 g L<sup>-1</sup> del biopolímero, en un medio sin optimizar.

Entre las bacterias productoras de PHAs se destacó el aislamiento E1M10RP, el cual tiene un 96% de identidad con la especie *B. subtilis*, según análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA. Esta bacteria produce el homopolímero polihidroxibutirato a una concentración de 5,24 g L<sup>-1</sup>, la síntesis de este biopolímero se cataloga como parcialmente asociado al crecimiento.

En los bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua implementados a escala laboratorio para el tratamiento de aguas residuales e inoculados con *Bacillus sp.* E1M10RP se logró remover hasta el 94,63% de la materia orgánica, valor que supera los parámetros establecidos en el decreto 1594 de 1984.

Bajo las condiciones de este estudio los factores que inciden en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales vertidas al río Pasto con *Bacillus sp.* E1M10RP son: la aireación, el potasio, el Zinc y el sulfato.

Fue posible obtener hasta 0,111 g L<sup>-1</sup> de P(3HB) a partir del tratamiento de las aguas residuales de la ciudad de Pasto.

## RECOMENDACIONES

Evaluar la producción de PHAs en medio sintético de todas las bacterias aisladas del río Pasto.

Realizar la caracterización bioquímica y molecular de los aislamientos productores de PHAs diferentes a los evaluados.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cromo sobre la producción de PHAs por las bacterias obtenidas en la estación Pandiaco.

Evaluar las bacterias productoras de PHAs en el tratamiento de aguas residuales derivadas del proceso de curtición o en efluentes contaminados con cromo.

Automatizar los bioreactores de flujo ascendente operados bajo un sistema de fermentación continua implementados en esta investigación.

Implementar a escala piloto el sistema de tratamiento de aguas residuales y producción de P(3HB).

Optimizar el proceso de recuperación del polímero a partir aguas residuales.

## APORTES

Se contribuyó al conocimiento de la microbiota productora de PHAs presente en el río Pasto.

Cepario de bacterias productoras de PHAs obtenidas a partir de las aguas residuales del río Pasto.

Se propone un modelo teórico de reducción del Cr VI a Cr III en bacterias productoras de PHAs.

Caracterización molecular parcial de una bacteria del genero *Bacillus* sp. que tiene el 96% de identidad con la especie *Bacillus subtilis* y produce el homopolimero P(3HB).

Se implementó un sistema de remoción de materia orgánica de aguas residuales con bacterias productoras de PHAs a escala de laboratorio, el cual está disponible para otros trabajos de investigación.

Se estandarizó un método para la recuperación de PHAs a partir del tratamiento de aguas residuales.



## DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Este proyecto se presentó en la convocatoria Tesis y/o Trabajos de Grado realizada por la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) y fue aprobado según acuerdo No 044 del 7 de Abril del 2010.

Se participó en eventos nacionales como:

- XLV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Ponencia oral del trabajo titulado: Bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) con potencial en la remoción de carga orgánica de aguas residuales. Autores: Otero, R., I. y Fernández, I., P. Memorias Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. N° 22, Suplemento 1. Pág. 100. ISSN 0120 – 4173. 2010.
- 3 Congreso Colombiano de Microbiología. 2012. Ponencia oral del trabajo titulado: Bacterias silvestres productoras de polihidroxicanoatos como una alternativa para el tratamiento de aguas residuales domesticas. Autores: Otero, R., I. y Fernández, I., P. Revista Hechos Microbiológicos. Volumen 2, Numero 2, Suplemento 1. Pág. 66. ISSN 2145-8898.

Se participó en eventos internacionales como:

- II Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad. 2011. Ponencia oral del trabajo titulado: Bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) como una alternativa para la remoción de carga orgánica de aguas residuales domésticas. Autores: Otero, I. D. y Fernández, P. Pág. 86. Memorias del congreso ISBN 978-958-57073-0-6.
- V Simposio Internacional de Biofábricas, I Congreso Internacional de Flujos Reactivos. Biorrefinerías: presente y futuro en la producción de insumos químicos y biocombustibles. Ponencia oral del trabajo titulado: Bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) como una alternativa para la remoción de carga orgánica de aguas residuales domésticas. Autores: Otero, R., I. y Fernández, I., P. 2011. Memorias del congreso. ISBN 978-958-761-023-9.

Se concedieron entrevistas para medios de comunicación regionales:

- Programa Viva la U. con duración de 3 minutos (TELEPASTO).
- Programa ARKÉ con duración de 12 minutos (TELEPASTO).
- Con bacterias investigadores de UDENAR producen plástico (Diario del Sur).

## BIBLIOGRAFIA

- Akar, A., Akkalaya, E., Yesiladali, S., Celikyimaz, G., Cokgor, E., Tamerler, C., Orhon, D. y Cakar, Z. 2006. Accumulation of polyhydroxyalkanoates by *Microlunatus phosphovorus* under various growth conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33. P.p. 215-220.
- Albuquerque, M., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B., y Reis, M. 2007. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130. P.p. 411–421.
- Albuquerque, M., Concas, S., Bengtsson, S. y Reis, M. 2010. Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: the use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresource Technology*. 101. P.p. 7112 – 7122.
- Algeciras, N., Barrera, R., Martínez, M., Pedroza, A., Reyes, C., Rodríguez, E., Rodríguez, N. y Rojas, S. 2002. Desarrollo de un sistema de biofiltración con bacterias proteolíticas y amilolíticas inmovilizadas utilizando subproductos del beneficio del café. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 46:003. P.p. 271-276.
- Alias, Z. y Tan, I. 2005. Isolation of palm oil utilising, polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria by an enrichment technique. *Bioresource Technology*, 96. P.p. 1229-1234.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215. P.p. 403-410.
- Amirul, A., Yahya, A., Sudesh, K., Azizan, M. y Majid, M. 2008. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Bioresource Technology*, 99. P.p. 4903-4909.
- Anastassios, C., Siska, H., Chouhan, B. y Dieter, J. 2008. Structural Basis of poly(3-Hidroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*. *J. Mol. Biol.* 382. P.p. 1184-1194.
- Anderson, A. y Dawes, E. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Rev. Microbiol.* 54 P.p. 4450-4472.
- Angenent, L., Karim, K., Al-Dahhan, M., Wrenn, B. y Dominguez, R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Review. TRENDS in Biotechnology*. 22 (9). P.p. 477 – 485.

Anshuman, A., Khardenavis, M., Suresh, K., Sandeep, N., y Tapan, Ch. 2007. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly b-hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*. 98. P. p. 3579-3584.

Apella, M. y Araujo, Z. 2005. *Microbiología de agua, Conceptos Básicos*. P.p.1 – 18. Buenos Aires – Argentina.

APHA, AWWA, WEF (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation). 2005. *Standard Methods for the examination of water & wastewater*. 21<sup>st</sup>. Edition. ISBA 0-87553-047-8.

Arcos, M. y Vargas, A. 2006. Degradación de Aguas Residuales y Producción de Polihidroxialcanoatos Mediante un Biorreactor Discontinuo. Universidad Nacional Autónoma de México, XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. P.p 1-10.

Arcos, M., Avila, S., Estupiñán, S. y Gómez, A. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova - publicación científica* ISSN: 1794-2470. 3. P.p. 69-79.

Aslim, B., Yuksekdog, Z. y Beyatli, Y. 2002. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. P.p. 24-30.

Ayar, H. y Tarhan, L. 2007. The correlation between glycogen-glycolysis metabolite pyruvate and vancomycin antibiotic productions of *Amycolatopsis orientalis* grown in glucose medium. *Biochemical Engineering Journal*. 33. P.p. 134 – 140.

Baruzzi, S., Matarante, A., Caputo, I., Morea, M. 2006. Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed. *Meat Science*. 72. P.p. 261–269

Bastardo, A., Bastardo, H. y Rosales, J. 2007. Diversidad funcional de las bacterias heterotróficas del bajo Río Orinoco, Venezuela. *Ecotrópicos* 20 (1). Sociedad Venezolana de Ecología. P.p. 15-23.

Bastidas, M. 2006. Director oficina de recurso hídrico Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO), archivos internos de monitoreo del río Pasto.

Bastidas, M. 2008. Director oficina de recurso hídrico Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO), archivos internos de monitoreo del río Pasto.

- Bello, G. y Brandl, H. 2007. Selección de bacterias productoras de polihidroxitirato. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Redalyc 41 (2). ISSN 1025-3076. P.p. 10-18.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour.Technol.* 99. P.p. 509–516.
- Benson. 2001. *Microbiological Applications Lab Manual*, Eighth Edition. Capítulo 15. P.p 64 – 66. The McGraw–Hill.PDF.
- Bitton, G. 2005. *Wastewater Microbiology*.Third Edition. John Willey & Sons, Inc. WILEY Series in Ecological and Applied Microbiology. ISBN 0-471-65071-4. P.p. 1 – 765.
- Bolaños, M. y Carranza, C. 2006. Identification and appraisalment of the main pollution sources of Vilcanota river in the Calca - Urubamba sector. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG.* 9 (17). P.p.97-106.
- Bolivar, F. 2004. *Fundamentos y casos exitosos de la Biotecnología Moderna*. ISBN: 970-640-235-7. P.p. 264 – 268.
- Borah, B., Thakur, P. y Nigam, J. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol*, 92. P.p. 776-783.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. y Genser, K. 1998. Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology.* 65. P.p. 127-161.
- Bravo, M., Moreno, A., Henández, C., Yeomans, J., y Okumoto, S. 2005 Implementación y monitoreo de la etapa inicial del sistema de tratamiento de aguas residuales del laboratorio de procesamiento de alimentos de la Universidad EARTH. *Tierra tropical.* 1 (1). P.p. 89 – 97.
- Burbano, S., Rodrigues, J. y Calad, C. 1995. Evaluación del impacto ambiental de los efluentes líquidos de la cerveceria de Nariño Bavaria S.A. sobre el río Pasto. Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de especialización en ecología. Universidad de Nariño.
- Caicedo, F. y Molina, J. 2003. Remoción de materia orgánica de lixiviados del relleno sanitario la esmeralda por medio de un reactor U.A.S.B. Universidad nacional de Colombia, Sede Manizales. Facultad de ingeniería y arquitectura, Departamento de Ingeniería Química. P.p. 43 – 47.

Carminatti, C., Messane, F, Zanchet, B. y Rodrigues, P. 2006. Producao de Polihidroxiacanoatos. Universidad Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. EQA 5316 Engenharia Bioquímica. P.p.1 -25.

Castilho, L., Mitchell, D. y Freire, D. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by products by submerged and soil state fermentation. *Bioresource Technology*, 100. P.p. 5996-6009.

Cervantes, C., Campos, J., Devars, S., Gutiérrez, F., Loza, H., Torres, J. y Moreno, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 25. P.p. 335 – 347.

Chan, Yi., Chong, M., Law, Ch. y Hassell, D. 2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical Engineering Journal* 155. Pp. 1-18.

Chang, H., Chang, W., Chuang, S. y Fang, Y. 2011. Comparison of polyhydroxyalkanoates production by activated sludges from anaerobic and oxic zones of an enhanced biological phosphorous removal system: effect of sludge retention time. *Bioresource Technology*. 102. P.p. 5473 – 5478.

Charuvan, K. y Chalermraj, W. 2007. Batch production of polyhydroxyalkanoate by low-polyphosphate-content activated sludge at varying pH. *Bioresource Technology* 98. P.p. 1020–1027.

Chen<sup>a</sup>, B., Y., Shiau, T., Wei, Y., Chen, W., Yu, B., Yen, Ch. y Hsueh, Ch. 2011. Feasibility study of polyhydroxyalkanoates production for materials recycling using naturally occurring pollutant degraders. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. P.p. 1-4.

Chen<sup>b</sup>, B., Y., Shiau, T., J., wei, Y., H. y Chen, W., M. 2011. Feasibility study on polyhydroxybutirate production of dye decolorizing bacteria using dye and amine bearing cultures. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. P.p. 1-5.

Chua, A., Takabatake, H., Satoh, H. y Mino, T. 2003. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research*. 37. P.p. 3602 – 3611.

Chun, M., Chan, P., Lawford, H., Chua, H., Lo, W. y Yu, P. 2005. Microbial synthesis and characterization of physiochemical propieties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by bacteria isolated from activated sludge obtained from the municipal wastewater works in Hong Kong. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 121-124. P.p. 731-739.

- Coats<sup>a</sup>, E., Loge, F.J., Wolcott, M.P., Englund, K., Mcdonald, A.G., 2007. Synthesis of polyhydroxyalkanoates in municipal wastewater treatment. *Water Environ.* 79. P.p. 2396 –2403.
- Coats<sup>b</sup>, E., Loge, F., Smith, W., Thompson, D. y Wolcott, M. 2007. Functional stability of a mixed microbial consortium producing PHA from waste carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 136-140. P.p. 909 - 926
- Cole, J., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R., Kulam-Syed-Mohideen, A., McGarrell, D., Marsh, T., Garrity, G. y Tiedje, J. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37. P.p. D141-D145.
- Crites, R. y Tchobanoglous, G. 2000. traducido por Camargo, M., Pardo, L. y Mejia, G. *Sistemas de manejo de aguas residuales para núcleos pequeños y descentralizados. Tomo 2.* McGraw-Hill. ISBN: 958-41-0045-9. Capítulos 2 y 7. P.p. 21 -105 y 397 – 521.
- Das, S y Santra, S. C. 2007. Microbial interactions with heavy metals and their applications in bioremediation of wastewater. Chapter 3, *New Frontiers of Environmental Biotechnological Application.* Published by: ENVIS centre on environment biotechnology. Department of environmental science, University of Kalyani. P.p. 81-100.
- Díaz, G. 2009. *Fundamentos y Técnicas de Análisis Microbiológicos: Morfología y Estructura Bacteriana*, Madrid, Curso 2009 – 2010. P.p 6 – 9.
- Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli, M., Papini, P., Riccardi, C., Majone, M. y Carrasco, F., 2005. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water.* 10. P.p. 2076–2084.
- Dong, H., Tao, W., Zhang, Y. y Li, Y. 2012. Development of an anhydrotetracycline – inducible gene expression system for solvent- producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering. *Metabolic Engineering.* 14. P.p. 59-67.
- Doran, P. 1995. *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos.* Editorial ACRIBIA, S.A. Capítulo 13, ISBN 84-200-0853-2. P.p. 349 – 405.
- Espinosa, J. 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. P.p. 17 – 18.

Fernandes, J., Jansen de oliveira, P., Gouvêa, R. y Ribeiro, X. 2011. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from Pigeonpea (*Cajanus cajan*(L.) Millsp) root nodules. *Appl Biochem Biotechnol*, 163. P.p. 473-484.

Fernández, P., Ortiz, F., Burbano, O., Guerrero, M. y España, J. 2006. Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento bacteriano y síntesis de polihidroxicanoato de una cepa de *Bacillus Micoides* FBL2. *Revista Centro de Estudios en Salud*. 1 (7). P.p. 34-42.

Fernández, P. y Bravo, D. 2009. Abundancia de bacterias productoras de polihidroxicanoato en suelos de la región Andina de Nariño, Colombia. *Revista Centro de Estudios en Salud*. 1 (11). P.p. 25 – 45.

Findley y White (1983) citado por: Foster, L., Saufi, A. y Holden, P. 2001. Environmental concentrations of polyhydroxyalkanoates and their potential as bioindicators of pollution. *Biotechnology Letters* 23. P.p. 893-898.

Fontúrbel, F. y Ibáñez, C. 2004. Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. *El portal de la Biología y Ciencias de la Salud*. 17. P.p. 1-6.

Foster, L., Saufi, A. y Holden, P. 2001. Environmental concentrations of polyhydroxyalkanoates and their potential as bioindicators of pollution. *Biotechnology Letters* 23. P.p. 893-898.

Gao, X., Chun, J., Wu, Q. y Qiang, G. 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 22. P.p. 768-774.

Garcez, M., Santos, R., Zanotto, S., Cabrera, J. y Ferreira, L. 2009. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World J Microbiol Biotechnol*, 25. P.p. 1751-1756.

Gobernación de Nariño, Oficina Departamental de Turismo. 2007. Mapa vial y turístico, San Juan de Pasto Ciudad sorpresa de Colombia. *Emprende camino conoce Nariño*.

Gómez, M. y Concha, M. 2012 Estudio de bacterias marinas hidrocarburoclásticas con potencial para la producción de PHAs en relación al tipo de gen *phaC*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Programa de Biología. Universidad de Nariño. P.p. 45.

González, O., Aguirre, J., Saugar, G., Orozco, L., Alvarez, G., Palacios, K. y Guevara, O. 2007. Diagnóstico de la calidad del agua de consumo en las comunidades del sector rural noreste del municipio de León, Nicaragua. Editorial Universitas, 1 P.p. 7-13.

Gottschalk, G. 1986. Bacterial Metabolism, second edition, Springer – Verlag New York Inc. Chapter 1 P.p. 1 - 11. ISBN 0-387-96153-4.

Gray, N. 1994. Calidad del agua potable problemas y soluciones. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Guardia, A., Petiot, C. y Rogeau, D. 2008. Influence of aeration rate and biodegradability fractionation on composting kinetics. Waste Management. 28. P.p. 73 – 84.

Guerrero, N. y Guzman, R. 2007. Determinación de las Causas de Contaminación en las Fuentes Hídricas Superficiales de la Microcuenca Alta -Alta del Río Pasto. Tesis de grado presentada como requisito para Optar el título de Ingeniero Sanitario y Ambiental. Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad Mariana, San Juan de Pasto.

Gutiérrez, C. y Cervantes, C. 2008. Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. Ide@s CONCYTEG. 37. Pp. 21-36.

Henao, J. y Rosero, F. 1996. Evaluación de alternativas para el tratamiento de aguas residuales que se vierten al río Pasto. Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de especialización en ecología. Universidad de Nariño.

Hoek, J., Hofman, J. y Graveland, A. 1999. The use of biological activated carbon filtration for the removal of natural organic matter and organic micropollutants from water. Wat Sci Tech. 40 (9). P.p. 257 – 264.

Huang, M., Li, Y. y Gu, G. 2010. Chemical composition or organic matters in domestic wastewater. Desalination, 262. P.p. 36 – 42.

Humbert, H., Gallard, H., Suty, H. y Croue. 2008. Natural organic matter (NOM) and pesticides removal using a combination of ion exchange resin and powdered activated carbon (PAC). Water research. 42. P.p. 1635-1643.

Janssen, P. 2006. Minireviews. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S Rrna Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (3). P.p. 1719–1728.



- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. y Castro, S. 2005. Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 31. P.p. 55–67.
- Kang, Z., Gao, C., Wang, Q., Liu, H. y Qi, Q. 2010. A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co production in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 101. Pp. 7675-7678.
- Kassab, G., Halalsheh, M., Klapwijk, A., Fayyad, M. y Van Lier, J. 2010. Sequential anaerobic-aerobic treatment for domestic wastewater – A review. *Bioresource Technology* 101. P.p. 3299 – 3310.
- Katircioglu, H., Aslim, B., Yüksekdağ, Z., Mercan, N. y Beyatli, Y. 2003. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *Afr J Biotechnol* 2. P.p.147-149.
- Kessler, B. y Witholt, B. 2001. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*. 86. P.p. 97-104.
- Khardenavis, A., Vaidya, A., Kumar, M. y Chakrabarti, T. 2009. Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge. *Waste Management*, 29. P.p. 2558-2565.
- Kling, S. 2007. Determination of domestic wastewater characteristics and its relation to the type and size of developments. Trabajo presentado como requisito parcial para obtener el título de Master de Ingeniería. Facultad de Ingeniería Civil Universidad Teknologi Malaysia. P.p. 5 – 11.
- Kocberber, N., Stensballe, A., Otzen, D. y Donmez, G. 2010. Proteomic changes in response to chromium (VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*. 101. P.p. 2134 – 2140.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P. y Winn, W. 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth Edition. Lippincott Raven Publishers. ISBN: 0-397-51529-4. P.p. 98-100.
- Labuzek, S. y Radecka I. 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J Appl Microbiol*, 90. P.p.353-357.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E. e OODFELLOW, M. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. England: John Wiley & Sons, Chichester, P.p. 115–163.
- Lee, S., Choi, J. y Lee, S. H. 2000 Production of Polyhydroxyalkanoates by fermentation of bacteria. *Macromol.Symp*. 159. P.p. 259-266.

- Legat, A., Gruber, C., Zangger, G. y Stan, L. 2010. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87. P.p. 1119 – 1127.
- Lew, B., Tarre, S., Beliavski, M., Dosoretz, C. y Green, M. 2009. Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination*, 243. P.p. 251 – 257.
- Linlin, W., Xuan, Z. y Meng, Z. 2011. Removal of dissolved organic matter in municipal effluent with ozonation, slow sand filtration and nanofiltration as high quality pre-treatment option for artificial groundwater recharge. *Chemosphere*. 83. P.p. 693-699.
- Lisboa, M. 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinérea*) en *Vidvinífera*. Tesis de grado presentada como requisito para optar el título de ingeniero Agrónomo en la Universidad de Talca, Facultad de ciencias agrarias, escuela de agronomía. Chile. P.p. 1-49.
- Liu, Zh., Wang, Y., He, N., Huang, J., Zhu, K., Shao, W., Wang, H., Yuan, W. y Li, Q. 2011. Optimization of polyhydroxybutirate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 185. P.p. 8-16.
- Llana, S. y Jay, D. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 14. P.p.475–483.B
- López, M. 1981. Tratamiento Biológico de Aguas Residuales en Prospectiva de la Biotecnología en México. Ed. CONACYT. México. P.p. 259-284.
- Luanmanee, S., Attanandana, T., Masunaga, T. y Wakatsuki, T. 2001. The efficiency of a multi-soil-layering system on domestic wastewater treatment during the ninth and tenth years of operation. *Ecological Engineering*. 18. P.p. 185-199.
- Ma, C., Chua, H., Yu, P. y Hong, K. 2000. Optimal production of polyhydroxyalkanoates in activated sludge biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 83-86. P.p. 981-989.
- Madigan, M; Martinko, J; y Parker, J. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. PEARSON Prentice Hall. ISBN 978-84-7829-097-0. P.p. 113 – 114; 634 – 635.

- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P. y Clark, D. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A. ISBN 978-84-7829-097-0. P. p. 118-144.
- Madison, L. y Huisman, G. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*. 63 (1). P.p. 21-53.
- Mahvi, A., Mesdaghinia, A. y Karakani, F. 2004. Feasibility of continuous flow sequencing batch reactor in domestic wastewater treatment. *American Journal of Applied Sciences* 1 (4). ISSN 1546-9239. P.p. 348-353.
- Matilainen, A., Vieno, N. y Tuhkanen, T. 2006. Efficiency of the activated carbon filtration in the natural organic matter removal. *Environment International*. 32. P.p. 324-331.
- Mizuno, K., Ohta, A., Hyakutake, M., Ichinomiya, Y. y Tsuge, T. 2010 Isolation of polyhydroxyalkanoate producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polymer Degradation and Stability*, 95. P.p. 1335-1339.
- Morgan, S., Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P. y Werker, A. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorous. *Water Research*. 44. P.p. 5196- 5211.
- Mostacedo, B. y Fredericksen, T. 2000. Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. BOLFOP. Santa Cruz. Bolivia. P.p. 3 – 19.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. 2009. Microbiología médica, Sexta edición. ELSEVIER, ISBN 978848086-465-7.
- Ndegwa, P., Wang, L. y Vaddella, V. 2007. Stabilisation of dairy wastewater using limited-aeration treatments in batch reactors. *Biosystems Engineering*. 97. P.p. 379-385.
- Nelson, D. y Cox, M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth Edition. Chapter 6. Enzymes. P.p. 191-225
- Nhu, S., Soda, S., Inoue, D., Sei, K. y Ike, M. 2009. Effects of intermittent and continuous aeration on accelerative stabilization and microbial population dynamics in landfill bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 108 (4). P.p. 336-343

Ntaikou, I., Kourmentza, C., Koutrouli, E., Stamatelatou, K., Zampraka, A., Kornaros, M. y Lyberatos, G. 2009. Exploitation of olive oil mill wastewater for combined biohydrogen and biopolymers production Bioresource Technology. P.p.1-7.

Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W. y Backhaus, H. 1996. Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. J Bacteriol, 178. P.p. 5636-5643.

Oshiki, M., Yang, Y., Onuki, M., Satoh, H., Peng, Y. y Mino, T. 2008. Occurrence of polyhydroxyalkanoate as temporal carbón storage material in activated sludge during the removal of organic pollutants. Journal of water and environment technology. 6 (2). P.p. 1-7.

Ostle, A. y Holt, J. 1982. Nile Blue A as a Fluorescent Satín for Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology. 44 (1). P.p. 238-241.

Otero, I. y Fernández, P. 2008. Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos como Bioindicadores de Contaminación por Materia Orgánica en Aguas del Río Pasto, (Nariño-Colombia). Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. 20 (1). ISSN 0120 – 4173. P.p.49-50.

Otiniano, G., Tuesta, C., Robles, C., Luján, V. y Chavez, C. 2007. Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp. y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. Rev. Med. Vallejana. 4 (1). P.p. 32-42.

Paredes, J. y Vallejo, M. 1994. Determinación de la calidad del agua del río Pasto mediante parámetros fisicoquímicos, bacteriológicos y biológicos. Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de especialización en ecología. Universidad de Nariño.

Park, S., Choi, J. y Lee, S. 2005. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. Enzyme and Microbial Technology. 36. P.p. 579-588.

Patra, R., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. y Naidu, R. 2010. Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in Gram positive bacteria isolated from contaminated sites. Soil Biology & Biochemistry. 42. P.p. 1857 – 1863.

Peng, Zh., Reti, H., Dongkai, Z., Yiqun, H. y Zhiyuan, B. 2011. Synergism of novel sequence Bio-ecological Process and Biological Aerated Filter for sewage treatment in cold climate. Chinese Journal of Chemical Engineering. 19 (5). P.p. 881 – 890.

- Pijuan, M., Casas, C. y Baeza, J. 2009. Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorous removal microbial communities. *Process Biochemistry*, 44. P.p. 97-105.
- Pírez, M. y Mota, M. 2006. *Temas de Bacteriología y Virología Médica: Morfología y Estructura Bacteriana*. Segunda edición Corregida, Oficina del libro FEFMUR, Uruguay P.p. 26 - 27
- Porwal, Sh., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., Purohit, H., Sharma, R., Kumar, S., Patel, S. y Kalia, V. 2008. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99. P.p. 5444-2451.
- Qaid, A., Ponnuraj, K., Ahmad, A. y Samsudin, R. 2008. *In vitro* genotoxicity tests for polyhydroxybutyrate A synthetic biomaterial. *Toxicology in Vitro*, 22. P.p. 57-67.
- Rahimi, Y., Torabian, A., Mehrdadi, N., Habibi, R., Pezeshk, H. y Nabi, B. 2011. Optimizing aeration rates for minimizing membrane fouling and its effect on sludge characteristics in a moving bed membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*. 186. P.p. 1097-1102.
- Ramírez, D. Campos, G., Vargas, E. y Cervantes, C. 2006 Mecanismos bacterianos de tolerancia al cromo. *Ciencia Nicolaita*. 45. P.p. 41-54.
- Ramírez, D., Díaz, P., Vargas, E., Riveros, R., Campos, G. y Cervantes, C. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21. P.p. 321-332.
- Ramírez, D. Riveros, R., Campos, G. y Cervantes, C. 2009. Reducción bacteriana de cromo hexavalente: mecanismos y aplicaciones. *Revista de educación Bioquímica*. 28 (3). P.p. 73 – 79.
- Razzaq, A., Jamil, N., Naheed, N. y Hasnain, Sh. 2010. Bacterial from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology*. 9 (13). ISSN 1684-5315. P.p. 1919 – 1925.
- Reddy, C., Ghai, R. y Kalia, V. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87. P.p. 137-146.
- Rehm, B. 2007. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor made bioparticules. *Curr. Issues Mol. Biol*. 9. P.p. 41-42.

- Rehm, B. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. Applied and Industrial Microbiology. P.p.1-15.
- Rehman, Sh., Jamil, N. y Husnain, Sh. 2007. Screening of different contaminated environments for polyhydroxyalkanoates producing bacterial strains. *Biologia*, Bratislava, 62. P.p. 650-656.
- Rheinheimer, G. 1987. *Microbiología de las Aguas*, 4. ed. Zaragoza España: editorial Acribia S.A.
- Rhu, D., Lee, W., Kim, J. y Choi, E. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water Science and Technology*. 48 (8) P.p. 221–228.
- Rittmann, B. y McCarty, P. 2001. *Biotecnología del medio ambiente, principios y aplicaciones*. Mc GrawHill.
- Rivera, I., Chowdhury, M., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M. y Colwell, R. 1995. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to Generate Fingerprints of Genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and Non-O1 Strains. *Appl. Environ. Microbiol* 61. P.p. 2898-2904.
- Rodicio, M y Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* . 22(4). P.p. 238-245.
- Rojas, O., Villafañá R., Gonzalez, R., y Nungaray, A. 2006. Análisis de rutas metabólicas en *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de polihidroxicanoatos a partir de glucosa usando modos elementales. *e-Gnosis* [online]. 4 (12). P.p. 1-30.
- Roldán, G. 1994. Estado actual de la limnología en Colombia: Proyectos y Perspectivas. Memorias del seminario taller: Investigaciones limnológicas recientes en ecosistemas acuáticos tropicales. Universidad de Bogota Jorge Tadeo Lozano. Colciencias.
- Ros, M., Goberna, M., Pascual, J., Klammer, S., Insam, H. 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *Journal of Microbiological Methods*. 72. P.p. 221-226
- Ruiz, A., Almeida, A., López, I. y Pettinari, J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*. 3. P.p. 122 – 133.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, A. 2011. Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza. Tesis para obtener el título profesional de Ingeniero en Alimentos Universidad Tecnológica de la Mixteca. P.p. 20 – 24.

Sangkharak, K. y Prasertsan, P. 2007. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology*, 132. Pp. 331-340

Sato et al. (1994). citado por: Arcos, M. y Vargas, A. 2006. Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante un bioreactor discontinuo. XV congreso nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.

Segura, J. 2000. Notas de diseños experimentales. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. P.p. 1 – 59.

Shahhosseini, Sh. 2004. Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 39. P.p. 963-969.

Sheu, D., Lai, Y., Chang, R. y Chen, W. 2009. Detection of polyhydroxyalkanoate synthase activity on a polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, 393. P.p. 62 – 66.

Singh, M., Patel, S. y Kalia, V. 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial cell factories*. BioMed Central. P.p. 1-11.

Smith, J. 2004. *Biotechnology*. 4ta edición. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-83332-5. P.p. 21 – 93.

Sonune, A. y Ghate, R. 2004. Developments in wastewater treatment methods. *Desalination*. 167. P.p. 55-63.

Souza, C. Burbano-Rosero, E., Almeida, B., Barreto, C., Rivera, I. 2012. Chitinolytic Bacteria Diversity Isolated from Marine Ecosystems with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil. ISSN: 1751-7362. EISSN: 1751-7370. *The ISME Journal* (In press).

Spiekermann, P., Rehm, B., Kalscheuer R., Baumeister, D. y Steinbuchel, A. 1999. Sensitive, Viable –Colony Staining Method Using Nile Red for Direct Screening of Bacteria That Accumulate Polyhydroxyalkanoic Acids and Other Lipid Storage Compounds. *Arch Microbiol*, 171. P.p. 73-80.

Sudesh, K., Abe, H. y Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25. P.p. 1503 – 1555.

Suntud, S., Soydoa, V. y Waree, Ch. 1999. Removal of Organic Matters and Phenol Compounds from the Waste Water by Using Granular Activated Carbon - Sequence Batch Reactor System. *Thammasaltn t. J. Sc.T ech.* 4. P.p. 1-11.

Tamdogan, N y Sidal, U. 2011. Investigation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 under different conditions. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17. P.p. 173-176.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 28. P.p. 2731-2739.

Toro, M., Robles, S., Avilés, J., Nuño, C., Vivas, S., Cuellar, P., Moreno, J., Moya, G., Bonada, N., Prat, N., Tercedor, J., Casas, J., Guerrero, C., Suárez, M., Vidal, M. y Pardo, I. 2002. Calidad de las aguas de los ríos mediterráneos del proyecto GUADALMED. Características físico-químicas. Asociación Española de Limnología, Madrid. Spain. *Limnetica* 21. P.p. 63 - 75

Tortora, G., Funke, B. y Case, Ch. 2010. *Microbiology an introduction*. Decima Edición. Pearson Education, Inc. ISBN 0-321-55007-2. P.p. 113 – 180.

Trevors, J., Kirk, J., Beaudette, I., Miranda Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., Jack T. 2004. Review. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58.P.p. 169– 188.

Trotsenko, Y. y Belova, L. 2000. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate – co - 3- Hydroxyvalerate) and its regulation in Bacteria. *Microbiology*, Vol. 69.No. 6. P.p. 753-763.

Usman, A., Nazia, J., Nighat, N. y Shahida, H. 2007. Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. *African Journal of Biotechnology*. 6 (9), P.p. 1115-1121.

Valappil, P., Boccaccini, R., Bucke, C. y Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates in Gram positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 91. P.p.1–17.

Valappil, P., Rai, R., Bucke, C. y Roy, I. 2008. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *J Appl Microbiol*,104. P.p.1624-1635.

Vassallo, P., Paoli, C. y Fabiano, M. 2009. Energy required for the complete treatment of municipal wastewater. *Ecological Engineering*. 35. P.p. 687-694.



Vishnuvardhan, R., Thirumala, M., Kishore, R. y Mahmood, S. 2008. Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates (PHA) from municipal sewage sludge. *World J Microbiol Biotechnol.* 24. P.p. 2949-2955.

Volova, T., Gladyshev, I., Trusova, Y. y Zhila, N. 2007. Degradation of polyhydroxyalkanoates in eutrophic reservoir. *Polymer Degradation and Stability* 92. P.p. 580 – 586.

Wang, J. y Yu, H. 2007. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75. P.p. 871-878.

Wang, Y. y Qian, P – Y. 2009. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS one.* 4 (10). P.p. 1 – 9.

Wang, Y., Hua, F., Tsang, Y., Chan, S., Sin, S., Chua, H., Yu, H. y Ren, N. 2007. Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratios. *Bioresource Technology.* 98. P.p. 1690-1693.

Wang, Y., Ren, Zh., Jiang, F., Geng, J., He, W. y Yang, J. 2011. Effect of copper ion on the anaerobic and aerobic metabolism of phosphorus accumulating organisms linked to intracellular storage compounds. *Journal of Hazardous Materials.* 186. P.p. 313-319.

Wijekoon, K., Visvanathan, C. y Abeynayaka, A. 2011. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology.* 102. P.p. 5353 – 5360.

Wook, R., Suk, K., Goodrich, Ph. y Park, C. 2008. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD using swine wastewater: effect of supplementing glucose, yeast extract, and inorganic salts. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 13. P.p. 651-658.

Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. y Chen, G. 2001. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek,* 80. P.p. 111-118.

Xua J., Smytha C., Buchanana, J., Dolana, A., Rooneya, P., Millara, C., Goldsmitha, C., Elbornb, C., Moorea, J. 2004. Employment of 16S rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. *Public Health Laboratory.* Department of Bacteriology, Belfast City Hospital, Northern Ireland.

Yilmaz, M., Soran, H. y Beyatli, Y. 2005. Determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, 21. P.p. 565-566.

Yoon, S., Kim, H. y Yeom, I. 2004. The optimum operational condition of membrane bioreactor (MBR): cost estimation of aeration and sludge treatment. *Water Research*. 38. P.p. 37-46.

You, Sh., Tsai, Y., Cho, B. y Chou, Y. 2011. Metabolic influence of lead on polyhydroxyalkanoates (PHA) production and phosphate uptake in activated sludge fed with glucose or acetic acid as carbon source. *Bioresource Technology*. 102. P.p.8165-8170.

Yuncu, B., Sanin, D. y Yetis, U. 2006. An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials B137*. P.p. 990-997.

# ANEXOS

Anexo A: Dimensiones de los diferentes componentes de los bioreactores implementados para el desarrollo del tercer objetivo de esta investigación.

Soporte solución de nutrientes	Largo	72cm
	Alto	29cm
	Ancho	12cm
Recipiente solución nutrientes	Alto	14,5cm
	diámetro tapa	11cm
	diámetro base	9cm
Altura solución de nutrientes – mezclador		40cm
Alimentador agua residual	Alto	34cm
	diámetro tapa	32cm
	diámetro base	24cm
	distancia hasta el mesón	80cm
Mezclador	Alto	13cm
	ancho	5cm
Distancia alimentador agua residual - válvula 1 (pvc)		12,5cm
Distancia alimentador agua residual - válvula 2 (cobre)		62cm
Distancia tubería saliente alimentador agua residual - mesón		79cm
Distancia tubería inferior - mesón		1cm
Altura reactores – mesón		10cm
Distancia entre reactores		30cm
Distancia entre reactores con intermedio tubería caudal principal		50cm
Distancia entre los dos grupos de 4 reactores		45cm
Tubería caudal de salida del reactor	Largo	20cm
	Alto	20cm
Dimensiones mesón donde se ubicaron los reactores	Largo	374cm
	altura al techo	130cm
	ancho del mesón	60cm
	distancia mesón al piso	90cm
Reactores	Alto	60cm
	diámetro	11,4cm
	altura hasta caudal de salida	20,66cm
Sedimentador	Largo	21cm
	Alto	10,5cm
	Ancho	10cm
	ubicación de divisiones	c/5cm

Anexo B: Descripción de las características culturales de los 44 aislamientos Nilo Azul A positivos obtenidos del río Pasto.

	Características macroscópicas								
Aislamiento	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura o Consistencia	Propiedad Óptica	Tamaño	Configuración	Color
E1M1 RP	Irregular	Ondulado	Pulvinada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco
E1M4 RP	Irregular	Entero	Umbonada	Rugosa	Viscosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco translucido
E1M7 RP	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Opaca	Mediano	Irregular y extendida	Blanco
E1M9 RP	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Viscosa	Opaca	Mediano	Irregular y extendida	Blanco
E1M10 RP	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Viscosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco
E1M12 RP	Irregular	Entero	Pulvinada	Rugosa	Pegajosa	Opaca	Grande	Arrugada	transparente
E1M19 RP	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Irregular y extendida	Caqui
E2M21 RP	Circular	Irregular o Erizado	Plana	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E2M23 RP	Irregular	Irregular o Erizado	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda con margen festoneado	Blanco
E2M26 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Cremosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E2M27 RP	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Opaca	Mediano	Redonda	Gris claro
E2M29 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Pegajosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E3M1 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E3M2 RP	Circular	Entero	Plana	Pulverulenta	Viscosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco

E3M3 RP	Irregular	Irregular o Erizado	Plana	Pulverulenta	Membranosa	Opaca	Grande	Irregular y extendida	Blanco
E3M4 RP	Irregular	Ondulado	Plana	Pulverulenta	Membranosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco
E3M5 RP	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Opaca	Grande	Irregular y extendida	Blanco
E3M9 RP	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Opaca	Grande	Irregular y extendida	Blanco
E3M6 RP	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Membranosa	Opaca	Grande	Irregular y extendida	Blanco
E4M1 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E4M3 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Cremosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Blanco
E4M4 RP	Puntiforme	Irregular o Erizado	Convexa	Lisa	Viscosa	Opaca	Pequeño	Redonda	Blanco
E4M5 RP	Circular	Irregular o Erizado	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E4M6 RP	Irregular	Irregular o Erizado	Montañosa	Seca	Membranosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco
E4M7 RP	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Pegajosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Blanco
E4M8 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Caqui
E4M12 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Translucido
E4M15 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Blanco
E4M16 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E4M17 RP	Puntiforme	Irregular o Erizado	Plana	Lisa	Viscosa	Opaca	Pequeño	Redonda	Blanco
E4M18 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E4M22 RP	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa	Opaca	Mediano	Redonda	Blanco
E4M23 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Caqui

E4M24 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E4M25 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Caqui
E4M26 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E4M30 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Pequeño	Redonda	Caqui
E4M32 RP	Irregular	Irregular o Erizado	Umbonada	Rugosa	Pegajosa	Opaca	Grande	Arrugada	Blanco
E4M34 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E4M35 RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco
E4M36 RP	Circular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E4M37 RP	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Caqui
E5M13A RP	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa	Brillante	Mediano	Redonda	Blanco translucido
E5M13B RP	Puntiforme	Ondulado	Elevada	Lisa	Viscosa	Opaca	Mediano	Redonda	Blanco

Anexo C: Evaluación de la fluorescencia en los 44 aislamientos bacterianos obtenidos del río Pasto y cultivados en agar Plate Count suplementado con Nilo Azul A.

Aislamiento	Tiempo de incubación			Fluorescencia con Nilo Azul A
	12h	24h	72h	
E1M1	-	+	+	Naranja con borde rojo
E1M4	-	+	+	Naranja con borde rojo
E1M7	-	+	+	Rosado tenue
E1M9	-	+	+	Naranja con borde rojo
E1M10	-	+	+	Naranja con borde rojo
E1M12	-	-	+	Naranja con borde rojo
E1M19	-	+	+	Naranja con borde rojo
E2M21	-	+	+	Naranja con borde rojo
E2M23	-	+	+	Naranja tenue
E2M26	-	-	+	Rosado tenue
E2M27	-	+	+	Naranja con borde rojo
E2M29	-	+	+	Rosada
E3M1	-	-	+	Rosado tenue
E3M2	-	-	+	Naranja con borde rojo
E3M3	-	-	+	Naranja con borde rojo
E3M4	-	-	+	Naranja con borde rojo
E3M5	-	+	+	Naranja con borde rojo
E3M6	-	+	+	Naranja con borde rojo
E3M9	-	+	+	Naranja con borde rojo
E4M1	-	+	+	Rosado tenue
E4M3	-	+	+	Rosado tenue
E4M4	-	+	+	Naranja
E4M5	-	+	+	Naranja con borde rojo
E4M6	-	+	+	Naranja con borde rojo
E4M7	-	-	+	Rosada
E4M8	-	-	+	Naranja con borde rojo
E4M12	-	+	+	Naranja con borde rojo
E4M15	-	+	+	Rosada
E4M16	-	+	+	Naranja con borde rojo
E4M17	-	-	+	Naranja
E4M18	-	+	+	Rosada



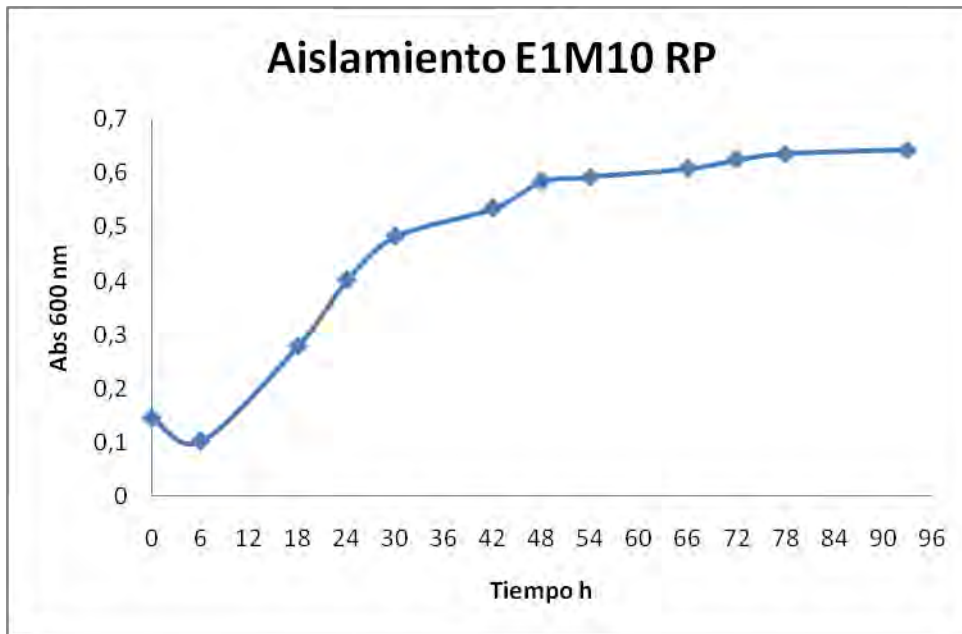
E4M22	-	+	+	Naranja
E4M23	-	+	+	Rosada
E4M24	-	+	+	Rosada
E4M25	-	-	+	Rosada
E4M26	-	+	+	Rosada
E4M30	-	+	+	Rosada
E4M32	-	-	+	Naranja con borde rojo
E4M34	-	+	+	Rosada
E4M35	-	+	+	Rosada
E4M36	-	+	+	Rosada
E4M37	-	+	+	Naranja con borde rojo
E5M13A	-	+	+	Rosada
E5M13B	-	+	+	Rosada

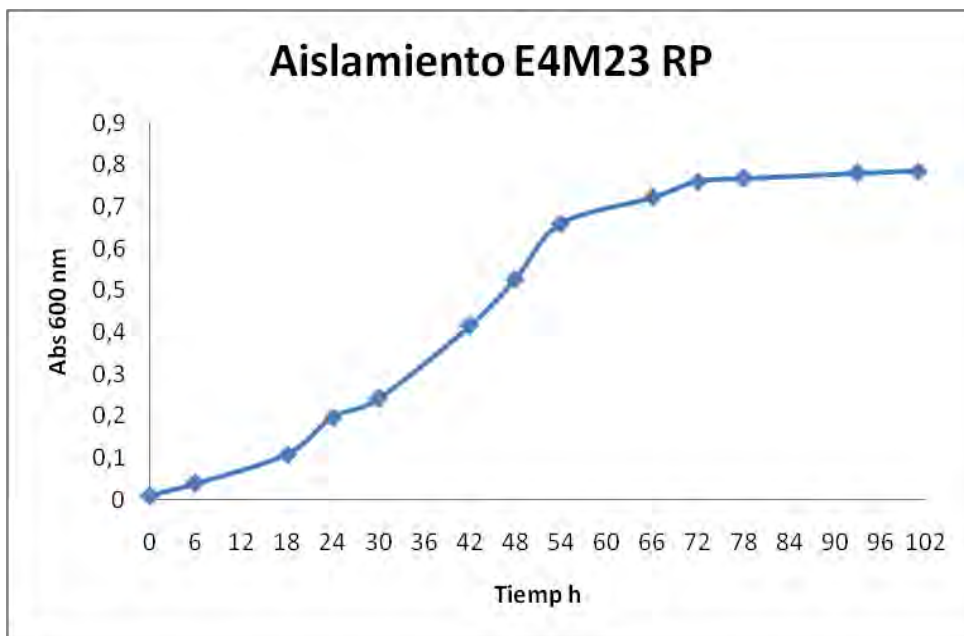
Anexo D: Descripción microscópica de los 44 aislamientos bacterianos Nilo Azul A positivos obtenidos del río Pasto.

Aislamiento	Tinción de Gram	Morfología microscópica
E1M1 RP	Positivos	Bacilos individuales
E1M4 RP	Positivos	Bacilos en empalizada
E1M7 RP	Negativos	Bacilos individuales
E1M9 RP	Positivos	Bacilos largos individuales
E1M10 RP	Positivos	Bacilos en cadena
E1M12 RP	Positivos	Bacilos en empalizada
E1M19 RP	Positivos	Bacilos individuales
E2M21 RP	Positivos	Bacilos cortos
E2M23 RP	Positivos	Bacilos esporulados
E2M26 RP	Negativos	Bacilos cortos individuales
E2M27 RP	Negativos	Bacilos en empalizada
E2M29 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M1 RP	Negativos	Bacilos individuales
E3M2 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M3 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M4 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M5 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M6 RP	Positivos	Bacilos individuales
E3M9 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M1 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M3 RP	Positivos	Estafilococos
E4M4 RP	Negativos	Bacilos individuales
E4M5 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M6 RP	Positivos	Bacilos en empalizada
E4M7 RP	Positivos	Bacilos cortos individuales
E4M8 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M12 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M15 RP	Negativos	Bacteria filamentosa
E4M16 RP	Positivos	Bacilos esporulados individuales
E4M17 RP	Negativos	Bacilos cortos
E4M18 RP	Negativos	Bacilos individuales
E4M22 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M23 RP	Positivos	Bacilos esporulados individuales

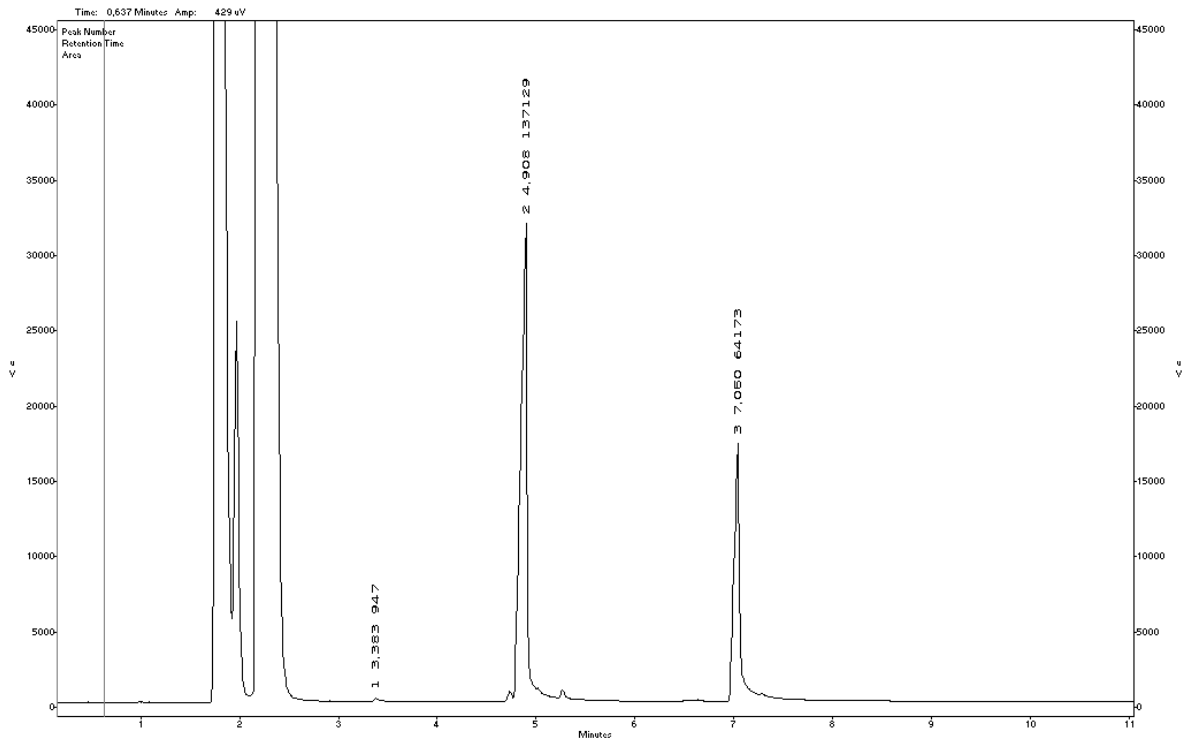
E4M24 RP	Negativos	Bacilos individuales
E4M25 RP	Positivos	Bacilos delgados individuales largos
E4M26 RP	Negativos	Diplococos
E4M30 RP	Positivos	Bacilos individuales
E4M32 RP	Positivos	Bacilos esporulados individuales
E4M34 RP	Positivos	Bacilos en cadena
E4M35 RP	Negativos	Cocobacilos
E4M36 RP	Positivos	Bacilos largos individuales esporulados
E4M37 RP	Negativos	Bacilos
E5M13A RP	Negativos	Bacilos individuales esporulados
E5M13B RP	Negativos	Filamentosa

Anexo E: Curva de crecimiento de los aislamientos bacterianos acumuladores de PHAs pre-seleccionados con la tinción de Negro sudan B





Anexo F: Cromatograma del copolímero Poli-3-hidroxi-butirato – co- 3-hidroxi-valerato P(3HB-co-3HV) utilizado como patrón para determinar el tipo de PHAs sintetizado por el aislamiento bacteriano E1M10RP creciendo en medio sintético. Pico 2 éster de metilo 3 – Hidroxi-butirato con tiempo de retención de 4,908 minutos. Pico 3 éster de metilo 3- hidroxi-valerato con tiempo de retención de 7,060 minutos.



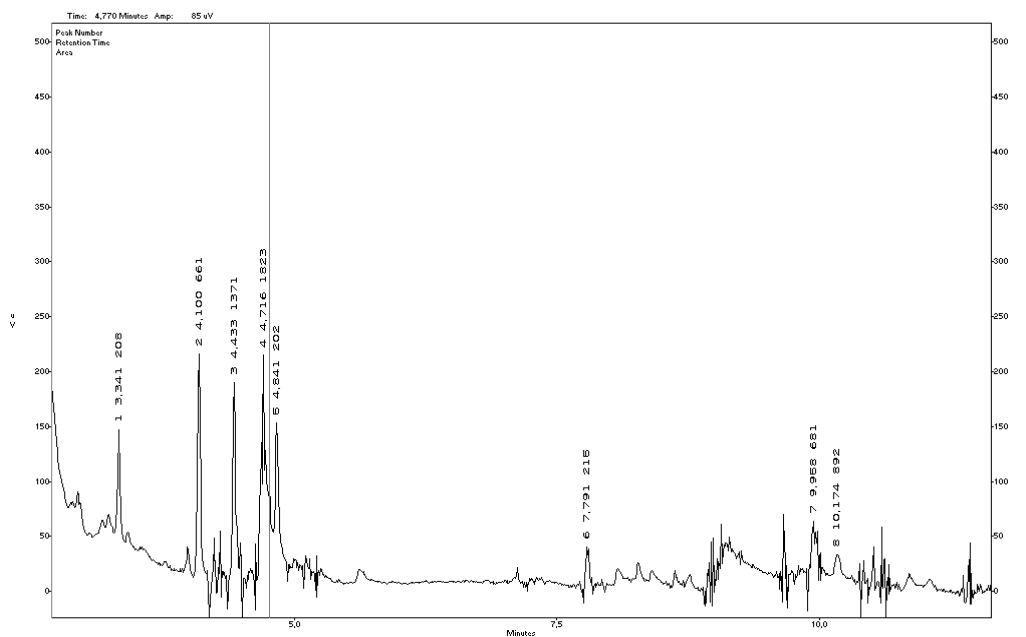
Anexo G: Secuencia editada de 815pb del gen 16S rRNA obtenida del aislamiento bacteriano E1M10 RP.

>E1M10RP

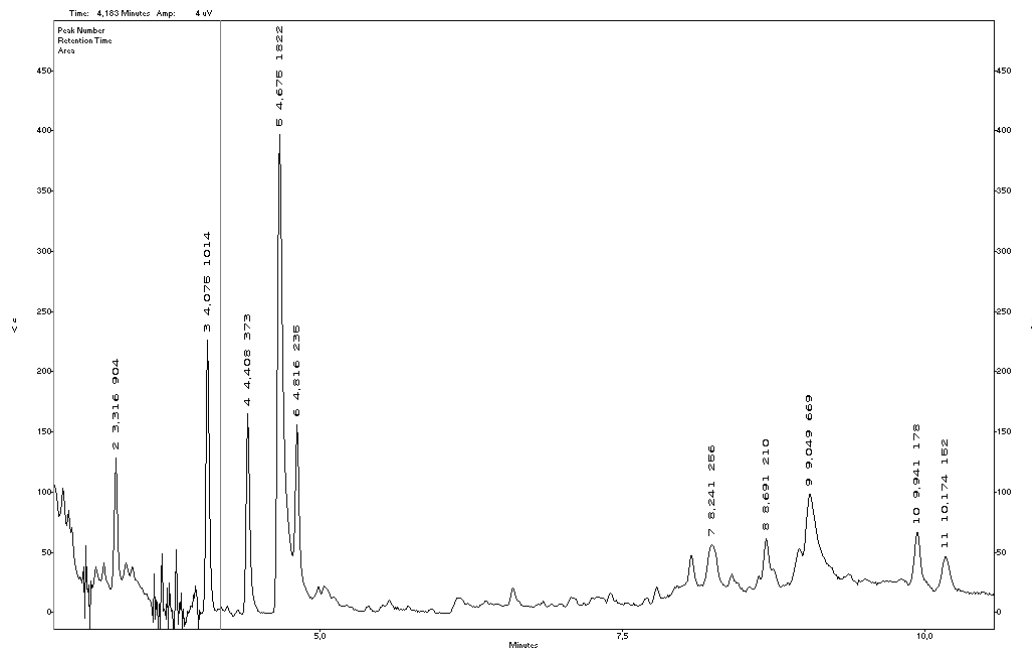
```
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC
GATCCGAACTGAAAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGTCGGTATTACA
GCTGCGCGCGTTATAGTTCGTGTCTCATTGTAGCACGGTGTGTATGGCACAC
ACGGTCAGTGAATGCGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCG
GTTTGTACACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAAA
TCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCATCACAGACACGAG
CTGACGACAACCATGCACGCACCTGTCACGTCTGCCCCCGAAGGGGACGTC
CTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAGAGACACTGGTAAGGTTCTTCGCGT
TGCTTCGAATTAACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTCAGATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGT
TAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCT
CCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC
ACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCA
CTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTCA
CATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCC
```

Anexo H: Análisis de cromatografía de gases para identificar la presencia de PHAs a partir del tratamiento de las aguas residuales vertidas al río Pasto, de acuerdo al diseño experimental Plackett-Burman.

TRATAMIENTO 1: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.

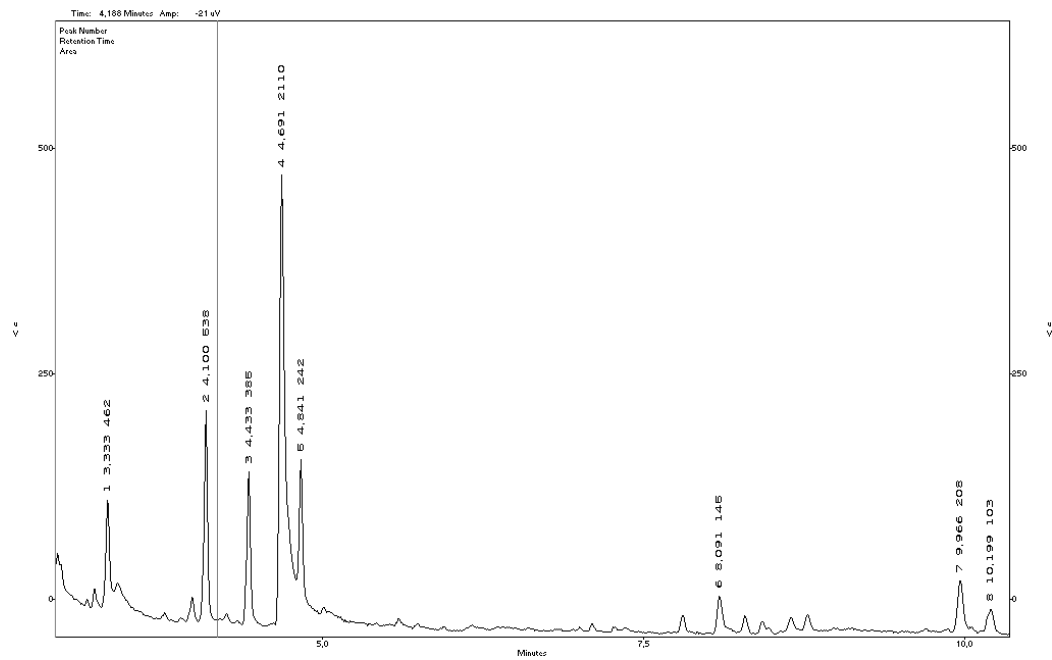


TRATAMIENTO 2: El pico 6 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,816 minutos.

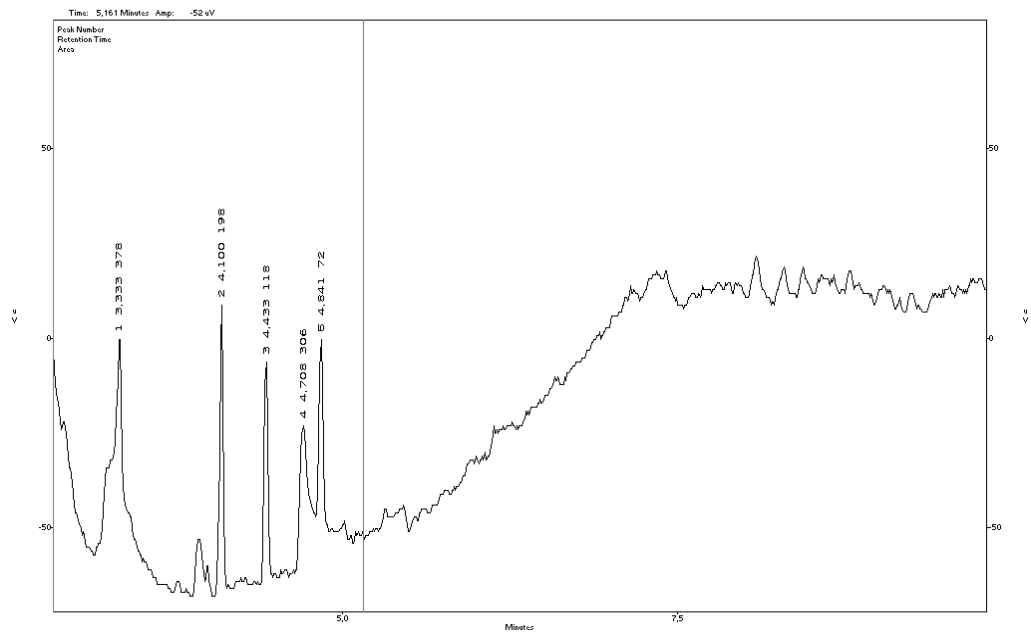




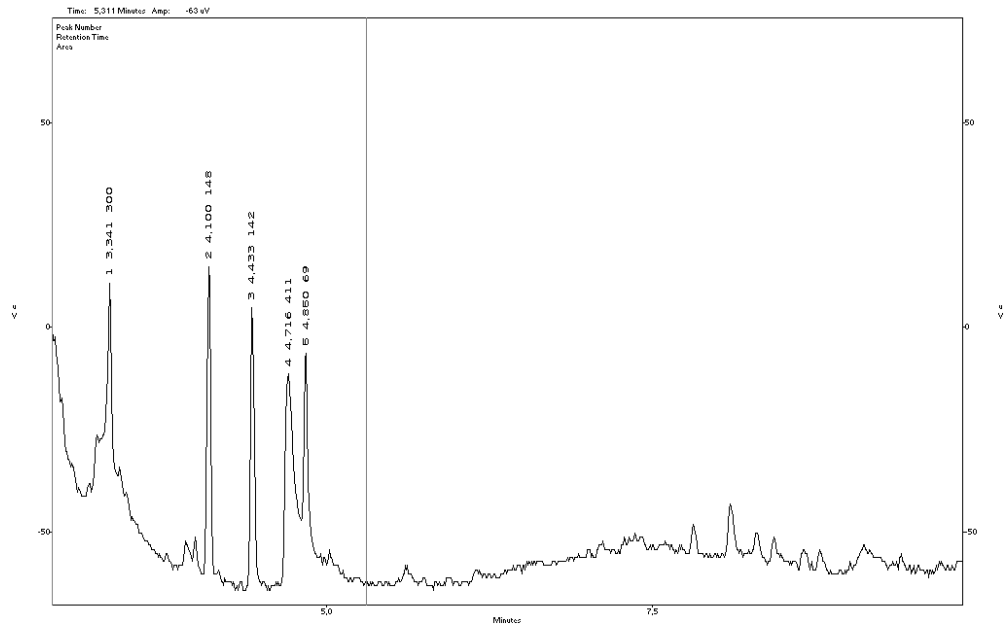
TRATAMIENTO 3: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



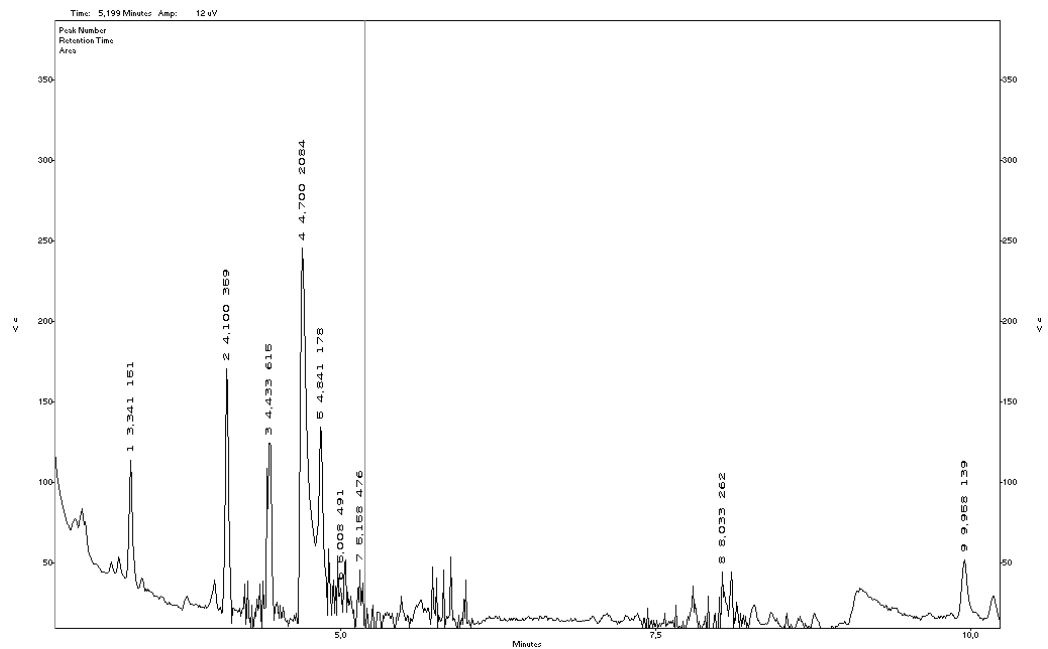
TRATAMIENTO 4: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



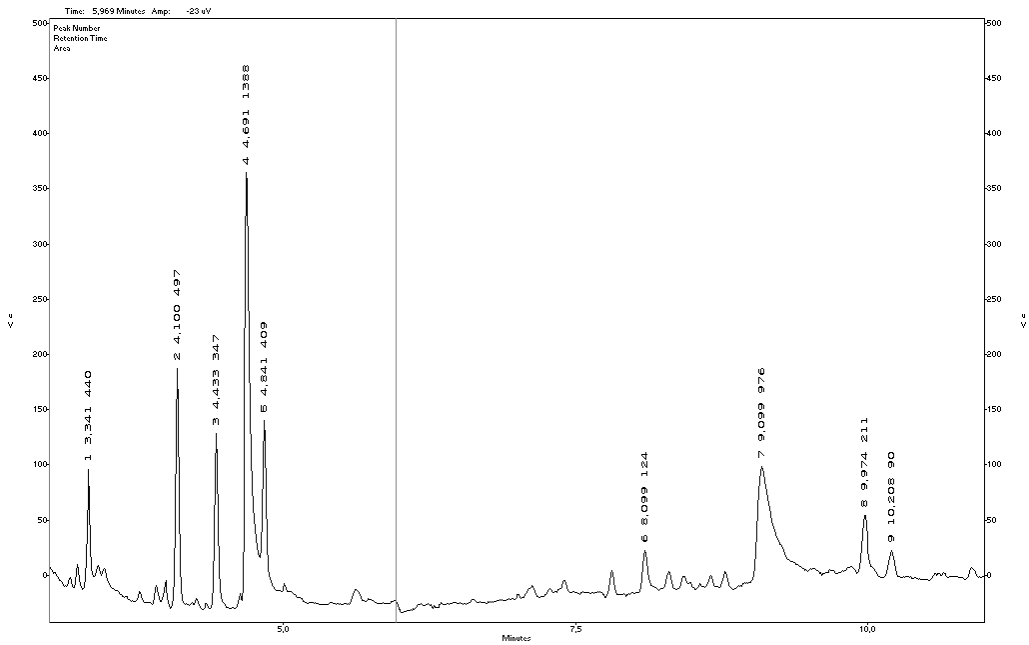
TRATAMIENTO 5: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,850 minutos.



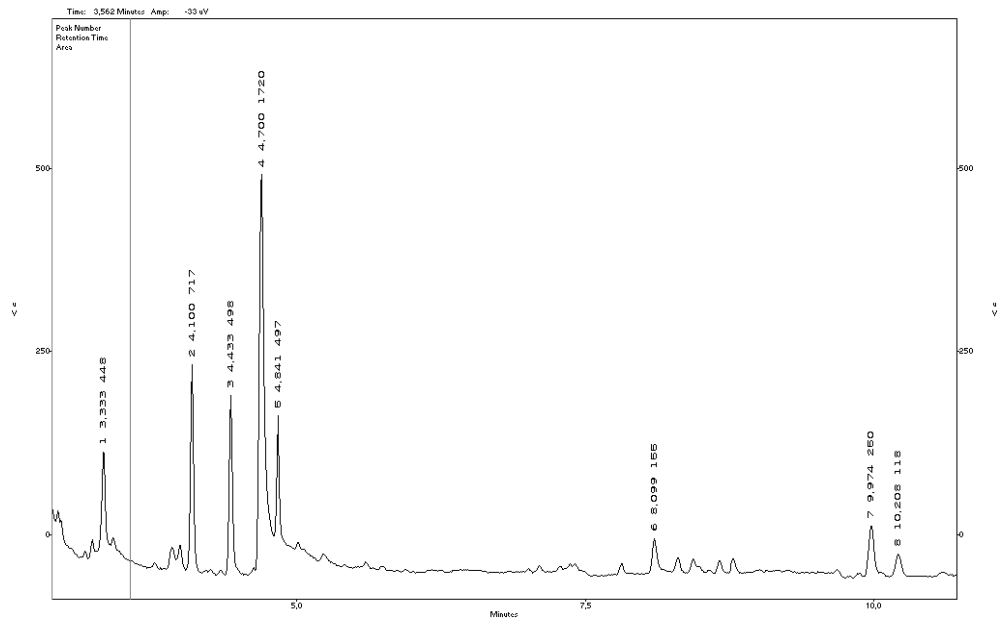
TRATAMIENTO 6: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



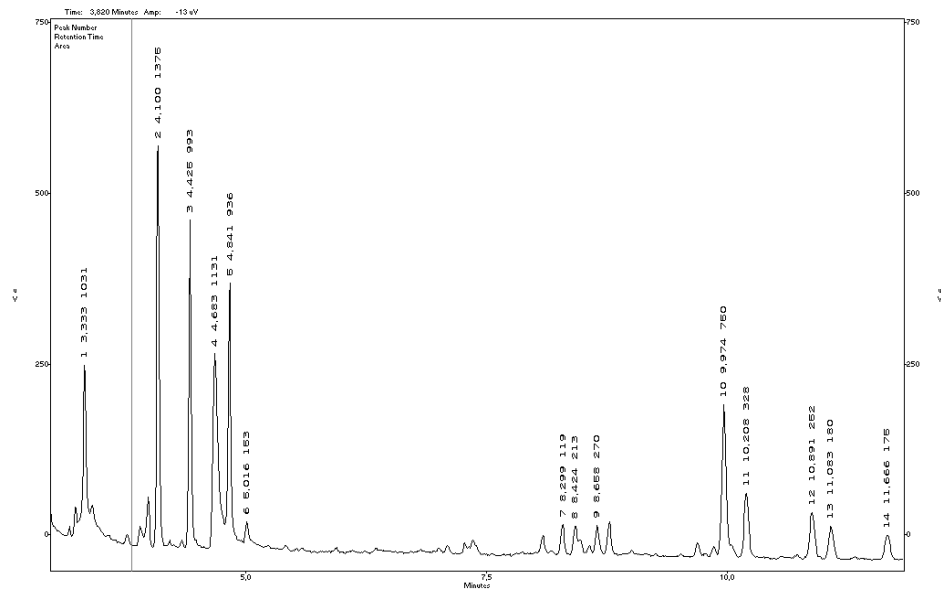
TRATAMIENTO 7: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



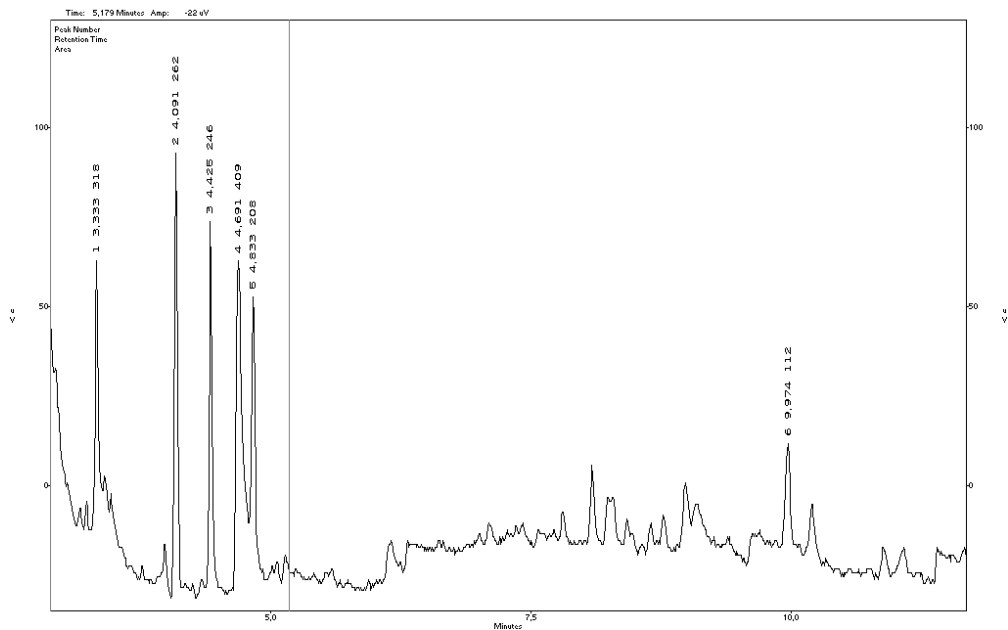
TRATAMIENTO 8: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



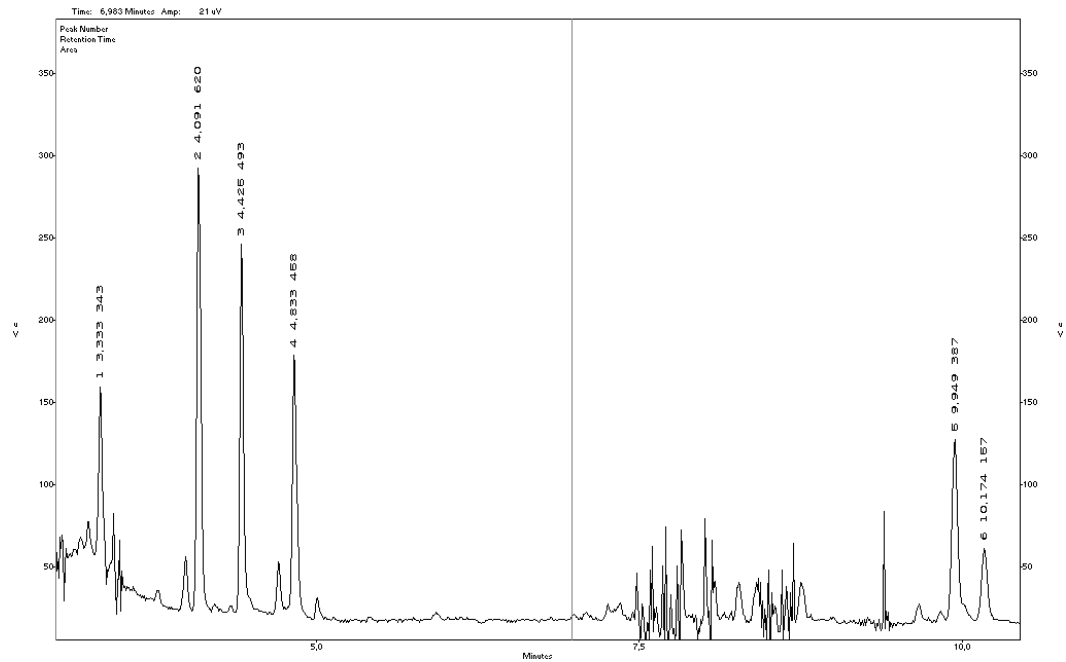
TRATAMIENTO 9: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



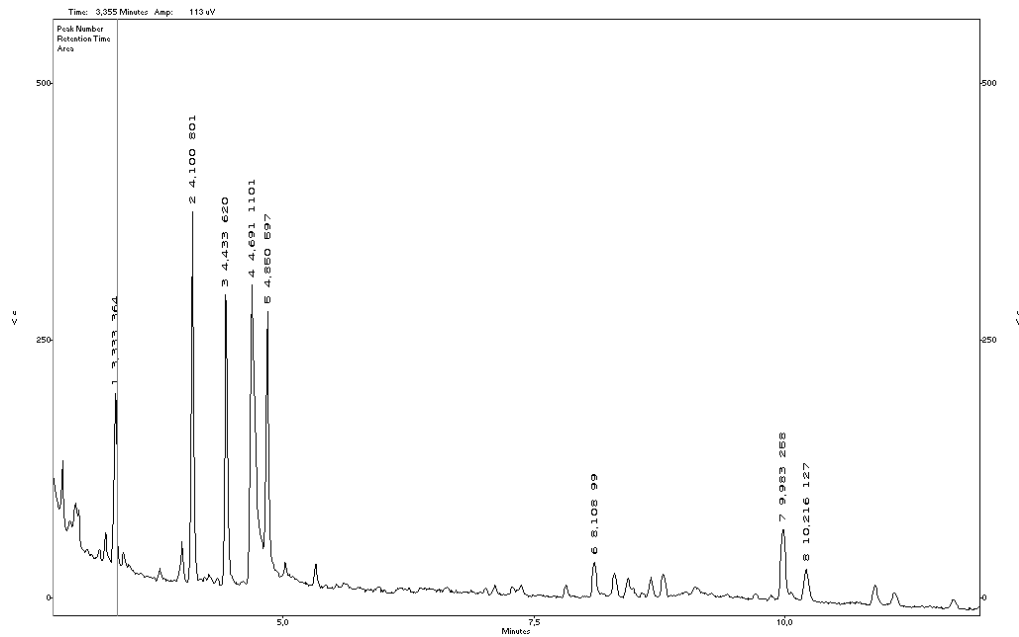
TRATAMIENTO 10: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,833 minutos.



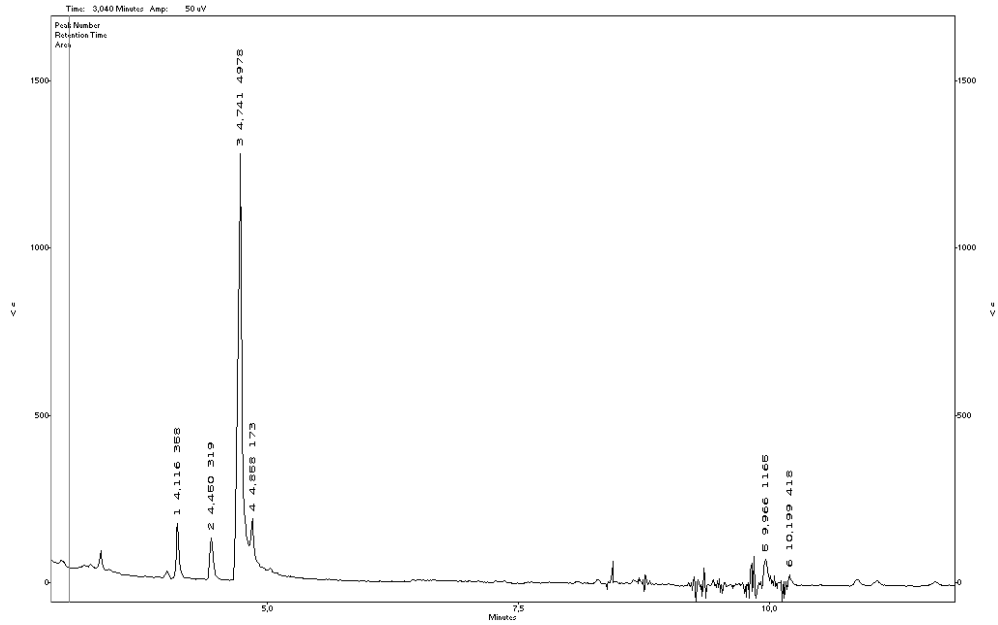
TRATAMIENTO 11: El pico 4 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,833 minutos.



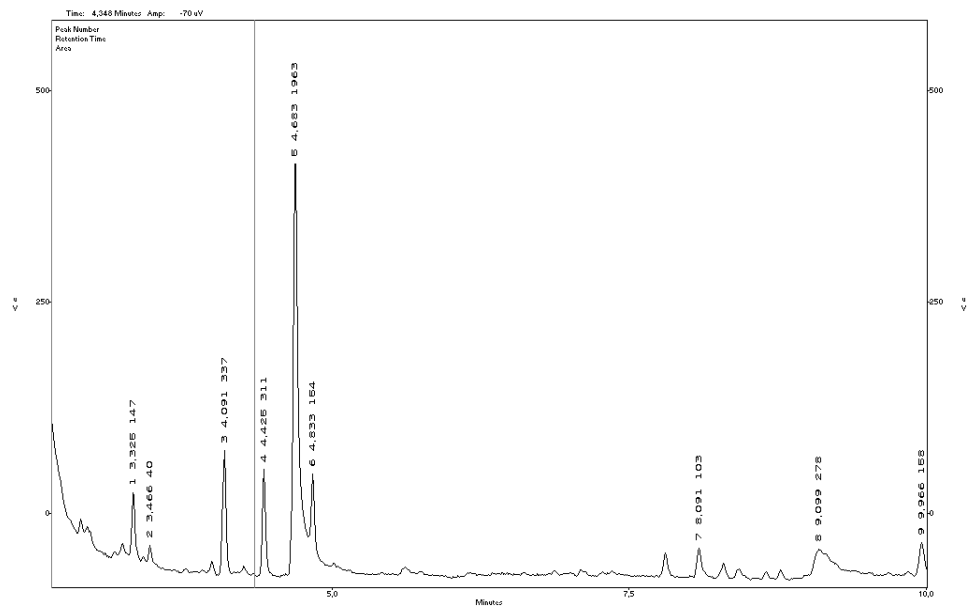
TRATAMIENTO 12: El pico 5 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,850 minutos.



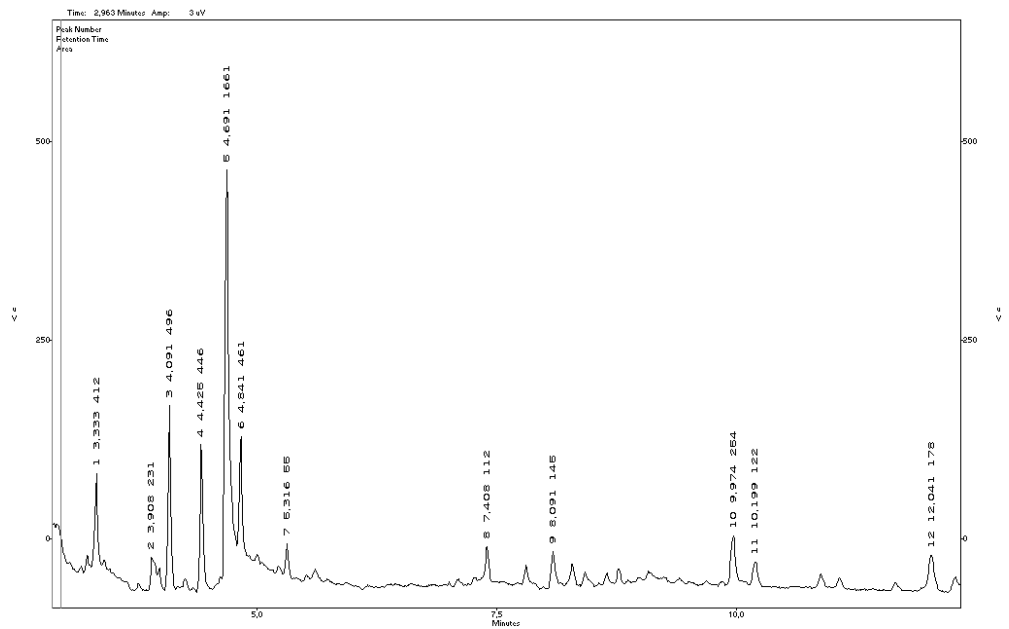
TRATAMIENTO 13: El pico 4 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,868 minutos.



TRATAMIENTO 14: El pico 6 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,833 minutos.



TRATAMIENTO 15: El pico 6 corresponde al éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,841 minutos.



PATRÓN: Cromatograma del copolímero P(3HB-co-3HV) utilizado como patrón. Pico 4 éster de metilo 3 – Hidroxibutirato con tiempo de retención de 4,850 minutos. Pico 5 éster de metilo 3- hidroxivalerato con tiempo de retención de 7,000 minutos.

